

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA
SAÚDE ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA**

MARINA AZAMBUJA AMARAL

**NETWORK META-ANÁLISE DO USO DE PROBIÓTICOS
NA PREVENÇÃO DE INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS EM
CRIANÇAS E ADOLESCENTES**

Porto Alegre

2015

MARINA AZAMBUJA AMARAL

**NETWORK META-ANÁLISE DO USO DE PROBIÓTICOS
NA PREVENÇÃO DE INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS EM
CRIANÇAS E ADOLESCENTES**

Dissertação de mestrado apresentada como requisito para obtenção do Grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

Orientador: Prof. Dr. Marcus Herbert Jones

Porto Alegre

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

A485n Amaral, Marina Azambuja

Network meta-análise do uso de probióticos na prevenção de infecções respiratórias em crianças e adolescentes. / Marina Azambuja Amaral. – Porto Alegre, 2015.

117f.: il. graf. tab.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde. Área de concentração: Clínica Médica.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Herbert Jones

1. Infecções Respiratórias /prevenção & controle. 2. Probióticos /uso terapêutico. 3. Criança. 4. Adolescente. I. Jones, Marcus Herbert. II. Título.

CDD 618.922

Bibliotecária Responsável: Elisete Sales de Souza - CRB 10/1441

DEDICATÓRIAS

*Aos meus pais **Renato e Suzana Amaral**, que me deram muito além da vida e da saúde, me proporcionaram o caminho certo em busca do bem mais precioso, a oportunidade de uma excelente educação. Um simples obrigado não bastaria, minha eterna dedicação em busca do conhecimento e crescimento são as formas que busco para agradecer todo esforço, carinho e amor que sempre me proporcionaram. A vocês, que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, eu realizasse os meus, sempre incentivando e apoiando minhas decisões. A vocês, para lhes agradecer, eu espero ser o meu melhor.*

*A minha amada irmã **Maria Eduarda Azambuja Amaral** meu constante agradecimento por todo amor, carinho, companheirismo, e amizade inigualável durante toda a vida mas principalmente desde que moramos juntas em Porto Alegre. Tua inteligência e dedicação sempre foram motivos de orgulho e inspiração. Ao meu amado irmão **Francisco Azambuja Amaral**, que mesmo longe transmite sempre, da sua maneira seu carinho, amizade e companheirismo.*

*Ao meu querido Avô **Flor Amaral**, pela eterna fonte de inspiração como pessoa humana, médico admirável, avô carinhoso e maior incentivador da constante busca pelo conhecimento e crescimento do ser humano. Segundo ele, “Não existe tesouro mais precioso e que enobreça mais o Homem que o conhecimento, e este tesouro não há tempestade que possa tirar-lhe”.*

Ao Prof. Dr. Marcus Herbert Jones, toda a minha admiração e respeito. Pela dedicação e amor a profissão. Obrigado pelas oportunidades proporcionadas e confiança constantes.

*Ao **Professor Mario Bernardes Wagner**, meu agradecimento por toda dedicação, paciência e empenho nas consultas estatísticas. Foi um grande desafio e enorme satisfação todo o aprendizado durante alguns meses de estudos. Toda a minha admiração e respeito pelo exemplo de profissional. Obrigada pelas oportunidades proporcionadas e por acreditar e se engajar junto comigo e com a Professora Rita Mattiello neste desafio.*

*Em especial, a querida **Professora Rita Mattiello**, por me receber de braços abertos, me orientar com tanto carinho e dedicação, acreditar e constantemente me incentivar a dar meu melhor. Meu eterno agradecimento e admiração pela pessoa amiga, professora e pesquisadora exemplar. Sem sua ajuda com certeza não teria conseguido. Muito Obrigada!!*

AGRADECIMENTOS

A Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Famed PUCRS em nome do Prof. Dr. Alexandre Vontobel Padoin, Presidente da Comissão Coordenadora; ao Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa, Coordenador Geral dos Cursos de Pós-Graduação em Medicina agradeço a oportunidade proporcionada na realização do curso de mestrado.

Ao Corpo Docente do Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde – área de concentração em Clínica Médica. Minha gratidão pelos ensinamentos e convívio.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da PUCRS, em especial ao Ernesto Carlos Amaral da Silva e ao José Tiago Comunello, pela disponibilidade e paciência no convívio.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Os probióticos ganhando espaço como uma intervenção promissora para a prevenção de infecções respiratórias em crianças e adolescentes, de acordo com vários ensaios clínicos randomizados controlados.

OBJETIVOS: Avaliar criticamente o efeito de diferentes probióticos na prevenção de infecções do trato respiratório em crianças e adolescentes.

MÉTODOS: Busca dos dados: Foram realizadas buscas em 24 de fevereiro de 2014 nas seguintes bases de dados: MEDLINE, EMBASE, LILACS, SCIELO, CINAHL, Scopus e Web of Science. Foram utilizadas as seguintes combinações de termos: “infecções do trato respiratório” e probióticos. **Seleção dos estudos:** foram incluídos ensaios clínicos randomizados que avaliaram o efeito dos probióticos em infecções do trato respiratório (ITR) em crianças e adolescentes. Estudos envolvendo crianças com doenças crônicas ou outras comorbidades pré-existentes e aqueles que não especificaram o tipo do probiótico administrado foram excluídos. **Extração e síntese dos dados:** dois revisores, trabalhando de forma independente, revisaram todos os títulos e resumos dos estudos para identificar estudos que preenchiam os critérios de elegibilidade. Foram realizadas análises de pares e de rede para identificar os efeitos dos probióticos sobre as infecções respiratórias. **Principais desfechos:** os desfechos primários e secundários foram infecções do trato respiratório e efeitos adversos, respectivamente.

RESULTADOS: vinte e um ensaios com 6.603 participantes foram incluídos. A análise de comparação direta sugeriu que o *Lactobacillus casei rhamnosus* (LCA) foi o único probiótico eficaz na redução da incidência de infecções respiratórias em comparação com o placebo (RR 0,38; CrI 0,19-0,45). A análise de rede mostrou que o *Lactobacillus casei rhamnosus* apresentou probabilidade de 54,7% de estar classificado em primeiro lugar, enquanto a probabilidade do *Lactobacillus fermentum CECT5716* (LFC) estar em último lugar no ranking de efetividade foi de 15,3%. O *Lactobacillus casei rhamnosus* não apresentou melhor efeito em comparação com outras cepas probióticas pelas análises indiretas.

CONCLUSÃO: Esta revisão sistemática e meta-análise encontrou falta de evidência para suportar o efeito da suplementação de probióticos na redução da incidência de infecções respiratórias em crianças e adolescentes.

Palavras chave: infecções do trato respiratório, probióticos.

ABSTRACT

CONTEXT: Probiotics have emerged as a promising intervention for the prevention of respiratory infections in children, according to several randomized controlled trials.

OBJECTIVE: Critically assess the effect of probiotics on prevention of respiratory tract infections in children and adolescents

METHODS: Data Sources: Searches were conducted on February 24, 2014 in the following databases: MEDLINE, EMBASE, LILACS, SCIELO, CINAHL, SCOPUS, and Web of Science. The following combinations of terms were used: “respiratory tract infections” AND probiotics. **Study selection:** Randomized clinical trials assessing the effect of probiotics on respiratory tract infections (RTIs) in children and adolescents were included. Studies involving children with chronic diseases or other pre-existing comorbidities and those that did not specifying the type of probiotic were excluded.

Data extraction and Synthesis: Two reviewers, working independently, screened all titles and abstracts to identify studies that met the eligibility criteria. Pairwise and network analyses were performed to identify the effects of probiotics on respiratory infections. **Main outcomes and Measures:** Main and secondary outcomes were respiratory tract infections and adverse effects, respectively.

RESULTS: Twenty-one trials with 6.603 participants were included. Direct comparison analysis suggested that *Lactobacillus casei rhamnosus* (LCA) was the only effective probiotic to the rate of respiratory infections compared to placebo (RR0.38; CrI 0.19-0.45). Network analysis showed that the *Lactobacillus casei rhamnosus* probiotic exhibited a 54.7% probability of being classified in first, while the probability of *Lactobacillus fermentum CECT5716* (LFC) being last in the ranking was 15.3%. *Lactobacillus casei rhamnosus* showed no better effect compared to other probiotic strains by indirect analysis.

CONCLUSION: This systematic review found a lack of evidence to support the effect of probiotic supplementation on the incidence rate of respiratory tract infections in children and adolescents.

Key words: respiratory tract infections, probiotics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1 - Característica dos estudos incluídos_____	42
Figura 1 – Fluxograma dos estudos_____	38
Figura 2 – Geometria da network_____	48
Figura 3 – Rankograma dos tratamentos probióticos para infecções respiratórias____	49
Figura 4 – Gráfico do risco de viés_____	52
Figura 5 – Sumário do risco de viés_____	54
Figura 6 – Forest plot de comparação de todos os probióticos vs. Placebo_____	55
Figura 7 – Forest plot de comparação do LCA com todos os probióticos_____	57
Figura 8 - Forest plot de comparação do LGG com todos os probióticos_____	58
Figura 9 - Forest plot de comparação do MWL com todos os probióticos_____	59
Figura 10 – Funnel plot_____	60

LISTA DE ABREVIATURAS

Sigla	Descrição
ITR	Infecção do trato respiratório
IRA	Infecção respiratória aguda
OMS	Organização Mundial da Saúde
OMG	Organização Mundial de Gastroenterologia
SEGNP	Sociedade Brasileira de Gastroenterologia e Nutrição Pediátrica
MBE	Medicina baseada em evidências
SBE	Saúde baseada em evidências
IC	Intervalo de confiança
RR	Risco relativo
NNT	Número necessário para tratar
CrI	Intervalo de credibilidade
RoB	Risco de viés
MCMC	Markov chain Monte Carlo methods
LGG	<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i>
LCA	<i>Lactobacillus casei rhamnosus</i>
RHT	<i>Lactobacillus rhamnosus T cell-1</i>
LRE	<i>Lactobacillus reuteri</i>
BB-12	<i>Bifidobacterium lactis</i>
LFC	<i>Lactobacillus fermentum CECT5716</i>
SSK	<i>Streptococcus salivarius K12</i>
BCL	<i>Bacillus clausii</i>
MWL	Mistura de probióticos contendo LGG
MOL	Mistura de probióticos sem LGG
PLA	Placebo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Epidemiologia das Infecções do Trato Respiratório	18
1.2. Descrição da intervenção atual	20
1.3. Descrição das características e funcionalidade dos probióticos	21
1.4. Probióticos em fórmulas infantis	23
1.5. Saúde baseada em evidências	25
1.6. Revisões sistemáticas e Meta-análises.....	26
1.7. Diferenças entre Meta-análise convencional e Network meta-analise	26
2. JUSTIFICATIVA.....	29
3. OBJETIVOS.....	30
3.1. Objetivo da revisão sistemática	30
3.2. Objetivo da Meta-análise	30
4. METODOLOGIA	31
4.1. Estratégia de pesquisa	31
4.2. Critérios de elegibilidade	32
4.3. Desfechos.....	33
4.3.1. Primário	33
4.3.2. Secundário	33
4.4. Extração dos dados	33
4.5. Risco de viés dos estudos incluídos (RoB).....	33
4.6. Apresentação dos dados e meta-análise.....	34
4.7. Análise de subgrupos	37
4.8. Avaliação da heterogeneidade	37
5. RESULTADOS	38
5.1. Seleção dos estudos	38
Identificação.....	39
Escaneamento	39
Elegibilidade	39
Incluídos.....	39
5.2. Características dos estudos	40
5.2.1. Design.....	40

5.2.2.	População	40
5.2.3.	Intervenção (colocar as referências conforme o artigo)	41
5.2.4.	Desfecho	42
5.3.	Risco de viés (RoB) dos estudos incluídos	46
5.3.1.	Randomização	46
5.3.2.	Alocação dos participantes	46
5.3.3.	Cegamento	46
5.3.4.	Dados incompletos de resultados	47
5.3.5.	Relatório dos dados	47
5.3.6.	Viés de interesse	47
5.3.7.	Perda de participantes durante o tempo de seguimento.....	48
5.4.	Efeito das intervenções	50
5.4.1.	Principais desfechos avaliados	50
5.4.2.	Pairwise meta-análise/ meta-análise convencional (comparações diretas) 50	
5.4.3.	Network meta-analise (combinação de comparações diretas e indiretas)	52
5.5.	Análise de subgrupos	56
5.6.	Desfechos secundários	59
5.7.	Viés de publicação	59
6.	DISCUSSÃO.....	61
7.	CONCLUSÃO	66
8.	REFERÊNCIAS	67
	ANEXOS	72
	ANEXO 1: Artigo submetido no JAMA Pediatrics.....	73

1. INTRODUÇÃO

1.1. Epidemiologia das Infecções do Trato Respiratório

As infecções do trato respiratório (ITR) são muito frequentes em nosso meio, e responsáveis por significativa morbidade e mortalidade. Elas podem ser classificadas como pneumonias, infecções respiratórias superiores – faringite, laringite, epiglote, sinusite, otite – e infecções respiratórias inferiores – traqueobronquite, bronquite e bronquiolite. Todas essas enfermidades, em geral, estão associadas a episódios de febre (temperatura corporal acima de 37,8 graus Celsius), alterações na ausculta pulmonar, produção de exsudado purulento e dor. A etiologia está relacionada a uma ampla gama de patógenos, como vírus, bactérias e fungos. Por possuírem etiologia diversificada, o tratamento das infecções do trato respiratório, muitas vezes, é iniciado empiricamente.

Estudos mostram que as infecções respiratórias agudas (IRA) são responsáveis por gerar um número elevado de atendimentos ambulatoriais, de internações hospitalares e de prescrições de antibióticos. Contribuem, ainda, para o aumento da morbidade e da mortalidade mundiais.

Segundo a última atualização da Organização Mundial da Saúde (OMS), em julho de 2013, as infecções do trato respiratório estão entre as principais causas de morte na última década, estando classificadas como a terceira causa de morte em 2011, representando 5,9% de todas as mortes. Dentre as infecções respiratórias, a pneumonia é a principal causa de morbidade e mortalidade na infância, e em muitas partes do mundo sendo considerada uma das causas mais importantes. A pneumonia destaca-se ocasionando o óbito de cerca de 2 milhões de crianças anualmente em todo o mundo(1),

sendo responsável por aproximadamente 19% das mortes de crianças dos 0 aos 5 anos de idade. Essa porcentagem também evidencia a estatística das crianças em tratamento com antibióticos(2). Cerca de 30% dos óbitos infantis estão relacionados à pneumonia em crianças e sepse ou pneumonia entre os recém-nascidos(3).

Dentre as infecções respiratórias virais, o vírus Influenza representa uma das maiores preocupações devido à sua rápida e fácil transmissão, podendo causar grandes epidemias. A circulação dos vírus respiratórios depende muito do clima. Regiões tropicais normalmente sofrem menor impacto, com pequenos surtos em regiões isoladas. Em regiões de clima temperado, as transmissões virais aumentam consideravelmente com a chegada do frio, causando picos epidêmicos de infecções respiratórias. Brasil, Uruguai, Chile e Argentina são os países da América do Sul que apresentam maiores índices de infecções respiratórias no inverno(4).

Em relação aos dados epidemiológicos nacionais, até 2007, os dados a respeito das infecções do trato respiratório eram considerados superficiais uma vez que não existia padronização dos critérios epidemiológicos para esse tipo de infecção. Em 2009, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária criou um guia completo contendo os Critérios Epidemiológicos Nacionais das Infecções do Trato Respiratório. Este documento tem como finalidade auxiliar os profissionais de saúde que atuam na área de controle de infecções à assistência à saúde(5).

No Brasil, nas regiões Sul e Sudeste, as infecções respiratórias são as principais causas de atendimentos nos serviços de saúde, emergências e unidades de cuidados intensivos, durante as estações mais frias(4).

1.2. Descrição da intervenção atual

Os antibióticos foram descobertos em meados do século XX, sendo caracterizados como a solução para o tratamento de infecções bacterianas e doenças infecciosas.

As infecções respiratórias são responsáveis pelo uso abusivo de antimicrobianos, e muitas vezes, erroneamente uma vez que podem ser inicialmente causadas por agentes virais. Esse uso abusivo de antibióticos para o tratamento de infecções pode provocar consequências como diarreia, prurido e até mesmo resistência bacteriana, uma vez que os patógenos descobriram maneiras de sobreviver a esses antibióticos, dificultando o tratamento da doença(6). Existem muitos estudos que tentam esclarecer o uso da terapia antimicrobiana em infecções respiratórias, mas ainda são muito contraditórios, principalmente pela variabilidade dos quadros de infecção.

Uma meta-análise realizada para avaliar a efetividade dos antibióticos no tratamento de rinite purulenta aguda incluiu sete ensaios clínicos randomizados duplo-cegos placebo-controlados, quatro contribuíram com dados sobre os benefícios dos antibióticos e quatro contribuíram com dados sobre malefícios dos antibióticos. O risco relativo total para o benefício para rinite com uso de 5-8 dias foi de 1,18 (IC 1,05-1,33; NNT=7-15), enquanto o risco relativo total para os efeitos adversos foi de 1,46 (IC 1,10-1,94; NNT=12-78), sendo os efeitos gastrointestinais os mais comuns. Diante destes resultados, os antibacterianos mostraram-se eficazes no tratamento de rinite purulenta aguda, tendo provável benefício sobre sua evolução, no entanto, o risco de efeitos adversos também foi aumentado, merecendo análise especial. A maioria dos pacientes evoluíram mais adequadamente sem antibacterianos, reforçando a importância do uso cauteloso dos antibióticos nestas condições(7).

Uma revisão sistemática publicada na Cochrane de nove ensaios clínicos randomizados duplo-cego placebo-controlados avaliou o efeito dos antimicrobianos em bronquite aguda e tosse aguda produtiva. Como resultado, os pacientes que receberam os antimicrobianos tiveram menos tosse RR = 0,64; IC95%: 0,49- 0,85; NNT = 5), entretanto, observou-se neste mesmo grupo aumento dos efeitos adversos relacionados à utilização dos antimicrobianos (RR= 1,22 (IC95%: 0,94-1,58; NNT =33). Diante dos estudos acima citados, é fundamental analisar o real efeito positivo da utilização de antimicrobianos comparando aos efeitos adversos, uso autolimitado de medicação e, principalmente, risco aumentado da resistência a essas medicações no tratamento de infecções do trato respiratório, principalmente em crianças(8).

1.3. Descrição das características e funcionalidade dos probióticos

O termo “probiótico” foi introduzido pela primeira vez em 1965 por Lilly e Stillwell. Diferenciando dos antibióticos, os probióticos foram definidos como organismos de origem microbiológica que estimulam o crescimento de outros organismos. Roy Fuller em 1989 foi o primeiro a introduziu a idéia de que os probióticos causam um efeito benéfico para o hospedeiro(9).

Segundo a Organização Mundial de Gastroenterologia (OMG) e Organização Mundial da Saúde (OMS), os probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades apropriadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro. Devido à suas características biológicas inerentes, os probióticos predominam em relação aos microrganismos patogênicos potenciais no trato gastrointestinal(9, 10).

Os probióticos são introduzidos na alimentação diária através da suplementação oral ou produto alimentar que contenha suficiente número de microrganismos, sendo capazes de alterar a microflora do hospedeiro(11, 12). Dentro os probióticos mais

estudados podemos destacar as espécies de *Lactobacillus* (*Lactobacillus rhamnosus GG*), *Bifidobacterium* (*Bifidobacterium Lactis*), *Streptococcus* (*Streptococcus thermophilus*), assim como a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e alguns *E. coli* e espécies de *Bacillus*. Estas bactérias são fermentativas, anaeróbios obrigatórios ou facultativos, produtores de ácido láctico(10).

Desde 1960 os probióticos vêm sendo estudados, mas apenas a partir de 2000 encontramos estudos relacionando a utilização de probióticos com infecções do trato respiratório (ITR). Recente meta-análise publicada em 2013, avaliou a associação da suplementação com o probiótico específico *Lactobacillus rhamnosus GG (LGG)* para a prevenção de infecções respiratórias em crianças. Foram avaliados quatro ensaios clínicos randomizados envolvendo 1805 participantes, comparados ao placebo. De acordo com os resultados, concluíram que a administração do LGG causou potencial redução na incidência de otite média, infecções do trato respiratório alto e uso de antibiótico em crianças(13).

Em 2009 foi publicada uma revisão sistemática avaliando a utilização de probióticos na prevenção de infecções do trato respiratório que incluiu 14 ensaios clínicos randomizados realizados em crianças, adultos e idosos. A partir da análise detalhada, a revisão mostrou que a maioria dos estudos indicam que a incidência de ITR não parece ser influenciada pela administração profilática de probióticos, embora os probióticos possam ter um efeito benéfico na redução da gravidade e duração das ITR(14).

O principal motivo pelo qual os probióticos são considerados importantes componentes alimentares para a diminuição do risco e melhora de doenças infecciosas está no potencial impacto que eles possuem sobre o nível da microbiota intestinal, do

epitélio intestinal e associação com a função imunológica e sistêmica da mucosa intestinal.(15) Os probióticos agem controlando o crescimento de bactérias potencialmente patogênicas, suprimindo assim esta colonização não desejada(16), além de restaurar bactérias benéficas e atividades metabólicas perdidas(17).

Além de serem utilizados no tratamento, os probióticos vem sendo administrados na prevenção de infecções, principalmente na infância. Estudo realizado em 571 crianças saudáveis entre 1 e 6 anos de idade, mostrou que o consumo de leite complementado com probiótico durante 7 meses diminuiu a incidência de infecções respiratórias com complicações, e a necessidade do uso de antibióticos(18). Outro ensaio clínico randomizado realizado em 188 lactentes com idade entre 6 e 12 meses receberam fórmula suplementada com probiótico por um período de 6 meses, comparada ao placebo, teve o objetivo de analisar o efeito dos probióticos na incidência de infecções. Neste estudo, o grupo intervenção também apresentou significativa redução de 46% na incidência de infecções do trato gastrointestinal e redução de 26% na incidência de infecções respiratórias, se comparadas ao placebo(19).

1.4. Probióticos em fórmulas infantis

Há alguns anos vem sendo comercializadas fórmulas infantis suplementadas com probióticos, tanto para lactentes quanto fórmulas de transição. Em função disso, há uma preocupação mundial dos reais riscos e benefícios da adição de probióticos nos produtos dietéticos para lactentes e crianças. Em 2004 a Sociedade Europeia de Gastroenterologia e Nutrição Pediátrica (SEGPN) posicionou-se a respeito da utilização de probióticos e prebióticos na dieta das crianças, enfatizando a importância de avaliar alguns aspectos antes da introdução desse tipo de alimentação suplementada: o momento mais adequado para iniciar de administração, visto que a microbiota do

recém-nascido não está bem estabelecida; o tempo de uso visto que não há estudos que avaliem riscos ou benefícios a longo prazo; e o tipo e dosagem do probiótico mais indicado, uma vez que não se pode generalizar resultados de estudos realizados com probióticos específicos para conjunto de cepas ou cepas ainda não estudadas. Além disso, estudos que avaliam o efeito de simbióticos (prebióticos + probióticos) não avaliam o real efeito do probiótico isolado(20).

Em 2011 o Comitê de Nutrição da Sociedade Europeia de Gastroenterologia Pediátrica, Hepatologia e Nutrição publicou uma revisão sistemática das evidências existentes comparando os efeitos da suplementação de fórmulas infantis com probióticos e/ou prebióticos às fórmulas não suplementadas correlacionando esses dados com a segurança e os impactos na saúde. Ao final, concluem que as fórmulas suplementadas não conferem riscos à saúde em relação aos efeitos adversos, mas que não há estudos suficientes até o momento para a recomendação do uso rotineiro dessas fórmulas suplementadas. Entretanto, o Comitê enfatiza a necessidade de mais pesquisas com estudos bem delineados a fim de esclarecer os reais benefícios deste tipo de suplementação, principalmente avaliando efeitos de uso a longo prazo(21).

Em 2012 a Sociedade Brasileira de Pediatria do Rio Grande do Sul através do Boletim Científico de Pediatria também posicionou-se em relação ao tema. Além das observações acima já citadas, a Sociedade relata que muitos estudos estão sendo realizados para esclarecer o real benefício na prática clínica da suplementação de probióticos, principalmente pelo fato de alguns estudos já demonstrarem que os probióticos também estão presentes no leite materno, considerado o “padrão ouro”(22).

1.5. Saúde baseada em evidências

Por muitos anos, as condutas clínicas das áreas da saúde baseavam-se principalmente em experiências pessoais, profissionais com maiores titulações eram considerados autoridades no assunto aliados as teorias fisiopatológicas. Com a evolução do conhecimento, essa prática foi perdendo valor, dando lugar a uma conduta clínica baseada em métodos e comprovações científicas. Surge então a Medicina Baseada em Evidências (MBE), e no caso das outras áreas da saúde, a Saúde Baseada em Evidências (SBE).

A prática da SBE implica não somente no conhecimento e experiências clínicas, mas também no conceito de definir uma questão de pesquisa (problema clínico), buscar, interpretar e avaliar criticamente as evidências disponíveis, identificar a aplicabilidade dos dados oriundo dos estudos a fim de utilizá-las na tomada de decisões na prática clínica e no final avaliar os resultados obtidos(23, 24). A competência clínica do profissional e as preferências do paciente são aspectos fundamentais para a tomada de decisão sobre a assistência à saúde(25).

A partir desta prática, alguns conceitos metodológicos devem ser levados em consideração a fim de avaliarmos se a informação fornecida é confiável e de boa qualidade. Os estudos são classificados segundo seu delineamento em uma escala de evidência. No topo da pirâmide, sendo consideradas com melhor grau de evidência, estão as meta-análises, logo abaixo os ensaios clínicos randomizados, os estudos de coorte contemporânea, as coortes históricas, os casos-controles (casos incidentes), os casos-controles (casos prevalentes), os estudos transversais e de prevalência, os estudos de casos ou série de casos, os estudos em animais e por último os estudos em vitro. Os

ensaios clínicos randomizados são considerados o “padrão ouro” para avaliar a evidência em relação às intervenções terapêuticas(26).

1.6. Revisões sistemáticas e Meta-análises

Uma revisão sistemática(27) é um tipo de pesquisa planejada para sumarizar estudos médicos, respondendo a uma questão clínica específica. Utiliza métodos apropriados para identificar, selecionar e avaliar criticamente os estudos, e também para analisar os dados destes estudos incluídos na revisão(28). Segundo Mulrow(29), profissionais da saúde, pesquisadores e outros responsáveis por políticas de saúde são frequentemente inundados com quantidades de informação nem sempre manejáveis, o que torna a revisão sistemática uma maneira eficiente de integrar a informação existente, gerando dados que auxiliem a tomada de decisões. Em uma revisão sistemática, os dados dos diferentes estudos podem ser quantitativamente combinados por métodos estatísticos. Estes aspectos estatísticos de uma revisão sistemática (cálculo das estimativas de efeito e variância, testes estatísticos de heterogeneidade e estimativas estatísticas de viés de publicação) são denominados Meta-análise. Assim como os demais estudos de investigação, a meta-análise é planejada e deve obedecer os critérios pré-estabelecidos através de um protocolo de pesquisa, o qual deve ser registrado em um site internacional de registro de revisões sistemáticas denominado PROSPERO (*International Prospective Register of Systematic Reviews*).

1.7. Diferenças entre Meta-análise convencional e Network meta-análise

As condutas clínicas na assistência à saúde não devem ser baseadas em resultado de estudos isolados. Desta forma, as meta-análises são consideradas as melhores

referências de evidência científica por serem capazes de sintetizar os resultados de vários estudos semelhantes relacionados a uma questão de pesquisa específica, além de permitir analisar as diferenças metodológicas e de resultados dos estudos, permitindo propor padrões que justifiquem as diferenças encontradas, permitindo uma ideia mais abrangente sobre qual será a melhor resposta a questão levantada.

Entretanto, também é importante citar as desvantagens das meta-análises, como por exemplo, o risco de viés de publicação. No meio científico, há a tendência de publicação apenas de estudos com resultados positivos, causando um erro sistemático no sentido de resultados positivos. Sendo assim, é fundamental que toda meta-análise apresente e interprete criticamente o gráfico em funil responsável pela demonstração desse viés de publicação. Outra grande limitação das meta-análises é a possibilidade de produzir uma estimativa-sumário que inicialmente parece ser bastante confiável quando, na verdade, se baseia em resultados de estudos de baixa qualidade. Para evitar esta problemática, é fundamental que os critérios de inclusão e exclusão dos estudos sejam estabelecidos rigorosamente e os resultados devem ser ajustados para potenciais confundidores(30). Para diminuir esse erro de variabilidade entre os estudos, toda meta-análise convencional deve apresentar a análise de um teste estatístico de heterogeneidade e análise de sensibilidade de cada estudo. O teste de heterogeneidade demonstrará se existe uma diferença significativa entre os estudos. Existindo tal diferença é recomendado realizar a análise de sensibilidade.

A meta-análise é uma técnica de investigação que seleciona estudos e extrai resultados por meio de procedimentos rigorosos. Os resultados são, então, resumidos através de análise estatística com o objetivo de diminuir a subjetividade dos métodos tradicionais de revisão narrativa. Assim, pode-se afirmar que a meta-análise é um estudo

observacional da evidência e que se baseia na aplicação do método estatístico a um estudo de revisão sistemática, que integra dois ou mais estudos primários(31).

Enquanto a meta-análise convencional sumariza as evidências a partir de dados de vários estudos semelhantes entre si, a meta-análise de network avalia cada intervenção individualmente, permitindo determinar o efeito de cada intervenção sobre as outras, e apresentando um ranking de efetividade entre as diferentes intervenções.

2. JUSTIFICATIVA

Entendo ser importante analisar sistematicamente o efeito dos probióticos no controle e tratamento de infecções respiratórias em crianças por ser uma importante questão de pesquisa associada à prática clínica, uma vez que as infecções respiratórias constituem um importante problema de saúde pública em todo o mundo. Além disso, as infecções respiratórias altas, embora em sua maioria de origem viral, são responsáveis pelo uso indiscriminado e muitas vezes inadequado de antimicrobianos em todo mundo, acarretando importantes consequências como riscos elevados de efeitos adversos, custos elevados de tratamento e desenvolvimento de resistência microbiana(6).

Suporta-se também a importância desta revisão uma vez que a utilização dos probióticos já é uma prática estabelecida atualmente através das fórmulas lácteas infantis suplementadas mesmo com ausência de evidências científicas suficientes para a recomendação e suporte de tal prática.

Pelo fato de não possuir nenhuma revisão sistemática relacionada a este assunto que avalie principalmente a utilização dos probióticos no tratamento de infecções do trato respiratório, e também por não possuir nenhuma revisão avaliando os probióticos na prevenção apenas nesta faixa etária considerada de risco, esta revisão sistemática e meta-análise é relevante pela possibilidade de auxiliar no esclarecimento dos reais efeitos dos probióticos nas infecções respiratórias a partir das evidências existentes até o momento.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo da revisão sistemática

Determinar o efeito do uso de probióticos na incidência de infecções do trato respiratório em crianças e adolescentes.

3.2. Objetivo da Meta-análise

Avaliar se houve redução da incidência de infecções do trato respiratórias em crianças e adolescentes pelo uso de probióticos.

4. METODOLOGIA

Esta revisão sistemática e meta-análise de network foi realizada de acordo com o PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analyses guidelines)(32).

O protocolo desta revisão sistemática e meta-análise foi registrado no site PROSPERO (International prospective register of systematic review). O número de registro é: CRD42014007632.

4.1. Estratégia de pesquisa

A primeira etapa da revisão sistemática foi realizar as buscas nas seguintes bases de dados nas seguintes datas: 24 de fevereiro de 2014 - MEDLINE (através do PUBMED), EMBASE, LILACS, SCIELO, CINAHL (através do EBSCO), SCOPUS (Elsevier). Nos três sites de registros online de Ensaios Clínicos: Cochrane Central Register of Controlled Trials (CENTRAL) ([Http://www.cochrane.org](http://www.cochrane.org)), Meta Register PF Controlles Trials ([http.controlled-trials.com/mrct](http://controlled-trials.com/mrct)) e National Institutes of Health ([HTTP://www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)) a busca foi realizada em 23 de março de 2014. Nesta mesma data, foi realizada uma busca nas listas de referências dos artigos em revistas impressas e nas citações de artigos da base de dados *ISI Web of Science*.

Foram revisados os títulos nas listas de referências dos artigos incluídos para incluir possíveis artigos relevantes. Foram incluídos todos os estudos publicados desde a data da criação da base de dados até Março de 2014. A pesquisa foi feita utilizando as seguintes combinações de palavras chaves com o operador booleano: "respiratory tract infections" AND probiotics. Foram incluídos todos os artigos sem restrição de linguagem.

Dois revisores (M.A.A e G.H.B.F.G) trabalharam independentemente conferindo todos os títulos e resumos para identificar os estudos que continham os critérios de inclusão, ou que deveriam ser excluídos por não se enquadrarem nos critérios pré-estabelecidos, sem avaliar o texto por completo. Inicialmente, títulos e resumos foram analisados de forma independente e, aqueles estudos que preenchiam os critérios de inclusão foram selecionados para leitura completa posteriormente. Divergências foram resolvidas por consenso entre os autores e, quando havia alguma discordância, um terceiro revisor era responsável pela decisão de entrada ou não do estudo para a revisão sistemática.

4.2. Critérios de elegibilidade

A revisão sistemática incluiu apenas ensaios clínicos randomizados avaliando o efeito do uso de probióticos no controle da incidência de infecções do trato respiratório (ITR), comparados ao grupo controle (placebo). Todos os estudos incluídos foram realizados em crianças e adolescentes de ambos os sexos, com idade entre 0 e 18 anos, saudáveis ou em risco de infecções respiratórias. Foram incluídos estudos em que o grupo intervenção utilizava apenas uma cepa de probiótico ou uma combinação de cepas de probióticos. Foram excluídos os estudos em que a intervenção era simbiótico (probiótico + prebiótico), estudos em que os participantes possuíam doenças crônicas ou comorbidades pré-existentes e estudos em que o tipo de probiótico não era especificado.

4.3. Desfechos

4.3.1. Primário

O desfecho primário foi infecções do trato respiratório (pneumonia OU infecções respiratórias superiores – faringite, laringite, epiglote, sinusite, otite – OU infecções respiratórias inferiores – traqueobronquite OU bronquite ou bronquiolite).

4.3.2. Secundário

O desfecho secundário foi a análise qualitativa dos efeitos adversos entre os participantes dos estudos incluídos.

4.4. Extração dos dados

De cada estudo incluído na revisão sistemática, foram extraídos os seguintes dados: título, jornal de publicação, autores, ano de publicação, delineamento do estudo, idade dos participantes, sexo dos participantes, número de participantes, se havia grupo controle, tipo de cepa do probiótico, dose administrada do probiótico, tempo de seguimento, desfecho e resultados.

4.5. Risco de viés dos estudos incluídos (RoB)

A qualidade e o risco de viés (RoB) dos estudos incluídos foram avaliados de acordo com os critérios estabelecidos no Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions(33) e a interpretação da qualidade da evidência foi realizada utilizando o sistema GRADE.

O sistema GRADE é um instrumento utilizado para auxiliar os pesquisadores a avaliar a qualidade da evidência e para a graduação da força de recomendação seguindo um paradigma muito importante hoje que é a prática clínica baseada em evidências, com

o objetivo de informar respectivamente o grau de confiança na evidência apresentada e a ênfase para que seja adotada ou rejeitada uma determinada conduta.

Devido ao grande volume de informações científicas geradas na área da saúde, assim como a variabilidade em sua qualidade, há necessidade de síntese que facilitem o acesso às mesmas, possibilitando conclusões baseadas nos resultados oriundos de múltiplas fontes, fornecendo subsídio científico para a tomada de decisão, tanto para o profissional de saúde quanto para o gestor. Nesse contexto, as revisões sistemáticas e meta-análises são importantes documentos no desenvolvimento das práticas baseadas em evidência contribuindo para a consistência da fundamentação de uma decisão clínica ou de saúde pública(34, 35).

Os critérios estabelecidos para a avaliação do GRADE utilizados nesta revisão sistemática foram: randomização, tipo de alocação, cegamento dos participantes, cegamento dos desfechos, dados incompletos, relatório dos dados, viés de interesse e perda de participantes durante o seguimento do estudo.

4.6. Apresentação dos dados e meta-análise

Primeiramente foi realizada uma meta-análise convencional para sintetizar os estudos comparando as diferentes intervenções com placebo. Os estudos foram combinados usando os modelos estatísticos de efeito fixo e efeito randômico. O número total de eventos foi avaliado pelo cálculo de densidade da incidência (razão pessoa/dia). Logo, os efeitos das intervenções foram apresentados na forma de risco relativo (RR).

Após a realização da meta-análise tradicional, foi realizada a meta-análise de network. A meta-análise de network difere da meta-análise tradicional principalmente pois usa informações através de todas as comparações disponíveis para estimar

evidências indiretas a partir de comparações não diretamente testadas. Por exemplo, em uma meta-análise tradicional, para comparar o efeito do tratamento A com o tratamento B, são incluídos apenas estudos contendo ambas análises diretas de A e B. Em contrapartida, na meta-análise de network, existe a possibilidade de usar informações de estudos comparando A com C e B com C, onde C é um tratamento comparador comum. Para isso, assumimos que o efeito de A comparado com B é estimado pela comparação do efeito do tratamento C mais o efeito do tratamento C comparado ao B(36). A meta-análise de network combina evidências diretas e indiretas através de uma rede de ensaios clínicos randomizados em um único tamanho de efeito, e sob certas hipóteses, pode aumentar a precisão das estimativas, respeitando a randomização. Enquanto a meta-análise tradicional avalia se um tratamento é mais eficiente ou não que um determinado comparador, a meta-análise de network, através da comparação indireta, a informação de cada tratamento em cada estudo – também chamada braço de estudo – é analisada separadamente para permitir que seja estimada a eficácia de um tratamento em relação ao outro(37).

Os dados da meta-análise, tanto tradicional quanto network, foram analisados utilizando o software R (R Language and Environment for Statistical Computing) na versão 3.1.2. O package “GeMTC” (disponível no site online: <http://CRAN.R-project.org/package=gemtc>) foi utilizado a fim de realizarmos os modelos de simulações de consistência e inconsistência, usando o método MCMC (Markov chain Monte Carlo methods).

A meta-análise de network foi realizada dentro de um modelo Bayesian, assumindo um parâmetro de heterogeneidade igual t em todas as comparações, induzindo correlações por estudos em multibraço. Para ajustar o modelo foram utilizadas uniformas não informativas e distribuições normais pré-estabelecidas com

três diferentes conjuntos de valores, produzindo 25.000 iterações, gerando posteriormente as distribuições dos parâmetros do modelo.

Nas comparações indiretas de tratamentos, o RR de cada intervenção é avaliado pela razão entre a variação dos resultados daquela intervenção e pela variação total dos estudos selecionados, e isto permite obter o RR de uma intervenção em relação a outra(37).

Foram estimadas relações com efeitos aleatórios de diferentes intervenções, e estes resultados foram apresentados através do RR (risco relativo) e CrI (intervalo de credibilidade) de 95%. A análise foi realizada utilizando o programa R com o código de programação JAGS (<https://sourceforge.net/projects/mcmc-jags>; <http://CRAN.R-project.org/package=rjags>; Sourceforge - <http://mcmc-jags.sourceforge.net>)(38)(<https://sourceforge.net/projects/mcmc-jags>; <http://CRAN.R-project.org/package=rjags>; Sourceforge - <http://mcmc-jags.sourceforge.net>)(38). O software é um ambiente de programação que permite a codificação de modelos Bayesianos.

Foi estabelecida uma probabilidade de efeito de cada tratamento, fornecendo um ranking classificatório do mais efetivo ao menos efetivo, através do cálculo do risco relativo do tratamento em comparação com um grupo comum arbitrário. Este ranking é gerado também pela proporção de iterações geradas pela cadeia de Markov no ranking de cada tratamento, do mais alto ao mais baixo risco relativo. Foi utilizado o modelo de efeitos aleatórios ao invés do modelo de efeitos fixos, pois é a análise mais adequada para explicar a diferença entre os estudos.

Para a análise estatística, separamos os estudos que utilizaram mistura de probióticos com o *Lactobacillus rhamnosus GG (LGG)*, chamando de MWL dos

estudos que utilizaram mistura de probióticos sem *Lactobacillus rhamnosus GG*, chamando de MOL. Esta pré-separação foi feita pois o LGG é uma das cepas probióticas de maior interesse no meio científico. *Lactobacillus rhamnosus GG* (ATCC 53103) é uma cepa de *Lactobacillus rhamnosus* isolada em 1983 do trato gastrointestinal de humanos saudáveis. Em 17 de abril de 1985, Sherwood Gorbach e Barry Goldin(39) entraram com pedido de patente deste probiótico. A patente refere-se a estirpe de “*L. acidophilus GG*”. A patente afirma que a cepa *L. rhamnosus GG* é ácida e bile-estável, tem uma grande atividade pelas células da mucosa intestinal humana, e produz ácido láctico(40). Desde sua descoberta, os benefícios da cepa LGG na saúde humana tem sido extensivamente estudada, sendo considerada a bactéria com maior número de pesquisas científicas no mundo, cerca de 800.

4.7. Análise de subgrupos

Foram realizadas análises de subgrupos a fim de avaliar o efeito de diferentes magnitudes das intervenções, desprezando o placebo, tal como um padrão de comparação.

4.8. Avaliação da heterogeneidade

A heterogeneidade entre os estudos incluídos na revisão sistemática foi avaliada de forma qualitativa considerando as seguintes diferenças entre os estudos: idade dos participantes e dose dos probióticos administrados.

5. RESULTADOS

5.1. Seleção dos estudos

A partir da busca padronizada encontramos 1517 artigos, dentre estes, 42 artigos eram duplicados. Dos 1465 artigos, os revisores avaliaram independentemente os títulos e os resumos, incluindo apenas 33 artigos para leitura na íntegra. Após leitura detalhada, 12 artigos foram excluídos pois não possuíam todos os critérios necessários para inclusão. Finalmente, 21 artigos foram incluídos na revisão sistemática. A **Figura 1** apresenta o fluxograma de estratégia de pesquisa e seleção dos estudos utilizado nesta revisão sistemática.

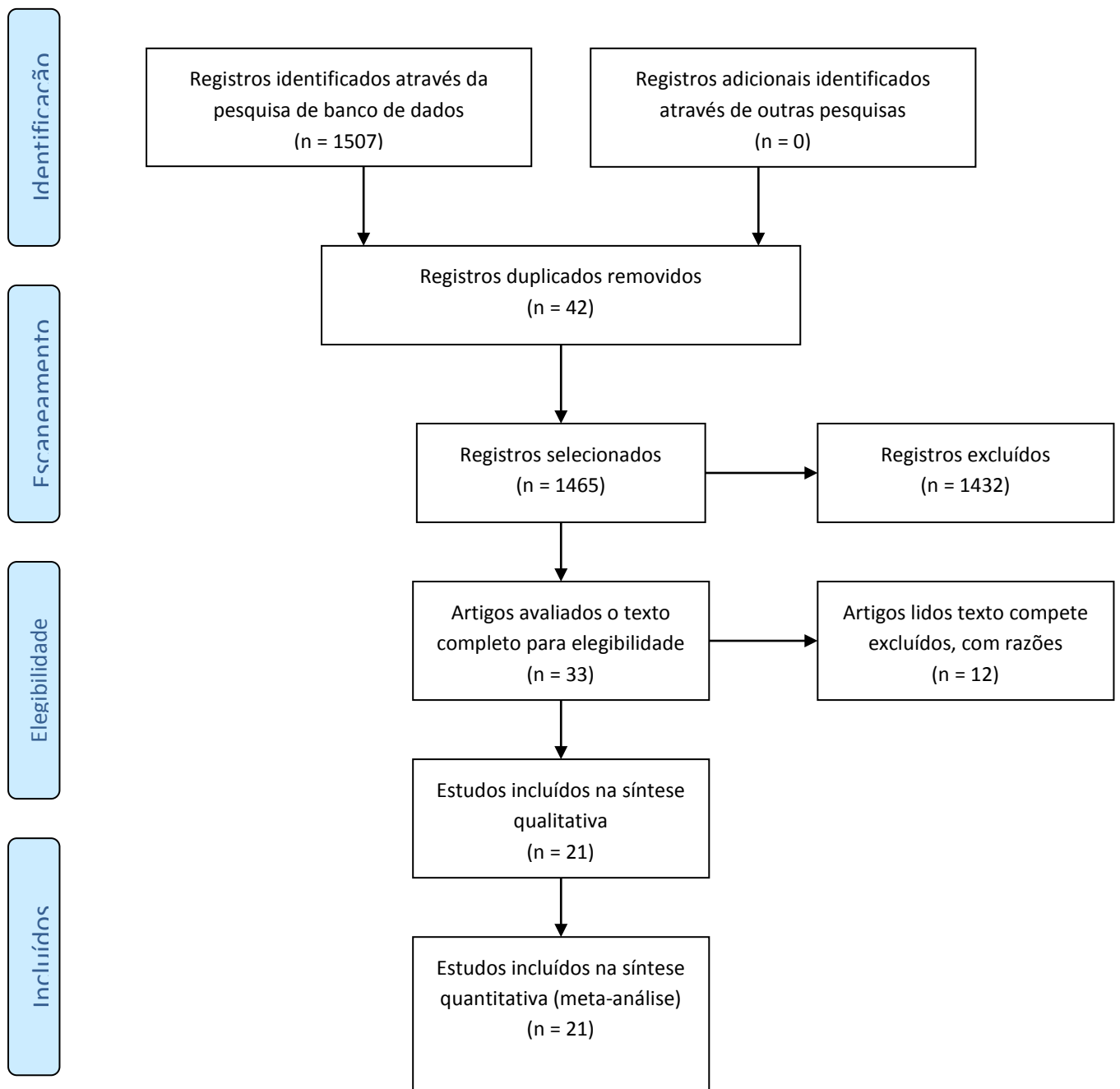


Figura 1. Fluxograma

5.2. Características dos estudos

A **tabela 1** apresenta as características de todos os estudos incluídos. Todos os estudos incluídos foram publicados até 2013.

5.2.1. Design

Todos os estudos incluídos foram ensaios clínicos randomizados que avaliaram o efeito do uso de probióticos na prevenção de infecções respiratórias em crianças e/ou adolescentes.

5.2.2. População

Foram incluídos nesta revisão vinte e um artigos, com um total de 6603 participantes, de ambos os sexos, com idade entre 0 e 18 anos. O tamanho amostral variou de 61 a 986 participantes. O estudo de Iva Hojsak, MD et al avaliou o efeito dos probióticos na redução do risco de pneumonia nosocomial em crianças prematuras, encontrando efeito benéfico(41). No entanto, o estudo foi interrompido antes de completar o tempo previsto de acompanhamento devido à falta de verbas de financiamento e perda substancial no recrutamento dos participantes.

Dentre as características dos participantes, treze estudos foram realizados em crianças e adolescentes saudáveis(42-54), cinco estudos foram realizados em crianças e adolescentes considerados em situações de risco (por frequentarem creches ou crianças/adolescentes hospitalizadas por outros motivos que não infecções respiratórias)(41, 55-58), e três estudos foram realizadas em crianças com infecções respiratórias para avaliar a recorrência de infecções(44, 59, 60).

5.2.3. Intervenção (colocar as referências conforme o artigo)

Os probióticos utilizados nos estudos incluídos na meta-análise foram: *Lactobacillus casei rhamnosus* (LCA), *Lactobacillus rhamnosus T cell-1* (RHT), *Lactobacillus reuteri* (LRE), *Bifidobacterium lactis* (BB-12), *Lactobacillus rhamnosus GG* (LGG), *Lactobacillus fermentum CECT5716* (LFC), *Streptococcus salivarius K12* (SSK), *Bacillus clausii* (BCL) e placebo (PLA). Alguns estudos utilizaram uma mistura de cepas de probióticos como intervenção. Quando a mistura de probióticos continha a cepa *Lactobacillus rhamnosus GG* utilizamos a sigla MWL, quando a mistura de probióticos não continha a cepa *Lactobacillus rhamnosus GG* utilizamos a sigla MOL. As siglas colocadas entre os parênteses foram criadas para codificar cada intervenção no programa estatístico.

Quinze estudos avaliaram o efeito de apenas uma cepa probiótica como intervenção(18, 19, 41, 43, 46, 47, 49-53, 55, 58-60), cinco estudos avaliaram o efeito de uma mistura de cepas probióticas como intervenção(44, 48, 54, 56, 57) e um estudo avaliou o efeito de cepas de probióticos isolados e mistura de probióticos(42). O estudo de Raakel Luoto et al mesmo avaliando o efeito de probióticos e prebióticos, foi incluído na meta-análise pois as duas intervenções foram avaliadas separadamente (dois grupos intervenção: grupo 1 recebeu probióticos, grupo 2 recebeu prebióticos e ambos os grupos foram comparados com placebo)(51).

Lactobacillus rhamnosus GG (LGG) foi o probiótico com maior prevalência entre os estudos incluídos na revisão sistemática, 11 estudos (52,38%), mas em apenas 7 destes estudos (33,33%) a cepa probiótica foi avaliada de forma isolada.

As rotas de administração utilizadas nos estudos incluídos foram cápsulas suplementadas com probiótico(42, 44, 61, 62), fórmula infantil suplementada com probiótico(19, 43, 46, 48, 51), leite suplementado com probiótico(18, 63), produto de

leite fermentado com probiótico(41, 50, 55, 64, 65), leite de vaca de baixa lactose com probiótico(47), chupetas contendo pastilhas de probióticos de lenta absorção(49, 66), balas de suspensão oleosa contendo probióticos(52), suspensão oral de probióticos(60). A dose de probióticos administrada variou entre os estudos e foi mensurada por *ufc (unidades formadoras de colônias)/dia*. O tempo de seguimento entre os estudos variou de 2 a 12 meses. Apenas um estudo teve seguimento menor, de apenas 15 dias de intervenção(62). Todas estas características estão apresentadas na **Tabela 1**.

5.2.4. Desfecho

Dezesseis estudos avaliaram infecções do trato respiratório em geral como desfecho principal(18, 19, 41-43, 46-51, 55, 60, 63-65), dentre eles, quatro estudos avaliaram infecções respiratórias mas especificaram a incidência de otite media aguda(46, 48, 49, 63); três estudos avaliaram apenas otite média como desfecho(44, 61, 66); e dois estudos avaliaram pneumonia como desfecho(52, 58)

Autor/ ano de publicação	Delineamento	Tamanho amostral	Idade	População	Intervenção/ Probiótico	Dosagem	Rota de administração	Tempo de acompanhamento
Jun-Song et al/ 2009(42)	ECR, duplo-cego, placebo-controlado	986	3 a 7 anos	Saudável	1. <i>Lactobacillus casei rhamnosus</i> 2. <i>Lactobacillus rhamnosus T cell-1</i> 3. <i>Mixture of probiotic without LGG</i>	1. 2×10^{-8} ufc/dia 2. 3×10^{-10} ufc/dia 3. 21×10^{-9} ufc/dia	Cápsulas de probióticos	7 meses
ZviWeizman et al/ 2005(43)	ECR, duplo-cego, placebo-controlado	194	4 a 10 meses	Saudável	<i>Bifidobacterium lactis (Bb- 12)</i> ou <i>Lactobacillus reuteri</i>	1×10^{-7} ufc/gramas de formula em pó	Fórmula láctea de vaca suplementada com probiótico	3 meses
KatjaHatakka et al/ 2001(18)	ECR, duplo-cego, placebo-controlado	571	1 a 6 anos	Saudável	<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i>	200ml leite com probiótico / dia : $5-10 \times 10^{-5}$ ufc/mL estirpe de probiótico	Leite suplementado com probiótico	7 meses
Jose Maldonado, et al/ 2012(19)	ECR, duplo-cego, placebo-controlado	188	6 a 8 anos	Saudável	<i>Lactobacillus fermentum CECT5716</i>	2×10^{-8} ufc/dia	Fórmula láctea de vaca suplementada com probiótico	6 meses
IvaHojsak,Natalija Snovak et al/ 2010(55)	ECR, duplo-cego, placebo-controlado	281	4 a 5 anos	Em risco (frequentam creches)	<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i>	1×10^{-9} ufc/dia	Produto lácteo fermentado suplementado com probiótico	3 meses
IvaHojsak, et al/ 2010(41)	ECR, duplo-cego, placebo-controlado	742	9 a 16 anos	Em risco (hospitalizado por outras razões que não ITR)	<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i>	1×10^{-9} ufc/dia	Produto lácteo fermentado suplementado com probiótico	Pacientes receberam a intervenção durante tempo de hospitalização
M Kumpu, et al/ 2012(46)	ECR, duplo-cego, placebo-controlado	523	2 a 6 anos	Saudável	<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i>	6.7×10^{-5} a 1.9×10^{-6} ufc/dia	Leite de vaca suplementado com probiótico	7 meses
Rina Agustina, et al/ 2012(47)	ECR, duplo-cego, placebo-controlado	494	1 a 6 anos	Saudável	Leite contendo quantidade regular de cálcio + <i>Lactobacillus casei</i> ou <i>Lactobacillus reuteri</i>	5×10^{-8} ufc/dia	Leite com baixa lactose suplementado com probiótico	6 meses
SamuliRautava,	ECR, duplo-	72	0 a 12	Saudável	Mistura de probióticos com LGG	1×10^{-9} e 1×10^{-10}	Leite de vaca	12 meses

et al/ 2009(48)	cego, placebo-controlado		meses		<i>(Lactobacillus rhamnosus GG + Bifidobacterium lactis Bb-12)</i>	ufc/dia	suplementado com probiótico	
KatjaHatakkaa, et al/ 2007(44)	ECR, duplo-cego, placebo-controlado	269	10 meses a 6 anos	Crianças com otite média aguda	Mistura de probióticos com LGG (<i>Lactobacillus rhamnosus GG + Lactobacillus rhamnosus LC 705 + Bifidobacterium Bb-99 + Propionibacterium freudenreichii sp. shermanii</i>)	8-9x10 ⁹ ufc/dia de cada probiótico	Cápsula de gelatina com probiótico	6 meses
D Merenstein, et al/ 2010(64)	ECR, duplo-cego, placebo-controlado	238	3 a 6 anos	Em risco (frequentam creches)	Mistura de probióticos sem LGG (<i>Lactobacillus casei DN-114 001/ CNCM I-1518 + Streptococcus thermophilus + Lactobacillus bulgaricus</i>)	1x10 ⁸ ufc/dia de cada probiótico	Bebida fermentada (Dan Active suplementada com probiótico)	3 meses
TeemuTaipale, et al/ 2011(49)	ECR, duplo-cego, placebo-controlado	69	0 a 8 meses	Saudável	<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis Bb-12 (BB-12)</i>	1x10 ⁷ ufc/dia	Tablete de probiótico via chupeta de liberação lenta	8 meses
J. M. ^a Cobo Sanz, et al/ 2006(50)	ECR, duplo-cego, placebo-controlado	251	3 a 12 anos	Saudável	<i>Lactobacillus casei (DN-114001)</i>	Não especificado	Actimel (leite fermentado suplementado com probiótico)	5 meses
RaakelLuoto, et al/ 2004(51)	ECR, duplo-cego, placebo-controlado	94	0 a 6 meses	Saudável	<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i>	1x10 ⁹ ufc/dia 1-30 dias e 2x10 ⁹ ufc/dia 31-60 dias	Leite de vaca suplementado com probiótico	12 meses
Mario A. Rojas, et al/ 2012(52)	ECR, duplo-cego, placebo-controlado	750	Prematuro nascido com peso (<1500 g a 1501-2000 g)	Saudável	<i>Lactobacillus reuteri</i>	1x10 ⁸ ufc/dia	Gotas de suspensão de óleo suplementado com probiótico	Tempo de intervenção não especificado
LiisaLehtoranta, et al/ 2012(61)	ECR, duplo-cego, placebo-controlado	269	9 meses a 5,6 anos	Em risco, propensos a ter otite	Mistura de probióticos com LGG (<i>Lactobacillus rhamnosus GG + L. rhamnosus LC705 + Bb-99 + P. freudenreichii JS</i>)	Não especificado	Cápsulas de probióticos	6 meses
Travis C. B.	ECR, duplo-	61	0 a 5 anos	Em risco	<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i>	10x10 ⁹ ufc/dia	Cápsulas de	14 dias

Honeycutt, MD, FAAP, FCCM; et al/ 2007(62)	cego, placebo-controlado			(hospitalizados por outras razões que não ITR)			probióticos	
MinnaKumpu, et al/ 2013(63)	ECR, duplo-cego, placebo-controlado	194	2 a 6 anos	Saudável	<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i>	10 ⁸ ufc/dia	Leite pasteurizado suplementado com probiótico	4 meses
Francesco Di Pierro, et al/ 2012(66)	ECR, placebo-controlado	78	3 a 12 anos	Com faringite e/ou and/ amigdalite (oral streptococci)	<i>Streptococcus salivarius K12 (Bactoblis)</i>	5x10 ⁹ ufc/dia	Comprimido de liberação lenta de probiótico	3 meses
Gian Luigi Marseglia, et al/ 2007(60)	ECR, duplo-cego, placebo-controlado	80	3 a 6 anos	Com infecções respiratórias recorrentes	<i>Bacillus clausii</i>	Suspensão de 2 milhões de esporos por 5ml	Suspensão oral de probióticos	3 meses
HILDE KLOSTER SMERUD, et al/ 2008	ECR, duplo-cego, placebo-controlado	199	12 a 36 meses	Saudável	Mistura de probióticos com LGG (<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i> + <i>Lactobacillus acidophilus LA-5</i> + <i>Bifidobacterium Bb-12</i>)	LGG e Bb-12: 10 ⁸ ufc/ml; LA-5: 10 ⁷ ufc/ml de	Active (bebida láctea fermentada) suplementada com probiótico	7 meses

Tabela 1. Características dos estudos incluídos

Subtítulos: *Lactobacillus casei rhamnosus (LCA)*; *Lactobacillus rhamnosus T cell-1 (RHT)*; *Lactobacillus reuteri (LRE)*; *Bifidobacterium lactis (BB-12)*; *Lactobacillus rhamnosus GG (LGG)*; *Lactobacillus fermentum CECT5716 (LFC)*; *Streptococcus salivarius K12 (SSK)*; *Bacillus clausii (BCL)*; *mistura de probióticos com LGG (MWL)*; *mistura de probióticos sem LGG (MOL)*; placebo (PLA); ensaio clínico randomizado (ECR); unidade formadora de colônia (ufc).

5.3. Risco de viés (RoB) dos estudos incluídos

O RoB dos estudos incluídos nesta meta-análise está sumarizado na **Figura 2** e **Figura 3**. Para avaliar o RoB foram utilizados os seguintes critérios: randomização, alocação dos participantes, cegamento dos participantes, cegamento dos desfechos, dados de resultados incompletos, relatório dos dados, presença de conflito de interesse e perda de participantes durante o tempo de seguimento do estudo.

5.3.1. Randomização

Todos os estudos incluídos na meta-análise aplicaram o correto processo de randomização. (**Figura 3**).

5.3.2. Alocação dos participantes

Dez dos vinte e um estudos avaliados (47,6%) reportaram adequados métodos para alocação dos participantes (baixo risco) e onze estudos (54,4%) não apresentaram informações claras de como foi realizada a alocação dos participantes (médio risco)(18, 42, 49-52, 55, 60-63, 65, 66)(**Figura 3**).

5.3.3. Cegamento

Dezoito dos vinte e um estudos incluídos na meta-análise (85,7%) reportaram métodos adequados para cegamento dos participantes (baixo risco), três estudos (14,3%) foram considerados “alto risco” por não utilizarem procedimentos adequados para cegamento dos participantes. Dezenove (90,5%) dos estudos relataram adequados métodos de cegamento dos pesquisadores que avaliaram os desfechos (baixo risco) e dois estudos (9,5%) foram considerados “alto risco” pois não aplicaram o cegamento adequado dos pesquisadores que avaliaram os desfechos(65, 66)(**Figura 3**).

5.3.4. Dados incompletos de resultados

Doze dos estudos incluídos na meta-análise (57,2%) foram considerados “baixo risco” pois apresentaram todos os dados necessários para a análise estatística. Sete dos estudos (33,3%) não descreveram claramente as informações necessárias para avaliar o efeito das intervenções (médio risco), enquanto dois estudos (9,5%) não apresentaram todas as informações necessárias para a análise estatística correta (alto risco)(42, 44)(Figura 3).

5.3.5. Relatório dos dados

Dez dos vinte e um estudos incluídos (47,6%) apresentaram todos os dados dos desfechos de interesse (baixo risco), dez estudos (47,6%) não descreveram claramente os dados dos desfechos de interesse (médio risco) e um estudo (4,8%) apresentou de forma incompleta os dados dos desfechos de interesse (elevado risco)(50) (Figura 3).

5.3.6. Viés de interesse

Em nove dos vinte e um estudos avaliados nesta meta-análise (42,9%) os autores declararam não possuir conflitos de interesse (baixo risco), enquanto em quatro estudos (19,05%) os autores não descreveram claramente se possuíam conflitos de interesse (médio risco) e em oito dos estudos incluídos nesta meta-análise (38,05%) os autores declararam possuir algum conflito de interesse na realização e publicação do estudo (alto risco)(42-44, 50, 51, 61, 64, 65)(Figura 3).

Dentre os conflitos de interesse declarados predominou o vínculo financeiro de pelo menos um dos autores com a empresa fornecedora do probiótico utilizado na intervenção.

5.3.7. Perda de participantes durante o tempo de seguimento

Dezenove dos vinte e um estudos incluídos nesta meta-análise (90,5%) relatou que não houve perda de participantes durante o tempo de seguimento do estudo (baixo risco) e dois estudos (9,5%) declararam ocorrer perda de participantes durante o tempo de seguimento do estudo (elevado risco), comprometendo a análise dos dados.(52, 66) (Figura 3).

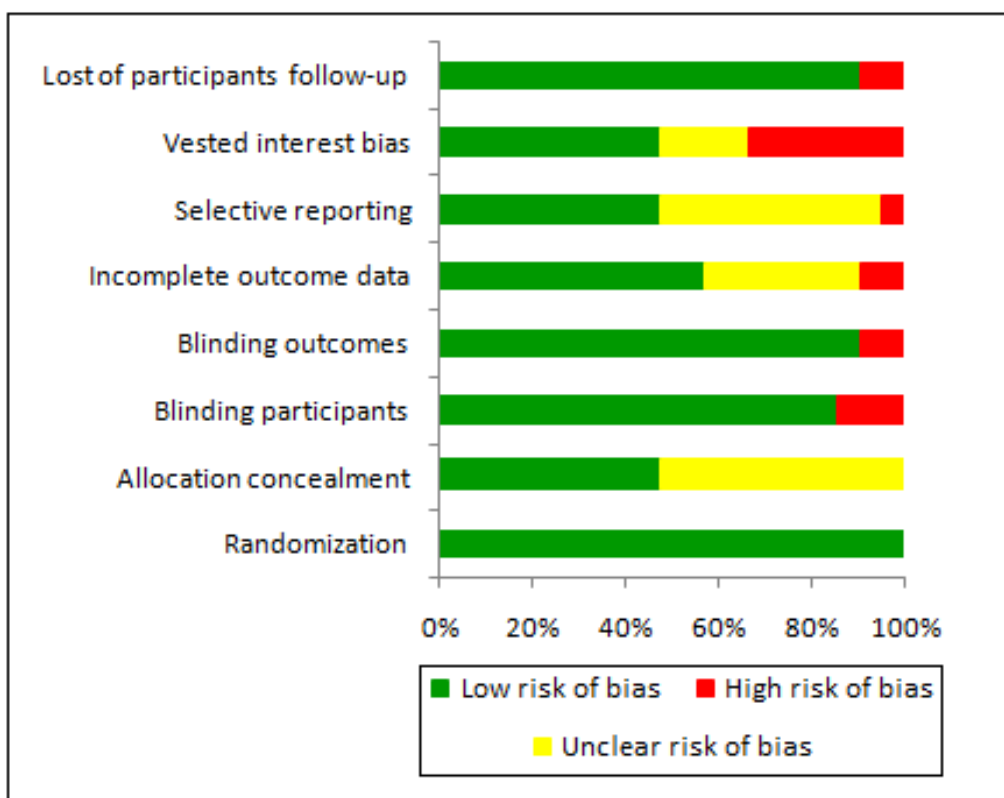


Figura 2. Gráfico de risco de viés: sentença de revisão dos autores sobre cada item de risco de viés, apresentados como porcentagens em todos os estudos incluídos na meta-análise.

	Randomization	Allocation concealment	Blinding participants	Blinding outcomes	Incomplete outcome data	Selective reporting	Vested interest bias	Lost of participants follow-up
Jun-Song 2009	+	?	+	+	-	?	-	+
Zvi Weizmanet 2005	+	+	+	+	+	+	-	+
Katja Hatakka 2001	+	?	+	+	+	?	+	+
Jose Maldonado 2012	+	+	+	+	+	?	+	+
Iva Hojsak and Natalija Snovak 2010	+	?	+	+	+	+	+	+
Iva Hojsak 2010	+	+	+	+	+	+	+	+
M Kumpu 2012	+	+	+	+	?	+	+	+
Rina Agustina 2012	+	+	+	+	+	+	?	+
Samuli Rautava 2009	+	+	+	+	+	+	+	+
Katja Hatakkaa 2007	+	+	+	+	-	?	-	+
D Merenstein 2010	+	+	+	+	?	+	-	+
Teemu Taipale 2011	+	?	+	+	+	?	+	+
J. M. ^a Cobo Sanz 2006	+	?	+	+	+	-	-	+
Raakel Luoto 2004	+	+	+	+	?	+	-	+
Mario A. Rojas 2012	+	+	+	+	+	?	?	-
Liisa Lehtoranta 2012	+	?	+	+	+	?	-	+
Travis C. B. Honeycutt 2007	+	?	+	+	?	+	+	+
Minna Kumpu 2013	+	?	+	+	?	?	?	+
Francesco Di Pierro 2012	+	?	-	-	+	+	+	-
Gian Luigi Marseglia 2007	+	?	-	+	?	?	?	+
Hilde Kloster Smerud 2008	+	?	-	-	?	?	-	+

Figura 3. Sumário do risco de viés: sentença de revisão dos autores sobre cada item do risco de viés para cada estudo incluído na meta-análise.

5.4. Efeito das intervenções

5.4.1. Principais desfechos avaliados

A taxa de densidade de incidência global de infecções respiratórias entre os 6603 participantes incluídos nesta meta-análise foi 4,81 por 1.000 episódios pessoas/dia no grupo intervenção e 5,76 por 1.000 episódios pessoa/dia no grupo placebo.

Embora o resultado indique que o número de participantes do grupo intervenção apresentou menor taxa de incidência de infecções respiratórias com o uso dos probióticos, comparado ao grupo placebo, devemos levar em consideração a heterogeneidade substancial existente entre os estudos incluídos nesta meta-análise, como a diferença entre o tamanho amostral de cada intervenção, a dosagem utilizada em cada intervenção, o tempo de seguimento de cada intervenção e a diferença etária entre os participantes.

5.4.2. Pairwise meta-análise/ meta-análise convencional (comparações diretas)

Primeiro foi realizada uma meta-análise convencional com os dados dos vinte e um estudos incluídos na revisão sistemática. A meta-análise convencional avalia, através de comparações diretas, o efeito das intervenções comparadas ao placebo. A **Figura 4** apresenta através do forest plot esta análise, mostrando o risco relativo e a probabilidade baseada no ranking com um intervalo de credibilidade de 95% de cada intervenção comparada ao placebo.

A análise convencional mostrou que o probiótico *Lactobacillus casei rhamosus* (LCA) reduziu a taxa de incidência das infecções respiratórias quando comparado ao grupo placebo (RR 0,38; CrI 0,19-0,45). Em contrapartida, as demais cepas de

probióticos não apresentaram nenhum efeito positivo sobre a taxa de incidência das infecções respiratórias em comparação com o placebo.

O efeito positivo do probióticos LCA foi apresentado a partir da análise de três dos vinte e um estudos incluídos nesta meta-análise(42, 47, 50). A idade dos participantes, o tempo de acompanhamento e a dose do probióticos administrada variou entre os três estudos. No estudo de Jung-Song et al (2009) os participantes incluídos possuíam de 3 a 7 anos de idade, o tempo de seguimento foi de 7 meses e a dose do probiótico administrada foi de $1,2 \times 10^8$ ufc/dia, através de cápsulas de probióticos LCA(42). No estudo de Rina Augustina et al (2012) os participantes incluídos possuíam de 1 a 6 anos de idade, o tempo de seguimento foi de 6 meses e a dose do probióticos administrada foi de 5×10^8 ufc/dia, através da ingestão de leite de baixa lactose suplementado com o probiótico LCA(47). No estudo de J.M. Cobo Sanz et al (2006) os participantes incluídos possuíam idade entre 3 e 12 anos, o tempo de seguimento foi de 5 dias, a dose do probióticos administrada não foi especificada no estudo, e a forma de administração do probiótico LCA foi através do produto Actimel (leite fermentado suplementado com probiótico)(50). Embora o *Lactobacillus casei rhamnosus* tenha apresentado efeito positivo na redução da incidência das infecções respiratórias, é preciso levar em consideração as diferenças apresentadas entre os estudos utilizados para esta análise.

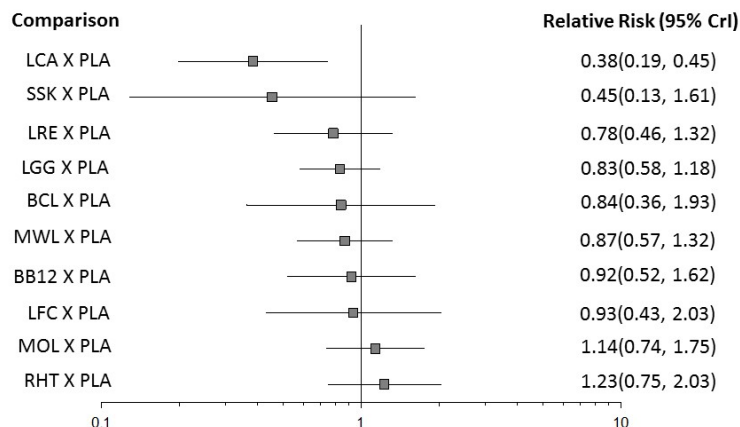


Figura 4. Forest plot de comparação de todos os probióticos vs. placebo

Subtítulos: *Lactobacillus casei rhamnosus (LCA)*; *Lactobacillus rhamnosus T cell-1 (RHT)*; *Lactobacillus reuteri (LRE)*; *Bifidobacterium lactis (BB-12)*; *Lactobacillus rhamnosus GG (LGG)*; *Lactobacillus fermentum CECT5716 (LFC)*; *Streptococcus salivarius K12 (SSK)*; *Bacillus clausii (BCL)*; *mistura de probióticos com LGG (MWL)*; *mistura de probióticos sem LGG (MOL)*; placebo (PLA).

5.4.3. Network meta-análise (combinação de comparações diretas e indiretas)

A base da análise da rede (network) foi realizada a partir dos dados dos vinte e um estudos incluídos na revisão sistemática, contendo dez cepas de probióticos diferentes mais o placebo. A rede de análise consiste de dez tratamentos com comparações diretas com placebo e cinco tratamentos com comparações indiretas, entre as diferentes cepas probióticas, exceto o placebo.

A **Figura 5** apresenta a geometria da meta-análise de network. As linhas inteiras representam as comparações diretas e as linhas pontilhadas representam as comparações indiretas. Como podemos analisar, cada uma das 10 diferentes intervenções faz

comparações diretas com o placebo, e as comparações indiretas são feitas entre RHT e MOL, MOL e LCA, LCA e LRE, LRE

Para realizar a meta-análise de network, três estudos com um total de 1731 participantes utilizaram o probiótico *Lactobacillus casei rhamnosus* (LCA) como intervenção(42, 47, 50), um estudo de 986 participantes utilizou o probiótico *Bacillus clausii* (BCL) como intervenção(60), dois estudos envolvendo 263 participantes utilizaram o probiótico *Bifidobacterium lactis* (BB-12) como intervenção(43, 49), um estudo de 78 participantes utilizou o probiótico *Streptococcus salivarius K12* (SSK) como intervenção(66), um estudo de 986 participantes utilizou o probiótico *Lactobacillus rhamnosus T cell-1* (RHT) como intervenção(42), um estudo envolvendo 188 participantes utilizou *Lactobacillus fermentum CECT5716* (LFC) como intervenção(19), sete estudos com total de 2466 participantes utilizaram o probiótico *Lactobacillus rhamnosus GG* (LGG) como intervenção(18, 41, 46, 51, 55, 58, 63), três estudos com total de 1438 participantes utilizaram o probiótico *Lactobacillus reuteri* (LRE) como intervenção(43, 47, 52), dois estudos com total de 1224 participantes utilizaram mistura de probióticos incluindo a cepa (MOL) como intervenção(42, 64), e quatro estudos com total de 610 participantes utilizaram mistura de probióticos sem a cepa LGG (MWL)(44, 48, 61, 65) como intervenção.

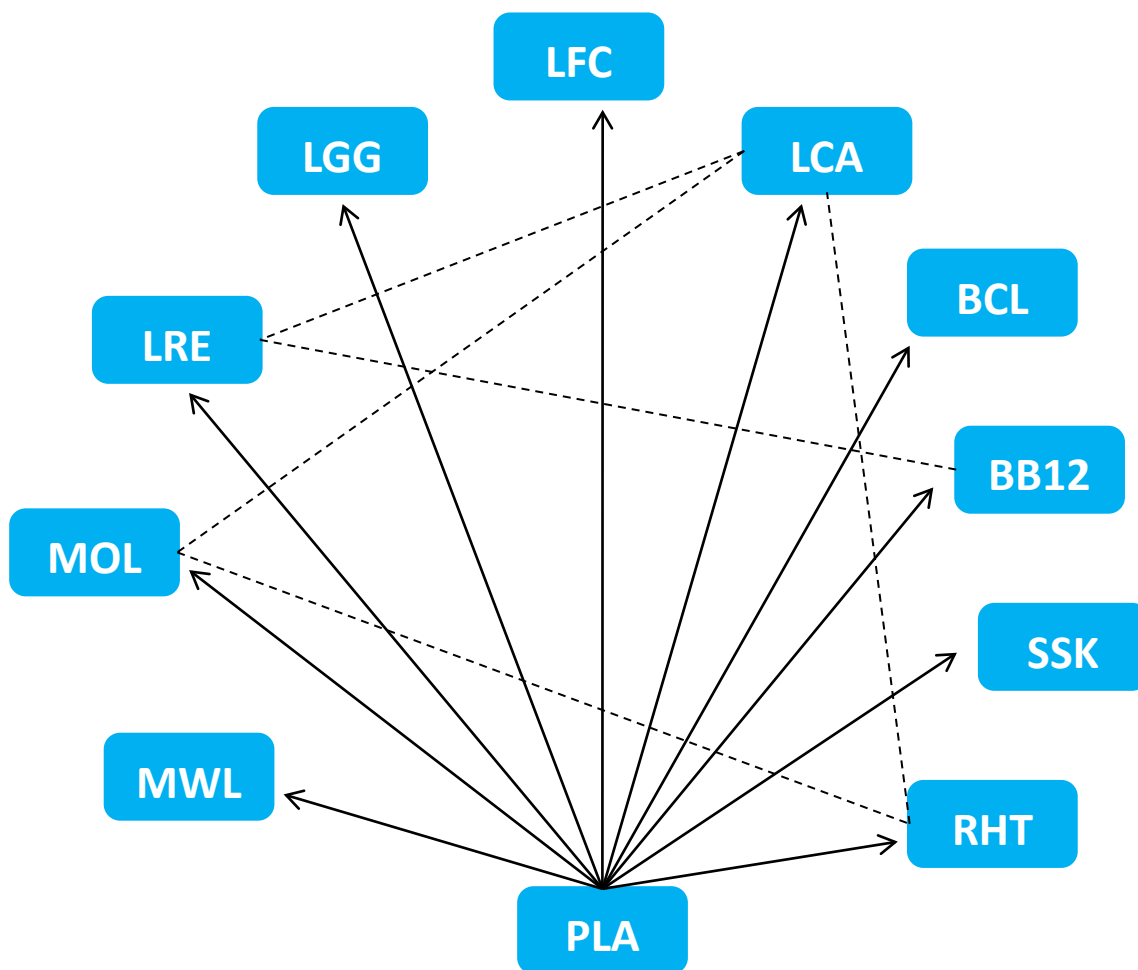


Figura 5. Geometria da network meta-análise

A **Figura 6** mostra o gráfico do ranking de efetividade de todos os tratamentos incluídos na análise de network, com intervalo de credibilidade de 95%. O rankograma ilustra a probabilidade de classificação de cada tratamento, estabelecendo um ranking do mais efetivo para o menos efetivo. Analisando o gráfico, o probiótico *Lactobacillus casei rhamnosus* (LCA) ficou classificado em primeiro lugar com uma probabilidade de 54,7%. Seguindo a ordem, o *Streptococcus salivarius K12* (SSK) também ficou classificado em primeiro lugar porém com uma probabilidade menor comparado ao LCA, de 35,4%; o *Lactobacillus reuteri* (LRE) com uma probabilidade de 19,7% ficou em terceiro lugar, juntamente com o *Bacillus clausii* (BCL) que também ficou em terceiro porém com uma probabilidade menor, de 13,6%; o *Lactobacillus rhamnosus GG*

(LGG) com probabilidade de 20,2% classificou-se em quinto lugar, enquanto a mistura contendo LGG (MWL) ficou em quinto lugar com probabilidade de 16,7%; o placebo com probabilidade de 28,6% ficou em oitavo na classificação; o *Bifidobacterium lactis* (BB-12) com probabilidade de 12,8% ficou em nono lugar na classificação; o *Lactobacillus rhamnosus T cell-1* (RHT) com probabilidade de 44,7% ficou em décimo-primeiro lugar, enquanto o *Lactobacillus fermentum CECT5716* (LFC) também ficou classificado em décimo-primeiro lugar de efetividade, porém com a probabilidade menor de 15,3%.

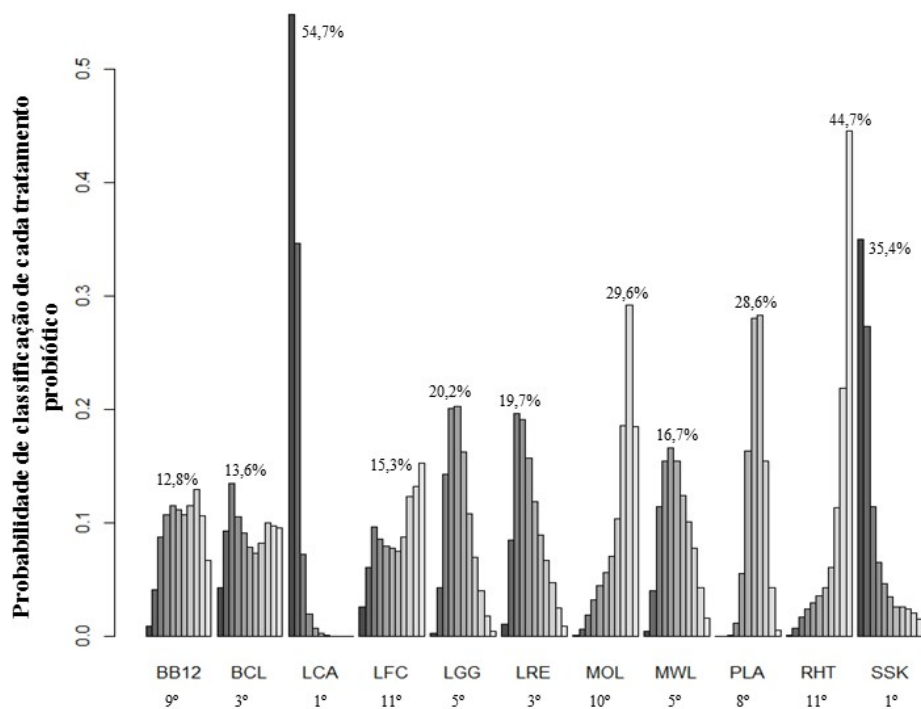


Figure 6. Sobre os eixos horizontais estão as possibilidades de categorias de classificação e sobre os eixos estão as probabilidades de cada tratamento alcançar cada classificação.

Figura 6. Rankograma dos tratamentos probióticos para infecções respiratórias

5.5. Análise de subgrupos

A partir da classificação do ranking de efetividade, foram realizadas algumas análises de subgrupos a fim de avaliarmos se há efeito positivo de algum probiótico sobre outro, incluindo a mistura de probióticos com LGG e a mistura de probióticos sem LGG.

Como o *Lactobacillus casei rhamnosus* (LCA) ficou classificado em primeiro lugar no ranking de efetividade, decidimos realizar a análise indireta do LCA contra todas as outras cepas probióticas. A **Figura 7** mostra o efeito do *Lactobacillus casei rhamnosus* (LCA) probiótico comparado a outros probióticos. O *Lactobacillus casei rhamnosus* não demonstrou melhor efeito em comparação às outras cepas de probióticos pela combinação de análises diretas e indiretas. Conforme descrito anteriormente, vimos este efeito positivo apenas quando comparado diretamente ao placebo.

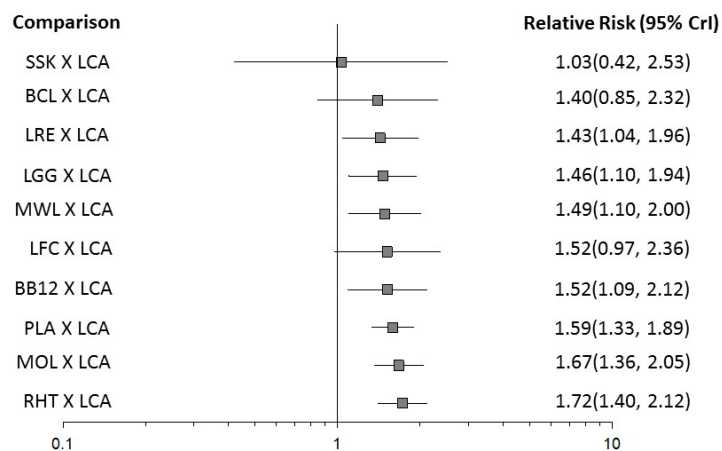


Figura 7. Forest plot de comparação do LCA vs. todos os probióticos.

Subtítulos: *Lactobacillus casei rhamnosus (LCA)*; *Lactobacillus rhamnosus T cell-1 (RHT)*; *Lactobacillus reuteri (LRE)*; *Bifidobacterium lactis (BB-12)*; *Lactobacillus rhamnosus GG (LGG)*; *Lactobacillus fermentum CECT5716 (LFC)*; *Streptococcus salivarius K12 (SSK)*; *Bacillus clausii (BCL)*; *mistura de probióticos com LGG (MWL)*; *mistura de probióticos sem LGG (MOL)*; placebo (PLA).

Pelo fato do *Lactobacillus rhamnosus GG (LGG)* ser uma das cepas probióticas mais estudadas no meio científico, decidimos realizar a análise de efeito dele isoladamente comparado às demais cepas probióticas. Conforme apresentado na **Figura 8**, podemos ver que o LGG não apresentou melhor efeito em relação aos demais probióticos na redução da incidência das infecções respiratórias em crianças e adolescentes.

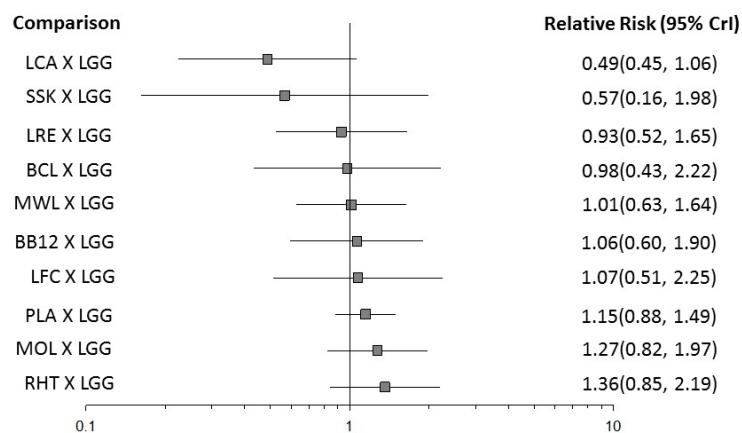


Figura 8. Forest plot de comparação do LGG vs. todos os probióticos

Subtítulos: *Lactobacillus casei rhamnosus (LCA)*; *Lactobacillus rhamnosus T cell-1 (RHT)*; *Lactobacillus reuteri (LRE)*; *Bifidobacterium lactis (BB-12)*; *Lactobacillus rhamnosus GG (LGG)*; *Lactobacillus fermentum CECT5716 (LFC)*; *Streptococcus salivarius K12 (SSK)*; *Bacillus clausii (BCL)*; *mistura de probióticos com LGG (MWL)*; *mistura de probióticos sem LGG (MOL)*; placebo (PLA).

Neste mesmo contexto, resolvermos fazer a análise de comparação entre a mistura de probióticos contendo LGG (MWL) com os demais probióticos. Esta análise foi realizada principalmente para avaliarmos se havia diferença entre utilizar uma mistura de probióticos com LGG (MWL) e mistura de probióticos sem LGG (MOL). Na **Figura 9** podemos ver o resultado dessas análises, e avaliando detalhadamente observamos que não há diferença na suplementação de apenas uma mistura de probióticos e uma mistura de probióticos contendo LGG. Desta maneira, avaliando criticamente, juntamente com a análise isolada do LGG contra os demais probióticos podemos ver que a utilização do LGG tanto sozinho quanto em conjunto com demais probióticos não possui efeito positivo na redução da incidência de infecções respiratórias em crianças e adolescentes.

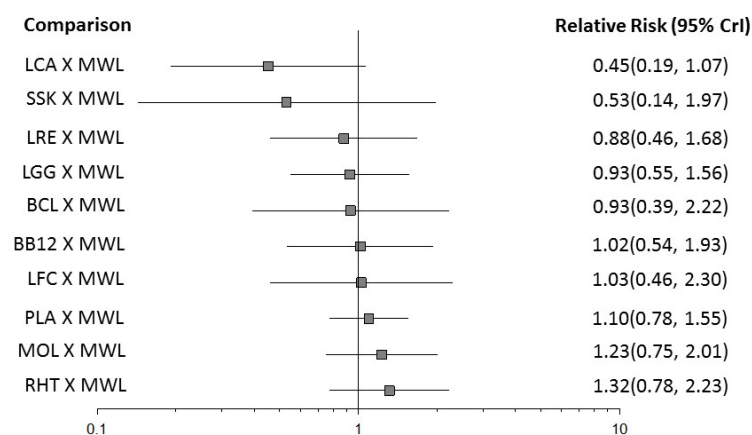


Figura 9. Forest plot de comparação do MWL vs. todos os probióticos.

Subtitles: *Lactobacillus casei rhamnosus (LCA)*; *Lactobacillus rhamnosus T cell-1 (RHT)*; *Lactobacillus reuteri (LRE)*; *Bifidobacterium lactis (BB-12)*; *Lactobacillus rhamnosus GG (LGG)*; *Lactobacillus fermentum CECT5716 (LFC)*; *Streptococcus salivarius K12 (SSK)*; *Bacillus clausii (BCL)*; *mistura de probióticos com LGG (MWL)*; *mistura de probióticos sem LGG (MOL)*; placebo (PLA).

5.6. Desfechos secundários

Os desfechos secundários avaliados foram a presença de efeitos adversos resultantes da suplementação com probióticos. Avaliados de forma qualitativa, todos os estudos incluídos nesta meta-análise não apresentaram efeitos adversos significativos entre os participantes.

5.7. Viés de publicação

O viés de publicação foi avaliado a partir do Funnel plot representado na **Figura 10**. Ao analisarmos a figura podemos observar que não haver risco de viés de publicação.

Funnel Plot do erro padrão por Fisher's Z

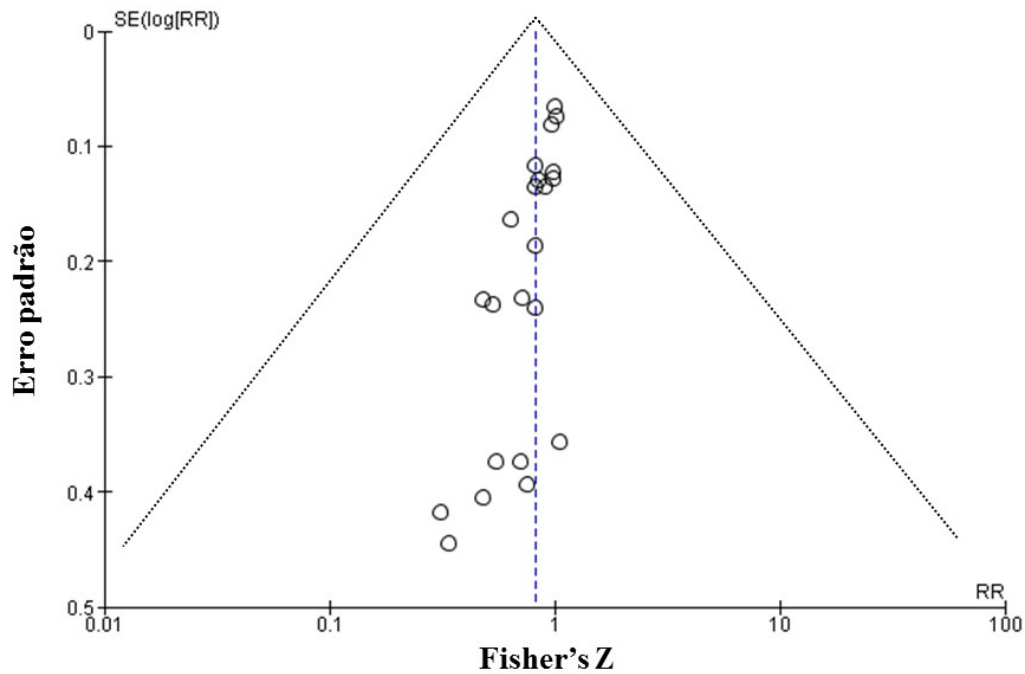


Figura 10. Funnel Plot

Funnel plot de todos os estudos incluídos na revisão sistemática. No eixo horizontal, as diferenças entre os riscos de log-relativas observadas de cada tratamento ativo versus placebo e o sua síntese de efeito obtido a partir de meta-análise são apresentados aos pares; no eixo vertical são apresentados os erros padrões dos riscos de log-relativa. Diferenças à esquerda do nulo representam estudos com estimativas maiores do que a comparação média específica.

6. DISCUSSÃO

O papel da alimentação equilibrada na manutenção da saúde tem despertado interesse pela comunidade científica que tem produzido inúmeros estudos com o intuito de comprovar a atuação de alguns alimentos na redução de riscos de certas doenças, além do considerável interesse em incentivar as pesquisas de novos componentes naturais e o desenvolvimento de novos ingredientes, possibilitando a inovação em produtos alimentícios e a criação de novos nichos de mercado para estes ingredientes(45, 67). A evolução dos conhecimentos sobre o papel dos componentes fisiologicamente ativos dos alimentos, de fontes vegetais e animais tem mudado o entendimento do papel da dieta sobre a saúde(68). Este fato tem aumentado o interesse mundial para melhorar a qualidade da nutrição e reduzir os gastos com saúde por meio da prevenção de doenças crônicas, da melhoria da qualidade e da expectativa de vida ativa(69). Segundo Moraes e Colla 2006(70), inúmeros fatores influenciam a qualidade da vida moderna, levando a população a conscientizar-se da importância de alimentos contendo substâncias que auxiliam a promoção da saúde, melhorando o estado nutricional. A incidência de morte provocada por câncer, acidente vascular cerebral, aterosclerose, enfermidade hepática, doença infecciosa, dentre outros, pode ser minimizada por meio de bons hábitos alimentares.

Os probióticos parecem ser agentes interessantes no campo da nutrição preventiva e curativa. O interesse pelos efeitos benéficos à saúde humana proporcionado especialmente por bactérias ou leveduras viáveis tem provocado um aumento mundial na comercialização de produtos que contenham estes microrganismos(45).

O uso mais comum de microrganismos probióticos tem sido em produtos lácteos - leites fermentados, iogurtes, sorvetes e queijos. E sua viabilidade neste tipo de produto

pode ser afetada por vários fatores como a produção de ácido láctico e peróxido de hidrogênio por fermentos tradicionais, presença de oxigênio, assim como interações entre cepas presentes e a concentração de açúcar(71, 72).

Muitos estudos clínicos têm investigado o uso de probióticos em casos de infecções do trato gastrodigestório e condições inflamatórias. Evidências demonstram que estirpes específicas selecionadas da microbiota intestinal saudável exibem poderosas capacidades antipatogênicas e anti-inflamatórias e são conseqüentemente envolvidas na modulação da microbiota intestinal(73).

O efeito dos probióticos no sistema imune tem também sido objeto de numerosos estudos há mais de 20 anos. Certas linhagens de Bactérias do Ácido Láctico são capazes de estimular, bem como regular, vários aspectos das respostas imune natural e adquirida(74, 75).

Diversas evidências têm demonstrado que o consumo de quantidades adequadas, de cepas apropriadas de bactérias lácticas (incluindo bactérias lácticas não-probióticas como *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*) é capaz de aliviar os sintomas de intolerância à lactose(76, 77).

Lactobacilos e bifidobactérias estão relacionados com a redução do risco de alergias de origem alimentar. Estas bactérias são capazes de induzir a quebra de proteínas com potencial alergênico no trato gastrintestinal, processo que pode contribuir para a redução da alergenicidade de proteínas(78).

No campo das infecções respiratórias, muitos estudos têm sido realizados a fim de verificar o real efeito dos probióticos nas infecções respiratórias. Entretanto, seu papel na prevenção de infecções respiratórias ainda não é claro, uma vez que os ensaios

existentes diferem muito em relação às populações, aos tipos e dosagem das diferentes cepas probióticas utilizadas, além da variação no tempo de seguimento.

A mais recente revisão sistemática e meta-análise publicada em 2011 pela The Cochrane Collaboration com o título “Probiotics for preventing acute upper respiratory tract infections” avaliou o efeito dos probióticos na prevenção de infecções respiratórias em crianças e adultos de todas as idades a partir da análise de quatorze ensaios clínicos randomizados. Os autores concluíram que a suplementação de probióticos foi benéfica na redução no número de participantes com episódios de infecções respiratórias superiores agudas, na incidência de episódios e na redução do uso de antibióticos, quando comparado ao placebo, esclarecendo a limitação quanto a dados referentes à pessoas idosas(79). No entanto, além da diferença entre a faixa etária dos participantes incluídos nesta meta-análise em comparação à que realizamos, esta meta-análise foi realizada no método tradicional, avaliando apenas o efeito das intervenções entre os estudos.

O estudo aqui realizado foi uma meta-análise de network, onde ao invés de avaliarmos o efeito dos probióticos entre os diferentes estudos, avaliamos o efeito de cada diferente tipo de probióticos contra o placebo e contra todos. Esta análise em rede, realizada a partir de comparações diretas e indiretas fornece um maior poder de efeito das intervenções comparada a meta-análise tradicional, além de facilitar a interpretação clínica pela classificação do ranking de efetividade.

Em nossas análises, a suplementação com o probióticos *Lactobacillus casei rhamnosus* (LCA) parece ser eficaz na redução da incidência de infecções respiratórias; no entanto, esta conclusão deve ser avaliada com cautela uma vez que os três ensaios

clínicos utilizados para a realização das análises possuem heterogeneidade em relação a idade dos participantes e a dose do probióticos administrada.

O *Lactobacillus rhamnosus GG* (ATCC 53103) é uma cepa de *L. rhamnosus* isolado em 1983 a partir do trato intestinal de um ser humano saudável e para o qual a patente foi arquivada em 17 de abril de 1985 por Sherwood Gorbach e Barry Goldin(39). A patente refere-se a uma estirpe de “*L. acidophilus GG*”. O pesquisador alega que a cepa *L. rhamnosus GG* é ácido e bile-estável, tem grande avidéz por células da mucosa intestinal humana e produz ácido láctico(40). Desde a sua descoberta, a cepa *L. rhamnosus GG* tem sido extensivamente estudada em termos de seus vários benefícios à saúde e é atualmente a bactéria mais estudada no mundo, com mais de 800 publicações.

Em 2013 foi publicada uma revisão sistemática e meta-análise chamada “*Lactobacillus rhamnosus GG* supplementation for preventing respiratory infections in children: a meta-analysis of randomized, placebo-controlled trials”. Esta meta-análise realizada a partir de quatro ensaios clínicos randomizados mostrou que a administração do probiótico *Lactobacillus rhamnosus GG* em comparação com o placebo teve potencial redução na taxa de incidência de otite média aguda, infecções respiratórias superiores e uso de antibióticos em crianças(13). No entanto, a nossa análise não confirmou esta hipótese. No ranking de efetividade o *Lactobacillus rhamnosus GG* (LGG) ficou classificado em quinto lugar. As análises indiretas realizadas para comparar o efeito do LGG com outros probióticos mostra que não houve melhor efeito na redução da incidência de infecções respiratórias. Além disso, a comparação entre o probiótico LGG isolado e a mistura de probióticos contendo LGG também não apresentou diferença de efeito. Isso sugere que não há evidências suficientes que sugiram maior efeito do LGG quando combinado às outras cepas probióticas.

Devido à popularidade científica do LGG, decidimos fazer a separação dos estudos que utilizaram como intervenção mistura de probióticos contendo LGG (MWL) daqueles estudos que utilizaram como intervenção mistura de probióticos sem a presença de LGG (MOL), a fim de avaliarmos se o LGG fazia diferença no efeito em relação ao desfecho. Apesar do probiótico LGG ser o mais investigado na literatura, com sete estudos incluídos na nossa meta-análise, não foi encontrada eficácia para redução da incidência de infecções respiratórias em crianças e adolescentes. Assim como a meta-análise publicada em 2013 pela Cochrane Collaboration encontrou falta de evidência para suportar o uso de probióticos na redução da diarreia persistente em crianças(80), nossa análise estatística também demonstrou esta falta de evidência para apoiar o uso de probióticos na prevenção de infecções respiratórias em crianças e adolescentes.

A partir da revisão de bases científicas, esta é a primeira revisão sistemática que investiga a eficácia da suplementação de probióticos de forma específica na prevenção de infecções respiratórias em crianças e adolescentes a partir de análise de network, permitindo avaliar o efeito isolado de cada intervenção além da avaliação entre as intervenções. A meta-análise de network é um processo de revisão rigoroso por seguir os reconhecidos padrões internacionais da Cochrane Collaboration (Cochrane and Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analysis guidelines).

Uma das possíveis limitações deste estudo é o potencial viés de publicação parcialmente suportado pelo contour-enhance do funnel plot, que deve ser sempre levado em consideração. Além disso, não podemos deixar de citar o fato desta meta-análise incluir apenas estudos com faixa etária entre 0 e 18 anos, desta forma, não podemos generalizar para populações de adultos e idosos.

7. CONCLUSÃO

Os resultados da análise de network mostram que apenas o probiótico *Lactobacillus casei rhamnosus* (LCA) foi superior ao placebo em relação a diminuição da taxa de incidência de infecções respiratórias, ficando classificado em primeiro lugar no ranking de efetividade entre todas as cepas probióticas avaliadas nesta meta-análise. No entanto, é importante levar em consideração que a análise deste efeito foi realizada a partir de dados de apenas três estudos, com diferenças quando a dosagem do probiótico administrada entre eles.

De acordo com os vinte e um estudos incluídos nesta meta-análise, os probióticos são intervenções seguras para administrar na faixa etária estudada, não apresentando efeitos adversos significativos.

A partir dos dados da análise, esta revisão sistemática e meta-análise de network fornece o consenso de que não há evidências suficientes para apoiar o uso geral de probióticos, tanto na forma de cepa individual quanto mistura de cepas probióticas, na prevenção de infecções respiratórias em crianças e adolescentes. São necessários ensaios clínicos com tamanho amostral maior e heterogeneidade entre eles, rigorosamente delineados para avaliar com maior precisão a eficácia dos probióticos para este desfecho.

8. REFERÊNCIAS

1. Mulholland K. Global burden of acute respiratory infections in children: implications for interventions. *Pediatr Pulmonol.* 2003;36(6):469-74. Epub 2003/11/18.
2. Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Black RE. WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet.* 2005;365(9465):1147-52. Epub 2005/03/30.
3. World Health Statistics 2013. 2013:1-168.
4. Silva Jr Jeg, Brito,S.M. F., Quito,M., Henriques,C.M.P., Malta, D.C., Vaz,C.A., Duarte,E., De Lima, E., Coelho, M.R., Mesquita,F., Brasilino, C.E.F. Boletim Epidemiológico - Influenza: monitoramento até a semana epidemiológica 29 de 2013. 2013;44 nº15:2-9.
5. Aranha LAc, Correa,L.(coordenador), Costa,M.M.M., Eid,R.C., Silva,C.V., Caruso,P., Verdeal,J.C.R., Assunção,M.S.C., Fernandes,A.T., Grinbaum,R.S., Fu,C., Medeiros,E.A.S., Dos Santos,J.N.C. TRATO RESPIRATÓRIO: Critérios Nacionais de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde. In: Saúde AANdVS-UdlePdledEAGGdTeSd, editor. 2009. p. 1-34.
6. Wannmacher L. Evidências sobre uso de antibacterianos nas infecções respiratórias altas. Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde-Brasil. 2006.
7. Arroll B, Kenealy T. Are antibiotics effective for acute purulent rhinitis? Systematic review and meta-analysis of placebo controlled randomised trials. *BMJ.* 2006;333(7562):279. Epub 2006/07/25.
8. Smith SM, Fahey T, Smucny J, Becker LA. Antibiotics for acute bronchitis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2004;4.
9. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria: Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. 2001:1-34.
10. Thomas DW, Greer FR. Probiotics and prebiotics in pediatrics. *Pediatrics.* 2010;126(6):1217-31.
11. Joint F. WHO Expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, Argentina October. 2001:1-4.
12. Sanders ME, Gibson G, Gill H, Guarner F. Probiotics: their potential to impact human health. Council for Agricultural Science and Technology Issue Paper. 2007;36:1-20.
13. Liu S, Hu P, Du X, Zhou T, Pei X. Lactobacillus rhamnosus GG supplementation for preventing respiratory infections in children: a meta-analysis of randomized, placebo-controlled trials. *Indian pediatrics.* 2013;50(4):377-81. Epub 2013/05/15.
14. Vouloumanou EK, Makris GC, Karageorgopoulos DE, Falagas ME. Probiotics for the prevention of respiratory tract infections: a systematic review. *International journal of antimicrobial agents.* 2009;34(3):197. e1-. e10.
15. Rijkers GT, Bengmark S, Enck P, Haller D, Herz U, Kalliomaki M, et al. Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: current status and recommendations for future research. *J Nutr.* 2010;140(3):671S-6S. Epub 2010/02/05.
16. Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2002;82(1-4):279-89. Epub 2002/10/09.
17. Kalliomaki M, Isolauri E. Role of intestinal flora in the development of allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2003;3(1):15-20. Epub 2003/02/13.
18. Hatakka K, Savilahti E, Ponka A, Meurman JH, Poussa T, Nase L, et al. Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: double blind, randomised trial. *BMJ.* 2001;322(7298):1327. Epub 2001/06/02.
19. Maldonado J, Canabate F, Sempere L, Vela F, Sanchez AR, Narbona E, et al. Human milk probiotic Lactobacillus fermentum CECT5716 reduces the incidence of gastrointestinal and

upper respiratory tract infections in infants. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2012;54(1):55-61. Epub 2011/08/30.

20. Agostoni C, Axelsson I, Braegger C, Goulet O, Koletzko B, Michaelsen KF, et al. Probiotic bacteria in dietetic products for infants: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2004;38(4):365-74.

21. Braegger C, Chmielewska A, Decsi T, Kolacek S, Mihatsch W, Moreno L, et al. Supplementation of infant formula with probiotics and/or prebiotics: a systematic review and comment by the ESPGHAN committee on nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2011;52(2):238-50.

22. Kunz C, Rodriguez-Palmero M, Koletzko B, Jensen R. Nutritional and biochemical properties of human milk, Part I: General aspects, proteins, and carbohydrates. *Clinics in perinatology*. 1999;26(2):307-33.

23. Stotts NA. Evidence-based practice: what is it and how is it used in wound care? *The Nursing clinics of North America*. 1999;34(4):955-63, vii-viii.

24. Galvão CM, Sawada NO, Mendes IAC. A busca das melhores evidências. *Rev Esc Enferm USP*. 2003;37(4):43-50.

25. GALVÃO C. A prática baseada em evidências: uma contribuição para a melhoria da assistência de enfermagem perioperatória. 2002.114 f: Tese (Livre-Docência)-Escola de Enfermagem, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto; 2002.

26. Atkins D, Eccles M, Flottorp S, Guyatt GH, Henry D, Hill S, et al. Systems for grading the quality of evidence and the strength of recommendations I: critical appraisal of existing approaches The GRADE Working Group. *BMC health services research*. 2004;4(1):38.

27. Atallah AN. Systematic reviews of medical literature and meta-analyses. *Sao Paulo medical journal = Revista paulista de medicina*. 1996;114(5):1285-7. Epub 1996/09/01.

28. Akobeng AK. Understanding systematic reviews and meta-analysis. *Archives of disease in childhood*. 2005;90(8):845-8. Epub 2005/07/26.

29. Mulrow CD. Rationale for systematic reviews. *BMJ*. 1994;309(6954):597-9. Epub 1994/09/03.

30. Hulley SB, Cumming SR, Browner WS, Grady DG, Hearst NB, Newman TB. Delineando a pesquisa clínica: uma abordagem epidemiológica. *Delineando a pesquisa clínica: uma abordagem epidemiológica: Artmed*; 2008.

31. Santos EC, Madalena. CRITICAL INTERPRETATION OF STATISTICAL RESULTS OF A META-ANALYSIS: METHODOLOGICAL STRATEGIES 2013;44 (janeiro/junho):85-98.

32. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *BMJ*. 2009;339:b2535. Epub 2009/07/23.

33. Higgins JPT, Green S, Cochrane Collaboration. *Cochrane handbook for systematic reviews of interventions*. Chichester, England ; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell; 2008. xxi, 649 p. p.

34. Guyatt GH, Oxman AD, Schunemann HJ, Tugwell P, Knottnerus A. GRADE guidelines: a new series of articles in the *Journal of Clinical Epidemiology*. *Journal of clinical epidemiology*. 2011;64(4):380-2. Epub 2010/12/28.

35. Guyatt GH, Oxman AD, Montori V, Vist G, Kunz R, Brozek J, et al. GRADE guidelines: 5. Rating the quality of evidence--publication bias. *Journal of clinical epidemiology*. 2011;64(12):1277-82. Epub 2011/08/02.

36. Cipriani A, Higgins JPT, Geddes JR, Salanti G. Conceptual and Technical Challenges in Network Meta-analysis. *Annals of Internal Medicine*. 2013;159(2):130-W54.

37. MGoulart MCT, B. R.; Santos, M. Diretriz Brasileira de Comparações Indiretas. *DECIT Instituto Nacional de Cardiologia*. 2013:17.

38. Lu G, Ades AE. Combination of direct and indirect evidence in mixed treatment comparisons. *Statistics in medicine*. 2004;23(20):3105-24. Epub 2004/09/28.

39. Silva M, Jacobus NV, Deneke C, Gorbach SL. Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. *Antimicrob Agents Chemother*. 1987;31(8):1231-3. Epub 1987/08/01.

40. Conway PL, Gorbach SL, Goldin BR. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *Journal of dairy science*. 1987;70(1):1-12. Epub 1987/01/01.
41. Hojsak I, Abdovic S, Szajewska H, Milosevic M, Krznaric Z, Kolacek S. Lactobacillus GG in the prevention of nosocomial gastrointestinal and respiratory tract infections. *Pediatrics*. 2010;125(5):e1171-7. Epub 2010/04/21.
42. Lin JS, Chiu YH, Lin NT, Chu CH, Huang KC, Liao KW, et al. Different effects of probiotic species/strains on infections in preschool children: A double-blind, randomized, controlled study. *Vaccine*. 2009;27(7):1073-9. Epub 2008/12/31.
43. Weizman Z, Asli G, Alsheikh A. Effect of a probiotic infant formula on infections in child care centers: comparison of two probiotic agents. *Pediatrics*. 2005;115(1):5-9. Epub 2005/01/05.
44. Hatakka K, Blomgren K, Pohjavuori S, Kaijalainen T, Poussa T, Leinonen M, et al. Treatment of acute otitis media with probiotics in otitis-prone children-a double-blind, placebo-controlled randomised study. *Clin Nutr*. 2007;26(3):314-21. Epub 2007/03/14.
45. ARAÚJO EA. Desenvolvimento e caracterização de queijo tipo Cottage adicionado de Lactobacillus Delbrueckii UFV H2b20 e de Inulina. (Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federak de Viçosa 2007. p. 54.
46. Kumpu M, Kekkonen RA, Kautiainen H, Jarvenpaa S, Kristo A, Huovinen P, et al. Milk containing probiotic Lactobacillus rhamnosus GG and respiratory illness in children: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *European journal of clinical nutrition*. 2012;66(9):1020-3. Epub 2012/06/14.
47. Agustina R, Kok FJ, van de Rest O, Fahmida U, Firmansyah A, Lukito W, et al. Randomized trial of probiotics and calcium on diarrhea and respiratory tract infections in Indonesian children. *Pediatrics*. 2012;129(5):e1155-64. Epub 2012/04/12.
48. Rautava S, Salminen S, Isolauri E. Specific probiotics in reducing the risk of acute infections in infancy--a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Br J Nutr*. 2009;101(11):1722-6. Epub 2008/11/07.
49. Taipale T, Pienihakkinen K, Isolauri E, Larsen C, Brockmann E, Alanen P, et al. Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12 in reducing the risk of infections in infancy. *The British journal of nutrition*. 2011;105(3):409-16. Epub 2010/09/25.
50. Cobo Sanz JM, Mateos JA, Munoz Conejo A. [Effect of Lactobacillus casei on the incidence of infectious conditions in children]. *Nutricion hospitalaria*. 2006;21(4):547-51. Epub 2006/08/18. Efecto de Lactobacillus casei sobre la incidencia de procesos infecciosos en niños/as.
51. Luoto R, Ruuskanen O, Waris M, Kalliomaki M, Salminen S, Isolauri E. Prebiotic and probiotic supplementation prevents rhinovirus infections in preterm infants: a randomized, placebo-controlled trial. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2014;133(2):405-13. Epub 2013/10/18.
52. Rojas MA, Lozano JM, Rojas MX, Rodriguez VA, Rondon MA, Bastidas JA, et al. Prophylactic probiotics to prevent death and nosocomial infection in preterm infants. *Pediatrics*. 2012;130(5):e1113-20. Epub 2012/10/17.
53. Kumpu M LL, Roivainen M, et al. . The use of the probiotic Lactobacillus rhamnosus GG and viral findings in the nasopharynx of children attending day care. *J Med Virol*. 2013;85(9):1632-8.
54. Hilde Kloster Smerud CRK ARM, Gisle Grave & Stein-Erik Birkeland. Effect of a probiotic milk product on gastrointestinal and respiratory infections in children attending day-care. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 2008;20:80-5.
55. Hojsak I, Snovak N, Abdovic S, Szajewska H, Misak Z, Kolacek S. Lactobacillus GG in the prevention of gastrointestinal and respiratory tract infections in children who attend day care centers: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Nutr*. 2010;29(3):312-6. Epub 2009/11/10.

56. Merenstein D MM, Fokar A, et al. Use of a fermented dairy probiotic drink containing *Lactobacillus casei* (DN-114 001) to decrease the rate of illness in kids: the DRINK study A patient-oriented, double-blind, cluster-randomized, placebo-controlled, clinical trial. *European journal of clinical nutrition*. 2010;64(7):669-77
57. Lehtoranta L, Soderlund-Venermo M, Nokso-Koivisto J, Toivola H, Blomgren K, Hatakka K, et al. Human bocavirus in the nasopharynx of otitis-prone children. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*. 2012;76(2):206-11. Epub 2011/11/29.
58. Honeycutt TC, El Khashab M, Wardrop RM, 3rd, McNeal-Trice K, Honeycutt AL, Christy CG, et al. Probiotic administration and the incidence of nosocomial infection in pediatric intensive care: a randomized placebo-controlled trial. *Pediatric critical care medicine : a journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies*. 2007;8(5):452-8; quiz 64. Epub 2007/08/19.
59. Di Pierro F DG, Fomia F, et al. Preliminary pediatric clinical evaluation of the oral probiotic *Streptococcus salivarius* K12 in preventing recurrent pharyngitis and/or tonsillitis caused by *Streptococcus pyogenes* and recurrent acute otitis media. *International journal of general medicine*. 2012;5:991-7.
60. Marseglia GL, Tosca M, Cirillo I, Licari A, Leone M, Marseglia A, et al. Efficacy of *Bacillus clausii* spores in the prevention of recurrent respiratory infections in children: a pilot study. *Therapeutics and clinical risk management*. 2007;3(1):13-7. Epub 2008/03/25.
61. Lehtoranta L, Soderlund-Venermo M, Nokso-Koivisto J, Toivola H, Blomgren K, Hatakka K, et al. Human bocavirus in the nasopharynx of otitis-prone children. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 2012;76(2):206-11.
62. Honeycutt TCB, El Khashab M, Wardrop RM, McNeal-Trice K, Honeycutt ALB, Christy CG, et al. Probiotic administration and the incidence of nosocomial infection in pediatric intensive care: A randomized placebo-controlled trial. *Pediatric Critical Care Medicine*. 2007;8(5):452-8.
63. Kumpu M, Lehtoranta L, Roivainen M, Ronkko E, Ziegler T, Soderlund-Venermo M, et al. The use of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG and viral findings in the nasopharynx of children attending day care. *Journal of Medical Virology*. 2013;85(9):1632-8.
64. Merenstein D, Murphy M, Fokar A, Hernandez RK, Park H, Nsouli H, et al. Use of a fermented dairy probiotic drink containing *Lactobacillus casei* (DN-114 001) to decrease the rate of illness in kids: the DRINK study A patient-oriented, double-blind, cluster-randomized, placebo-controlled, clinical trial. *Eur J Clin Nutr*. 2010;64(7):669-77.
65. Hilde Kloster Smerud CRK, Anette Roll Mosland, Gisle Grave & Stein-Erik Birkeland. Effect of a probiotic milk product on gastrointestinal and respiratory infections in children attending day-care. *Microbial Ecology in Health and Disease* 2008;20:80-5.
66. Di Pierro F, Donato G, Fomia F, Adami T, Careddu D, Cassandro C, et al. Preliminary pediatric clinical evaluation of the oral probiotic *Streptococcus salivarius* K12 in preventing recurrent pharyngitis and/or tonsillitis caused by *Streptococcus pyogenes* and recurrent acute otitis media. *Int J Gen Med*. 2012;5:991-7. Epub 2012/12/13.
67. THAMER KGP, A. L. B. Ciênc. Tecnol. Aliment. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2006;26(3):589-95.
68. Hasler CM, Bloch AS, Thomson CA, Enrione E, Manning C. Position of the American Dietetic Association: Functional foods. *Journal of the American Dietetic Association*. 2004;104(5):814-26. Epub 2004/05/06.
69. STRINGHETA PCO, T. T.; GOMES, R. C. . Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2007;43(2):181-94.

70. MORAES FPC, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. *Revista Eletrônica de Farmácia*. 2006;3(2):109-22.
71. BARRETO GPMS, N.; SILVA, E. D.; BOTELHO, L.; YIM, D. K.; ALMEIDA, C. G.; SABA, G. L. Quantificação de *Lactobacillus acidophilus*, Bifidobactérias e Bactérias Totais em Produtos Probióticos Comercializados no Brasil. *Journal Food Technology*. ja/jun 2003;6(1):119-26.
72. SHAH NP. Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*. 2007;17:1262-77.
73. Isolauri E, Salminen S, Ouwehand AC. Microbial-gut interactions in health and disease. Probiotics. Best practice & research *Clinical gastroenterology*. 2004;18(2):299-313. Epub 2004/05/05.
74. GILLILAND SE. Probiotics and prebiotics. In: MARTH, E. H., STEELE, J. L. *Applied Dairy Microbiology*. 2001(327-343).
75. SAAD SMI. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2006;42(1):01-16.
76. Kopp-Hoolihan L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. *Journal of the American Dietetic Association*. 2001;101(2):229-38; quiz 39-41. Epub 2001/03/29.
77. LEE YKN, K.; SALMINEN, S.; GORBACH, S. L. *Handbook of probiotics*. New York: Wiley, 1999

78. Morais MB, Jacob CM. The role of probiotics and prebiotics in pediatric practice. *Jornal de pediatria*. 2006;82(5 Suppl):S189-97. Epub 2006/12/01.
79. Hao Q, Lu Z, Dong BR, Huang CQ, Wu T. Probiotics for preventing acute upper respiratory tract infections. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2011(9):CD006895. Epub 2011/09/09.
80. Bernaola Aponte G, Bada Mancilla CA, Carreazo NY, Rojas Galarza RA. Probiotics for treating persistent diarrhoea in children. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2013;8:CD007401. Epub 2013/08/22.
81. Kibret T, Richer D, Beyene J. Bias in identification of the best treatment in a Bayesian network meta-analysis for binary outcome: a simulation study. *Clinical epidemiology*. 2014;6:451-60. Epub 2014/12/17.
82. Kitz R, Martens U, Zieseniss E, Enck P, Rose MA. Probiotic *E. faecalis* - adjuvant therapy in children with recurrent rhinosinusitis. *Central European Journal of Medicine*. 2012;7(3):362-5.
83. Hatakka K, Savilahti E, Ponka A, Meurman JH, Poussa T, Nase L, et al. Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: double blind, randomised trial. *Brit Med J*. 2001;322(7298):1327-9.
84. Experts from HIQA ravbHabamoWotEn. Guideline "Comparators and comparisons – Direct and Indirect Comparisons" 2013:[34 p.].

ANEXOS

ANEXO 1: Artigo submetido no JAMA Pediatrics

Title page

Network meta-analyses of probiotics to prevent respiratory tract infections in children and adolescents.

Word count: 3.500

Marina Azambuja Amaral, MAA (corresponding author)

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Centro Infant, Biomedical Research Institute PUCRS, Porto Alegre, Brazil.

- Postal/mail address: Rua Coronel Bordini 1471/202, Auxiliadora, Zipcode: 90440-001, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.
- E-mail address: marina.amaral@acad.pucrs.br OR nikamaral@hotmail.com
- Phone number: +55 (51) 99972025 / +55 (51) 32082896

Rita Mattiello, PhD

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Centro Infant, Biomedical Research Institute PUCRS, Porto Alegre, Brazil.

Gabriela Helena Barbosa Ferreira Guedes

Iniciação Científica do curso de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Centro Infant, Biomedical Research Institute PUCRS, Porto Alegre, Brazil.

Mario Bernardes Wagner

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) Porto Alegre, Brazil.

Marcus Herbert Jones, PhD

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Centro Infant, Biomedical Research Institute PUCRS, Porto Alegre, Brazil.

The first two authors (Marina Azambuja Amaral and Rita Mattiello) contributed equally to the study.

Abstract

Context: Probiotics have emerged as a promising intervention for the prevention of respiratory infections in children, according to several randomized controlled trials.

Objective: Critically assess the effect of probiotics on prevention of respiratory tract infections in children and adolescents

Data Sources: Searches were conducted on February 24, 2014 in the following databases: MEDLINE, EMBASE, LILACS, SCIELO, CINAHL, SCOPUS, and Web of Science. The following combinations of terms were used: “respiratory tract infections” AND probiotics.

Study selection: Randomized clinical trials assessing the effect of probiotics on respiratory tract infections (RTIs) in children and adolescents were included. Studies involving children with chronic diseases or other pre-existing comorbidities and those that did not specifying the type of probiotic were excluded.

Data extraction and Synthesis: Two reviewers, working independently, screened all titles and abstracts to identify studies that met the eligibility criteria. Pairwise and network analyses were performed to identify the effects of probiotics on respiratory infections.

Main outcomes and Measures: Main and secondary outcomes were respiratory tract infections and adverse effects, respectively.

Results: Twenty-one trials with 6.603 participants were included. Direct comparison analysis suggested that *Lactobacillus casei rhamnosus* (LCA) was the only effective probiotic to the rate of respiratory infections compared to placebo (RR0.38; CrI 0.19-0.45). Network analysis showed that the *Lactobacillus casei rhamnosus* probiotic exhibited a 54.7% probability of being classified in first, while the probability of

Lactobacillus fermentum CECT5716 (LFC) being last in the ranking was 15.3%.

Lactobacillus casei rhamnosus showed no better effect compared to other probiotic strains by indirect analysis.

Conclusion: This systematic review found a lack of evidence to support the effect of probiotic supplementation on the incidence rate of respiratory tract infections in children and adolescents.

Introduction

Acute respiratory infections (ARI) are a major public health problem worldwide in that they generate a high number of outpatient visits, hospital admissions and antibiotic prescriptions, as well as contributing to increased morbidity and mortality(1, 3).

Overuse of antibiotics to treat infections can cause consequences such as increased risk of adverse effects, including diarrhea, itching and microbial resistance, reducing treatment effectiveness(2, 6). Probiotics have been used as adjuvant to reduce these risks and to prevent infections, including respiratory tract infections.

According to the World Gastroenterology Organization (WGO) and World Health Organization (WHO), probiotics are active microorganisms that promote health benefits in the host when administered in adequate amounts(9).

One reason why probiotics are considered important dietary components to reduce the risk of infectious disease is due to their functional role in the intestinal tract and intestinal epithelium, as well as their association with systemic immune function and the intestinal mucosa(15). Probiotics have been used to control the growth of potentially pathogenic bacteria, compensating for this unwanted colonization(16), increasing beneficial bacteria and restoring lost metabolic activity(17).

In 2011, a systematic review and meta-analysis of ten randomized controlled trials involving 3451 participants was published, evaluating the use of probiotics to prevent acute respiratory tract infections (ARI) in children and adults(79). The study found that probiotics were better than placebo in reducing the number of participants experiencing ARI episodes of ARI, as well as lowering the rate of ARI episodes

and antibiotic use. However, this meta-analysis did not assess the effect of different strains of probiotics.

Thus, the aim of this review is to evaluate the effect of the use of probiotics prevention of respiratory tract infections in children and adolescents using a network meta-analysis approach.

Why this review is important

A number of foods are fortified with different probiotic strains, including yogurt, milk drinks and infant formulas. During clinical procedures, many researches have tested the efficiency of probiotics in specific clinical situations. As such, this review is essential to provide an overview of the current evidence regarding the effect of probiotics on preventing and treating respiratory infections, in order to help users and health professionals improve clinical management.

Methods

This systematic review and network meta-analysis was reported according to PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analyses) guidelines(32). The protocol was registered on Prospero website (International prospective register of systematic reviews) under registration number: CRD42014007632.

Search Strategy

Searches were conducted in the following databases: MEDLINE (through PUBMED), EMBASE, LILACS, SCIELO, CINAHL (via EBSCO) and SCOPUS (through Elsevier) on February 24, 2014. On March 23, 2014, a search was performed on three online registration sites for clinical trials: the Cochrane Central Register of

Controlled Trials (CENTRAL) ([Http://www.cochrane.org](http://www.cochrane.org)), Metaregister of Controlled Trials (<http://controlled-trials.com/mrct>) and National Institutes of Health ([HTTP://www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). On the same date, a search was performed of reference lists for articles screened in printed journals and for articles cited in the *ISI Web of Science* database.

Titles from references of the included studies were reviewed to determine whether they additional were relevant for inclusion in the systematic review. We included all studies published from the date the databases were created until March, 2014. The following combination of terms was used: "respiratory tract infections" AND probiotics, without language restrictions.

Two independent reviewers (M.A.A and G.H.B.F.G) screened all the titles and abstracts to identify studies that met inclusion criteria or could not be safely excluded without assessing the entire text. Initially, titles and abstracts were analyzed independently and studies were then selected to be read in full according to the previously established inclusion criteria. Divergences were resolved by consensus and a third reviewer was consulted in the event of continued disagreement.

Eligibility criteria

The systematic review included randomized clinical trials assessing the effect of probiotics on respiratory tract infections (RTIs) with or without a control group. All of the included studies involved children and adolescents of both sexes, aged 0 to 18 years, at risk of or suffering from respiratory infections. Studies using only one or various probiotics strains were included. Investigations involving children and adolescents with chronic diseases or other pre-existing comorbidities were excluded along with research that did not specify the type of probiotic.

Primary outcome

The primary outcome was respiratory tract infections (pneumonia OR upper respiratory infections - pharyngitis, laryngitis, epiglottitis, sinusitis, otitis - OR lower respiratory infections – tracheobronchitis OR bronchitis and bronchiolitis).

Secondary outcome

The secondary outcome was the analysis of adverse effects.

Data extraction

The following variable data was extracted from each of the studies selected: title, journal in which the article was published, authors, year of publication, study design, age and sex of participants, number of participants, control group, type and dose of probiotic strain used in the intervention, follow-up, outcomes and results.

Risk of bias (RoB) in the included studies

Trial quality and risk of bias (RoB) in the included studies were assessed according to the criteria outlined in the Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions(33), taking into account evidence interpretation using the GRADE approach. This included rating the adequacy of randomization: randomization; allocation concealment; blinding participants; blinding outcomes; incomplete outcome data; selective reporting; vested interest bias and loss of participant follow-up.

Data presentation and meta-analysis

Conventional pairwise meta-analysis was performed first to summarize the studies comparing the different interventions against the placebo.

The studies were combined using statistical models of fixed and random effects. The total number of events was determined by incidence density calculation (rate-per-person/days). Thus, the measure of the intervention's effect was shown as relative risk (RR).

Next, a network meta-analysis was carried out. This differs from a standard pairwise meta-analysis primarily because uses information across all available comparisons to estimate indirect pairwise comparisons not previously tested. For example, in a pairwise meta-analysis, to compare the effect of treatment A with treatment B, only trials that compare A and B directly in the same trial are included in the analysis. However, in a network meta-analysis information can also be used from trials comparing A with C and B with C, where C is a common comparator treatment. To that end, we assume that the effect of A compared to B is given by the effect of C compared to A plus the effect of C compared to B(36). Network meta-analysis combines direct and indirect evidence across a network of randomized trials into a single effect size and, under certain assumptions, can improve the accuracy of estimates while still respecting randomization(81).

Network meta-analysis data were analyzed using R software (R Language and Environment for Statistical Computing) version 3.1.2. with the "GeMTC" package (available on the online site: <http://CRAN.R-project.org/package=gemtc>) to perform consistency and inconsistency model simulations, applying MCMC (Markov chain Monte Carlo methods) simulation. The network meta-analysis was performed using a Bayesian framework and assuming an equal heterogeneity parameter t across all comparisons, accounting for correlations induced by multi-arm studies. Non-informative uniform and normal prior distributions were used as well as three different

sets of starting values to fit the model. This yielded 25,000 iterations and produced the posterior distributions of model parameters.

Relations random effects of different interventions were estimated and the results were presented through in the form of RR (relative risk) and 95% CrI (credibility interval). The analysis was performed using R/JAGS (<https://sourceforge.net/projects/mcmc-jags>; <http://CRAN.R-project.org/package=rjags>; Sourceforge - <http://mcmc-jags.sourceforge.net>)(38). We assessed the probability that each adjuvant treatment was the most efficient regimen, the second best, third best and so on by calculating the RR for each treatment compared with an arbitrary common group, and counting the proportion of iterations of the Markov chain, ranking each treatment from the highest to the lowest RR. The random effects (random) rather than the fixed effect model was applied since it is the most suitable and conservative analysis to explain the differences between the studies.

For the purpose of statistical analysis we separated the studies using a mixture of probiotics with *Lactobacillus rhamnosus GG* (MWL) from those mixtures of probiotics without *Lactobacillus rhamnosus GG* (MOL).

Subgroup analysis

Subgroup analyses were performed to evaluate the difference in effect size between interventions, disregarding the placebo as a comparative standard.

Assessment of heterogeneity

The heterogeneity was assessed qualitatively considering the following differences between the studies: age of participants and probiotic dose.

Results

Study Selection

Figure 1 shows the flow diagram for the search strategy and study selection used in the systematic review. A total of 1,517 articles were found. After independent evaluation by the reviewers, 1,496 articles were excluded. The SCIELO and LILACS databases and registration websites of clinical trials yielded no additional studies.

Study Characteristics

Table 1 summarizes the characteristics of the trials included, all of which were published up until 2013.

Design

All the included studies were randomized clinical trials and examined the effectiveness of probiotics in managing respiratory tract infections (**Table 1**).

Population

This review included twenty-one trials(18, 19, 41-44, 46-52, 55, 60-66, 82, 83) with 6,603 participants of both sexes, aged 0-18 years. Study sample sizes ranged from 61 to 986. Only one study evaluated the intervention in premature infants, finding beneficial effect of probiotics in reducing the risk of nosocomial pneumonia(52). However, this study was halted before completion due to a substantial drop in patient recruitment and limited funding.

Thirteen studies were conducted of healthy children and adolescents, one of premature infants(18, 19, 42, 43, 46-52, 63, 65); five involving children and adolescents considered at risk (children attending day care and those hospitalized for reasons other

than respiratory infections(41, 55, 61, 62, 64)) and three studies of children and adolescents with respiratory tract infections(44, 60, 66)(**Table 1**).

Interventions

The probiotics used in the included studies are: *Lactobacillus casei rhamnosus* (LCA), *Lactobacillus rhamnosus T cell-1* (RHT), *Lactobacillus reuteri* (LRE), *Bifidobacterium lactis* (BB-12), *Lactobacillus rhamnosus GG* (LGG), *Lactobacillus fermentum CECT5716* (LFC), *Streptococcus salivarius K12* (SSK), *Bacillus clausii* (BCL) and placebo (PLA). Some studies used a mixture of probiotics as an intervention. Fifteen trials evaluated the effect of a single probiotic(18, 19, 41, 43, 46, 47, 49-52, 55, 60, 62, 63, 66), five of a combination of probiotics(44, 48, 61, 64, 65) and one study assessed both the effect of isolated probiotics and a probiotic mixture(42). A study by Raakel Luoto et al. including probiotics and prebiotics as intervention was included in the systematic review because the effect of the two interventions was evaluated separately(51).

Lactobacillus rhamnosus GG (LGG) was the probiotic with the highest prevalence among the 11 studies included in this review (52.4%), but its isolated effect was evaluated in 7 of these (33.3%).

The routes of administration employed were probiotic capsule(42, 44, 61, 62), cow's milk formula supplemented with probiotic(19, 43, 46, 48, 51), milk supplemented with probiotic(18, 63), fermented milk supplemented with probiotic(41, 50, 55, 64, 65), low lactose milk with probiotic(47), probiotic tablets via a novel slow-release pacifier(49, 66), drops of an oil-suspension containing probiotic(52), oral suspension of probiotic(60). Probiotic dosage varied between studies and was measured by cfu (colony forming unit) / day. The follow-up time for the included studies ranged from 2 to 12 months, with one shorter follow-up period of 15 days(62) (**Table 1**).

Outcomes

Sixteen studies evaluated respiratory tract infections as outcome(18, 19, 41-43, 46-51, 55, 60, 63-65), of which four specified the incidence of acute otitis media(46, 48, 49, 63). Three trials assessed only acute otitis media as outcome(44, 61, 66) and two analyzed pneumonia as outcome(52, 58)

Risk of bias (RoB) in the included studies

The RoB for the included studies is summarized (**eFigure1; eFigure2**). The following criteria were used to assess the RoB:

Randomization

All the studies included in this systematic review were randomized (**eFigure2**).

Allocation concealment

Ten of the twenty one trials assessed (47.6%) reported adequate methods for allocation concealment (low risk) and eleven (54.4%) did not provide enough information to assess allocation concealment (unclear risk)(18, 42, 49-52, 55, 60-63, 65, 66)(**eFigure 2**).

Blinding

Eighteen of the twenty one trials (85.7%) reported suitable methods for participant blinding (low risk), three (14.3%) were considered “high risk” for not using the correct blinding procedure(60, 65, 66), nineteen (90.5%) reported adequate methods for blinding in terms of outcomes assessment (low risk) and two trials (9.5%) were deemed at “high risk” because they failed to employ the correct procedure for blinding(65, 66)(**eFigure 2**).

Incomplete outcome data

Twelve one of the studies included (57.2%) were judged “low risk” since all the necessary information for statistical analysis was described. Seven of the twenty-one trials (33.3%) did not clearly describe the information needed to assess the effect of interventions (unclear risk), While two (9.5%) did not provide this information at all (high risk)(42, 44)(**eFigure 2**).

Selective reporting

Ten of the included studies (47.6%) reported outcomes of interest (low risk), ten (47.6%) did not clearly demonstrate outcomes of interest (unclear risk) and one (4.8%) either did not describe or incompletely presented the outcomes of interest (high risk)(50) (**eFigure 2**).

Vested interest bias

In nine of the twenty one trials assessed (42.9%) the authors declared that they had no conflicts of interest (low risk), while four studies (19.05%) did not provide this information (unclear risk) and eight (38.05%) reported the existence of conflicts of interest (high risk)(42-44, 50, 51, 61, 64, 65)(**eFigure 2**).

Participant loss at follow-up

Nineteen of the twenty-one investigations (90.5%) experienced no loss of participants during follow-up (low risk) and two (9.5%) reported losses during this period (high risk)(52, 66)(**eFigure 2**).

Effects of interventions

Primary outcome measures

The overall incidence density rate of respiratory tract infections was 4.81 per 1,000 person-days in the intervention group and 5.72 per 1,000 person-days in the placebo group for the 6,603 participants included in this meta-analysis.

Although this outcome indicates that the number of participants who experienced episodes of respiratory tract infections was lower in the probiotic group than the placebo group, the substantial heterogeneity must be considered when using this outcome in the future.

Pairwise meta-analysis (direct comparisons)

Conventional pairwise meta-analysis of twenty-one studies was included in the systematic review. **eFigure3** shows the relative risk and probability-based ranking with the corresponding 95% credible intervals for each intervention compared to placebo. The direct comparison analysis suggested that the LCA probiotic reduced the incidence rate of respiratory infections compared to placebo (RR 0.38; CrI 0.19 to 0.45). Other probiotic strains showed no positive effect on the incidence rate of respiratory infections as compared to placebo. Three trials with a total of 1,731 participants examined the effectiveness of the probiotic LCA(42, 47, 50). The age of participants in these studies ranged from 3 to 7 years(42), 1 to 6 years(47), and 3 to 12 years(50). The follow-up time was similar: 7 months(42), 6 months(47) and 5 months(50). The dose of probiotic administered in the intervention group was 1.2×10^8 cfu/day(42) and 5.10^8 cfu/day(47), with one trial failing to specify the dose(50).

Network meta-analysis (combination of direct and indirect comparisons)

The base case analysis included a network of twenty-one trials with ten different interventions plus placebo. The network consisted of ten treatments with ten direct comparisons and five treatments with indirect comparisons. The geometry of the network for the outcome is showed in **Figure 2**.

To perform the network meta-analysis, three studies with a total of 1731 participants used *Lactobacillus casei rhamnosus* (LCA) as intervention(42, 47, 50), one of 986 participants used *Bacillus clausii* (BCL)(60), two involving 263 subjects used *Bifidobacterium lactis* (BB-12) (43, 49), one analyzing a total of 78 individuals employed *Streptococcus salivarius K12* (SSK) (66), one investigated 986 subjects using *Lactobacillus rhamnosus T cell-1* (RHT)(42), one of 188 people used *Lactobacillus fermentum CECT5716* (LFC)(19), seven with a total of 2,466 participants used *Lactobacillus rhamnosus GG* (LGG)(18, 41, 46, 51, 55, 58, 63), three analyzing 1,438 participants used *Lactobacillus reuteri* (LRE)(43, 47, 52), two used a mixture of probiotics without LGG probiotic (MOL)(42, 64) with a total of 1,224 individuals and four studies used a mixture of probiotics with LGG (MWL)(44, 48, 61, 65) with a total of 610 subjects .

Figure 3 shows the estimated effectiveness rankings for all the treatments, with the relevant 95% credible interval. The rankograms illustrative the probable effectiveness of each treatment from the highest (LCA) to the lowest rank (LFC). LCA exhibited a 54.7% likelihood of being ranked first, while the LFC probiotic showed a 15.3% probability of being last in the ranking.

Subgroup analysis

Subgroup analysis was performed based on rank classification and isolated probiotic strain from probiotics combination. The **eFigure 4** shows the effect of the LCA probiotic (ranked first) compared to other probiotics and the placebo.

LCA did not demonstrate a better effect in comparison to other probiotic strains on indirect analysis and a positive effect of the probiotic was only identified by direct analysis of three included studies compared to placebo.

The indirect analysis in **eFigure 5** shows the effect of LGG compared with other probiotics. There was no statistically significant effect of LGG compared to other probiotic strains. **eFigure 6** illustrates the effect of MWL probiotics against other probiotics. No statistically significant effect was recorded for MWL probiotics compared to other strains.

Secondary outcome measures

All the studies included in the meta-analysis reported no significant adverse effects among participants.

Publication Bias

Analysis of the funnel plot detected no risk of publication bias (**eFigure 7**).

Discussion

Summary of main results

Whether probiotics have any role in the prevention of respiratory tract infections in children and adolescents is unclear, since existing trials differ vastly in their populations, supplemented probiotic strains, probiotic dose administered and follow-up time.

Supplementation with the probiotic *Lactobacillus casei* (LCA) appears to be effective in reducing the incidence rate of respiratory infections; however, this conclusion is tempered by the presence of substantial heterogeneity in the three treatment trials included in the meta-analysis, particularly in terms of the age difference and the dose of probiotic administered to participants.

Lactobacillus rhamnosus GG (ATCC 53103) is a strain of *L. rhamnosus* isolated in 1983 from the intestinal tract of a healthy human being and for which a patent was filed on 17 April 1985 by Sherwood Gorbach and Barry Goldin(39). The patent refers to a strain of "*L. acidophilus* GG". It claims that the *L. rhamnosus* GG strain is acid- and bile-stable, has great avidity for human intestinal mucosal cells and produces lactic acid(40). Since its discovery, the *L. rhamnosus* GG strain has been extensively studied in terms of its various health benefits and is currently the world's most studied probiotic bacterium, with over 800 scientific studies.

On 2013, a published meta-analysis of four randomized placebo-controlled trials showed that the administration of *Lactobacillus rhamnosus* GG compared with placebo had the potential to reduce the incidence rate of acute otitis media, upper respiratory infections and antibiotic use in children(13). However, our analysis did not confirm this hypothesis. LGG strains ranked fifth in the treatment of respiratory infections. Indirect

analysis comparing LGG with other probiotics shows it had no better effect on respiratory tract infections than other probiotic strains. Moreover, comparison of the LGG probiotic alone with a mixture of probiotics plus LGG showed no effect on respiratory tract infections. This suggests there is insufficient evidence to determine whether it is better to use one strain of probiotic or a mixture of probiotics.

For statistical analysis, we separated the studies using a mixture of probiotics with LGG (MWL) from those employing mixture of probiotics without LGG (MOL). Despite LGG probiotic be further investigated in the literature, with seven articles, our meta-analysis found no efficacy for respiratory infections in children and adolescents.

As meta-analysis published by Cochrane in 2013 reported lack of evidence to use of probiotics for persistent diarrhea in children(80), our meta-analysis showed no evidence to support the use of probiotics to prevention of respiratory infections in children and adolescents.

In 2011, The Cochrane Collaboration published a systematic review and meta-analysis evaluating probiotics for preventing acute upper respiratory tract infections(79), concluding they probiotics superior to placebo in reducing the number of participants experiencing episodes of acute respiratory infections. However, this study differs from the meta-analysis that we conducted in terms of participant age since it includes adults, and also does not to perform a network analysis. Network analysis enables an analysis of the effect of ranking among the probiotics, facilitating clinical interpretation.

To our knowledge, this is the first systematic review to investigate the effectiveness of probiotic supplementation for the management and prevention of respiratory infections in children and adolescents with network analysis. It involved a rigorous review process adhering to internationally recognized Cochrane and Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analysis guidelines.

A possible limitation is that the potential for publication bias, partially supported by the contour-enhance funnel plot, can never be completely excluded. For some comparisons, the network meta-analysis estimate was less accurate than that of pairwise meta-analysis. This occurred when there was overall heterogeneity in the network and random-effects models were used, since network meta-analysis assumes a common “average” heterogeneity t for all pairwise comparisons(84).

This review reflects the consensus that there is insufficient evidence to support the general use of both isolated and mixtures of probiotics in the prevention and treatment of respiratory tract infections. Larger and more rigorously designed randomized clinical trials are needed to examine the efficacy of probiotics in the management of respiratory tract infections.

Clinical interpretation of the data

The results of the analysis show that only the LCA probiotic was superior to the placebo in relation to the incidence rate of respiratory infections, ranking first in effectiveness among all the probiotic strains evaluated in this meta-analysis. However, it is important to consider that the analysis of this probiotic was based on only three studies with differences as the dose of probiotic administered. According to the included studies, probiotics are safe and adverse effects were minor.

Acknowledgements

Corresponding Author: Marina Azambuja Amaral

Address: Rua Coronel Bordini 1471/202, Bairro Auxiliadora, Cep: 90440-001, Porto Alegre/RS, Brasil.

Author Contributions

Study concept and design: Marina Azambuja Amaral, Marcus Herbert Jones, and Rita Mattiello

Acquisition of data: Marina Azambuja Amaral, Rita Mattiello, Gabriela Helena Barbosa Ferreira Guedes, Mario Bernardes Wagner, Marcus Herbert Jones

Analysis and interpretation of data: Marina Azambuja Amaral, Rita Mattiello, Gabriela Helena Barbosa Ferreira Guedes, Mario Bernardes Wagner, Marcus Herbert Jones

Drafting of the manuscript: Marina Azambuja Amaral, Rita Mattiello, Gabriela Helena Barbosa Ferreira Guedes, Mario Bernardes Wagner, Marcus Herbert Jones

Critical revision of the manuscript for important intellectual content: Marina Azambuja Amaral, Rita Mattiello, Gabriela Helena Barbosa Ferreira Guedes, Mario Bernardes Wagner, Marcus Herbert Jones

Obtained funding: None

Study supervision: Marina Azambuja Amaral, Rita Mattiello, Gabriela Helena Barbosa Ferreira Guedes, Mario Bernardes Wagner, Marcus Herbert Jones

Financial Disclosures: None reported.

Funding/Support: None

Role of the Sponsor: The study received financial aid from the following Brazilian governmental agencies that support research: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Disclaimer: The opinions expressed in this article are those of the authors and do not reflect the opinions of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) or Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

References

1. Mulholland K. Global burden of acute respiratory infections in children: implications for interventions. *Pediatr Pulmonol*. 2003;36(6):469-474.
2. World Health Statistics 2013. 2013:1-168.
3. Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Black RE. WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet*. 2005;365(9465):1147-1152.
4. Wannmacher L. Evidências sobre uso de antibacterianos nas infecções respiratórias altas. *Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde-Brasil*. 2006.
5. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria: Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. 2001:1-34.
6. Rijkers GT, Bengmark S, Enck P, et al. Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: current status and recommendations for future research. *J Nutr*. 2010;140(3):671S-676S.
7. Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2002;82(1-4):279-289.
8. Kalliomaki M, Isolauri E. Role of intestinal flora in the development of allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2003;3(1):15-20.
9. Hao Q, Lu Z, Dong BR, Huang CQ, Wu T. Probiotics for preventing acute upper respiratory tract infections. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2011(9):CD006895.
10. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *BMJ*. 2009;339:b2535.
11. Higgins JPT, Green S, Cochrane Collaboration. *Cochrane handbook for systematic reviews of interventions*. Chichester, England ; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell; 2008.
12. Cipriani A, Higgins JPT, Geddes JR, Salanti G. Conceptual and Technical Challenges in Network Meta-analysis. *Annals of Internal Medicine*. 2013;159(2):130-W154.
13. Kibret T, Richer D, Beyene J. Bias in identification of the best treatment in a Bayesian network meta-analysis for binary outcome: a simulation study. *Clinical epidemiology*. 2014;6:451-460.
14. Lu G, Ades AE. Combination of direct and indirect evidence in mixed treatment comparisons. *Stat Med*. 2004;23(20):3105-3124.
15. Lin JS, Chiu YH, Lin NT, et al. Different effects of probiotic species/strains on infections in preschool children: A double-blind, randomized, controlled study. *Vaccine*. 2009;27(7):1073-1079.
16. Weizman Z, Asli G, Alsheikh A. Effect of a probiotic infant formula on infections in child care centers: comparison of two probiotic agents. *Pediatrics*. 2005;115(1):5-9.
17. Hatakka K, Savilahti E, Ponka A, et al. Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: double blind, randomised trial. *BMJ*. 2001;322(7298):1327.
18. Maldonado J, Canabate F, Sempere L, et al. Human milk probiotic *Lactobacillus fermentum* CECT5716 reduces the incidence of gastrointestinal and upper respiratory tract infections in infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012;54(1):55-61.
19. Hojsak I, Snovak N, Abdovic S, Szajewska H, Misak Z, Kolacek S. *Lactobacillus* GG in the prevention of gastrointestinal and respiratory tract infections in children who attend day care centers: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Nutr*. 2010;29(3):312-316.

20. Hojsak I, Abdovic S, Szajewska H, Milosevic M, Krznaric Z, Kolacek S. Lactobacillus GG in the prevention of nosocomial gastrointestinal and respiratory tract infections. *Pediatrics*. 2010;125(5):e1171-1177.
21. Kumpu M, Kekkonen RA, Kautiainen H, et al. Milk containing probiotic Lactobacillus rhamnosus GG and respiratory illness in children: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Eur J Clin Nutr*. 2012;66(9):1020-1023.
22. Agustina R, Kok FJ, van de Rest O, et al. Randomized trial of probiotics and calcium on diarrhea and respiratory tract infections in Indonesian children. *Pediatrics*. 2012;129(5):e1155-1164.
23. Rautava S, Salminen S, Isolauri E. Specific probiotics in reducing the risk of acute infections in infancy--a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Br J Nutr*. 2009;101(11):1722-1726.
24. Hatakka K, Blomgren K, Pohjavuori S, et al. Treatment of acute otitis media with probiotics in otitis-prone children--a double-blind, placebo-controlled randomised study. *Clin Nutr*. 2007;26(3):314-321.
25. Merenstein D, Murphy M, Fokar A, et al. Use of a fermented dairy probiotic drink containing Lactobacillus casei (DN-114 001) to decrease the rate of illness in kids: the DRINK study A patient-oriented, double-blind, cluster-randomized, placebo-controlled, clinical trial. *European journal of clinical nutrition*. 2010;64(7):669-677.
26. Taipale T, Pienihakkinen K, Isolauri E, et al. Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12 in reducing the risk of infections in infancy. *Br J Nutr*. 2011;105(3):409-416.
27. Cobo Sanz JM, Mateos JA, Munoz Conejo A. [Effect of Lactobacillus casei on the incidence of infectious conditions in children]. *Nutr Hosp*. 2006;21(4):547-551.
28. Luoto R, Ruuskanen O, Waris M, Kalliomaki M, Salminen S, Isolauri E. Prebiotic and probiotic supplementation prevents rhinovirus infections in preterm infants: a randomized, placebo-controlled trial. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2014;133(2):405-413.
29. Rojas MA, Lozano JM, Rojas MX, et al. Prophylactic probiotics to prevent death and nosocomial infection in preterm infants. *Pediatrics*. 2012;130(5):e1113-1120.
30. Kitz R, Martens U, Zieseniss E, Enck P, Rose MA. Probiotic E. faecalis - adjuvant therapy in children with recurrent rhinosinusitis. *Central European Journal of Medicine*. 2012;7(3):362-365.
31. Lehtoranta L, Soderlund-Venermo M, Nokso-Koivisto J, et al. Human bocavirus in the nasopharynx of otitis-prone children. *Int J Pediatr Otorhi*. 2012;76(2):206-211.
32. Hatakka K, Savilahti E, Ponka A, et al. Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: double blind, randomised trial. *Brit Med J*. 2001;322(7298):1327-1329.
33. Honeycutt TCB, El Khashab M, Wardrop RM, et al. Probiotic administration and the incidence of nosocomial infection in pediatric intensive care: A randomized placebo-controlled trial. *Pediatric Critical Care Medicine*. 2007;8(5):452-458.
34. Kumpu M, Lehtoranta L, Roivainen M, et al. The use of the probiotic Lactobacillus rhamnosus GG and viral findings in the nasopharynx of children attending day care. *Journal of Medical Virology*. 2013;85(9):1632-1638.
35. Di Pierro F, Donato G, Fomia F, et al. Preliminary pediatric clinical evaluation of the oral probiotic Streptococcus salivarius K12 in preventing recurrent pharyngitis and/or tonsillitis caused by Streptococcus pyogenes and recurrent acute otitis media. *Int J Gen Med*. 2012;5:991-997.
36. Marseglia GL, Tosca M, Cirillo I, et al. Efficacy of Bacillus clausii spores in the prevention of recurrent respiratory infections in children: a pilot study. *Ther Clin Risk Manag*. 2007;3(1):13-17.

37. Hilde Kloster Smerud CRK, Anette Roll Mosland, Gisle Grave & Stein-Erik Birkeland. Effect of a probiotic milk product on gastrointestinal and respiratory infections in children attending day-care. *Microbial Ecology in Health and Disease* 2008;20:80-85.
38. Honeycutt TC, El Khashab M, Wardrop RM, 3rd, et al. Probiotic administration and the incidence of nosocomial infection in pediatric intensive care: a randomized placebo-controlled trial. *Pediatr Crit Care Med*. 2007;8(5):452-458; quiz 464.
39. Silva M, Jacobus NV, Deneke C, Gorbach SL. Antimicrobial substance from a human Lactobacillus strain. *Antimicrob Agents Chemother*. 1987;31(8):1231-1233.
40. Conway PL, Gorbach SL, Goldin BR. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J Dairy Sci*. 1987;70(1):1-12.
41. Liu S, Hu P, Du X, Zhou T, Pei X. Lactobacillus rhamnosus GG supplementation for preventing respiratory infections in children: a meta-analysis of randomized, placebo-controlled trials. *Indian Pediatr*. 2013;50(4):377-381.
42. Bernaola Aponte G, Bada Mancilla CA, Carreazo NY, Rojas Galarza RA. Probiotics for treating persistent diarrhoea in children. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2013;8:CD007401.
43. Experts from HIQA ravbHabamoWotEn. Guideline "Comparators and comparisons – Direct and Indirect Comparisons". 2013:34.

Author/year	Design	Sample size	Age	Population	Intervention/ Probiotic	Dose	Administration route	Follow-up time
Jun-Song et al/ 2009(42)	RCT, double-blind, placebo-controlled	986	3 to 7 years	Healthy	1. <i>Lactobacillus casei rhamnosus</i> 2. <i>Lactobacillus rhamnosus T cell-1</i> 3. Mixture of probiotic without LGG	1. 2×10^8 cfu/day 2. 3×10^{10} cfu/day 3. 21×10^9 cfu/day	Capsules of probiotics	7 months
ZviWeizmanet al/ 2005(43)	RCT, double-blind, placebo-controlled	194	4 to 10 months	Healthy	<i>Bifidobacterium lactis (Bb- 12)</i> or <i>Lactobacillus reuteri</i>	1×10^7 cfu/grams of powdered formula	Cow's milk formula supplemented with probiotic	3 months
KatjaHatakkaet al/ 2001(18)	RCT, double-blind, placebo-controlled	571	1 to 6 years	Healthy	<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i>	200ml milk with probiotic / day : $5-10 \times 10^5$ cfu / mL probiotic strain	Milk supplemented with probiotic	7 months
Jose Maldonado, et al/ 2012(19)	RCT, double-blind, placebo-controlled	188	6 to 8 years	Healthy	<i>Lactobacillus fermentum CECT5716</i>	2×10^8 cfu/day	Cow's milk formula supplemented with probiotic	6 months
IvaHojsak,Natalija Snovak et al/ 2010(55)	RCT, double-blind, placebo-controlled	281	4 to 5 years	At risk (nurse)	<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i>	1×10^9 cfu/day	Fermented milk product supplemented with probiotic	3 months
IvaHojsak, et al/ 2010(41)	RCT, double-blind, placebo-controlled	742	9 to 16 years	At risk (hospitalized for various reasons)	<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i>	1×10^9 cfu/day	Fermented milk product supplemented with probiotic	Patients received the intervention during the hospitalization period
M Kumpu, et al/ 2012(46)	RCT, double-blind, placebo-controlled	523	2 to 6 years	Healthy	<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i>	6.7×10^5 a 1.9×10^6 cfu/day	Cow's milk supplemented with probiotic	7 months
Rina Agustina, et al/ 2012(47)	RCT, double-blind, placebo-controlled	494	1 to 6 years	Healthy	Milk with regular amount of calcium + <i>Lactobacillus casei</i> or <i>Lactobacillus reuteri</i>	5×10^8 cfu/day	Low lactose milk supplemented with probiotic	6 months

Samuli Rautava, et al/ 2009(48)	RCT, double-blind, placebo-controlled	72	0 to 12 months	Healthy	Mixture of probiotic with LGG (<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG + <i>Bifidobacterium lactis</i> Bb-12)	1×10^{-9} e 1×10^{-10} cfu/day	Cow's milk supplemented with probiotic	12 months
Katja Hatakkaa, et al/ 2007(44)	RCT, double-blind, placebo-controlled	269	10 months to 6 years	Children with acute otitis media	Mixture of probiotic with LGG (<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG + <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LC 705 + <i>Bifidobacterium</i> Bb-99 + <i>Propionibacterium freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i>)	$8-9 \times 10^{-9}$ cfu/day of each probiotics	Gelatin capsule	6 months
D Merenstein, et al/ 2010(64)	RCT, double-blind, placebo-controlled	238	3 to 6 years	At risk (nursery)	Mixture of probiotic without LGG (<i>Lactobacillus casei</i> DN-114 001/ CNCM I-1518 + <i>Streptococcus thermophilus</i> + <i>Lactobacillus bulgaricus</i>)	1×10^{-8} cfu/day of each probiotics	Fermented probiotic drink (Dan Active supplemented with probiotic)	3 months
Teemu Taipale, et al/ 2011(49)	RCT, double-blind, placebo-controlled	69	0 to 8 months	Healthy	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb-12 (BB-12)	1×10^{-7} cfu/day	Probiotic tables via a novel slow-release pacifier	8 months
J. M. ^a Cobo Sanz, et al/ 2006(50)	RCT, double-blind, placebo-controlled	251	3 to 12 years	Healthy	<i>Lactobacillus casei</i> (DN-114001)	Not specified	Actimel (fermented milk supplemented with probiotic)	5 months
Raakel Luoto, et al/ 2004(51)	RCT, double-blind, placebo-controlled	94	0 to 6 months	Healthy	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	1×10^{-9} cfu/day 1-30 days and 2×10^{-9} cfu/day 31-60 days	Cow's milk supplemented with probiotic	12 months
Mario A. Rojas, et al/ 2012(52)	RCT, double-blind, placebo-controlled	750	Preterm birth weight (<1500 g and 1501-2000 g)	Healthy	<i>Lactobacillus reuteri</i>	1×10^{-8} cfu/day	Drops of an oil-suspension supplemented with probiotic	Intervention time is not specified
Liisa Lehtoranta, et al/ 2012(61)	RCT, double-blind, placebo-controlled	269	9 months to 5,6 years	At risk, likely to have otitis	Mixture of probiotic with LGG (<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG + <i>L. rhamnosus</i> LC705 + Bb-99 + <i>P. freudenreichii</i> JS)	Not specified	Capsules of probiotic	6 months

Travis C. B. Honeycutt, MD, FAAP, FCCM; et al/ 2007(62)	RCT, double-blind, placebo-controlled	61	0 to 5 years	At risk (admitted to a pediatric intensive care unit for other reasons)	<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i>	10×10^{-9} cfu/day	Capsules of probiotic	14 days
MinnaKumpu, et al/ 2013(63)	RCT, double-blind, placebo-controlled	194	2 to 6 years	Healthy	<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i>	10^{-8} cfu/day	Pasteurized milk supplemented with probiotic	4 months
Francesco Di Pierro, et al/ 2012(66)	RCT, placebo-controlled	78	3 to 12 years	With pharyngitis and / or tonsillitis (oral streptococci)	<i>Streptococcus salivarius K12 (Bactoblis)</i>	5×10^{-9} cfu/day	Slow-release tablet of probiotic	3 months
Gian Luigi Marseglia, et al/ 2007(60)	RCT, double-blind, placebo-controlled	80	3 to 6 years	With recurrent respiratory infection	<i>Bacillus clausii</i>	Suspension of 2 billion spores by 5ml	Oral suspension of probiotic	3 months
HILDE KLOSTER SMERUD, et al/ 2008(65)	RCT, double-blind, placebo-controlled	199	12 to 36 months	Healthy	Mixture of probiotic with LGG (<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i> + <i>Lactobacillus acidophilus LA-5</i> + <i>Bifidobacterium Bb-12</i>)	LGG e Bb-12: 10^{-8} cfu/ml; 10^{-7} cfu/ml of LA-5	Active (fermented milk drink) supplemented with probiotic	7 months

Table 1. Characteristics of included studies.

Subtitles: *Lactobacillus casei rhamnosus (LCA)*; *Lactobacillus rhamnosus T cell-1 (RHT)*; *Lactobacillus reuteri (LRE)*; *Bifidobacterium lactis (BB-12)*; *Lactobacillus rhamnosus GG (LGG)*; *Lactobacillus fermentum CECT5716 (LFC)*; *Streptococcus salivarius K12 (SSK)*; *Bacillus clausii (BCL)*; *mixture of probiotics with LGG (MWL)*; *mixture of probiotics without LGG (MOL)*; placebo (PLA); randomized clinical Trial (RCT); colony forming units (cfu).

1. Mulholland K. Global burden of acute respiratory infections in children: implications for interventions. *Pediatr Pulmonol.* 2003;36(6):469-74. Epub 2003/11/18.
2. Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Black RE. WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet.* 2005;365(9465):1147-52. Epub 2005/03/30.
3. World Health Statistics 2013. 2013:1-168.
4. Silva Jr Jeg, Brito,S.M. F., Quito,M., Henriques,C.M.P., Malta, D.C., Vaz,C.A., Duarte,E., De Lima, E., Coelho, M.R., Mesquita,F., Brasilino, C.E.F. Boletim Epidemiológico - Influenza: monitoramento até a semana epidemiológica 29 de 2013. 2013;44 nº15:2-9.
5. Aranha LAc, Correa,L.(coordenador), Costa,M.M.M., Eid,R.C., Silva,C.V., Caruso,P., Verdeal,J.C.R., Assunção,M.S.C., Fernandes,A.T., Grinbaum,R.S., Fu,C., Medeiros,E.A.S., Dos Santos,J.N.C. TRATO RESPIRATÓRIO: Critérios Nacionais de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde. In: Saúde AANdVS-UdlePdledEAGGdTeSd, editor. 2009. p. 1-34.
6. Wannmacher L. Evidências sobre uso de antibacterianos nas infecções respiratórias altas. Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde-Brasil. 2006.
7. Arroll B, Kenealy T. Are antibiotics effective for acute purulent rhinitis? Systematic review and meta-analysis of placebo controlled randomised trials. *BMJ.* 2006;333(7562):279. Epub 2006/07/25.
8. Smith SM, Fahey T, Smucny J, Becker LA. Antibiotics for acute bronchitis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2004;4.
9. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria: Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. 2001:1-34.
10. Thomas DW, Greer FR. Probiotics and prebiotics in pediatrics. *Pediatrics.* 2010;126(6):1217-31.
11. Joint F. WHO Expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, Argentina October. 2001:1-4.
12. Sanders ME, Gibson G, Gill H, Guarner F. Probiotics: their potential to impact human health. Council for Agricultural Science and Technology Issue Paper. 2007;36:1-20.
13. Liu S, Hu P, Du X, Zhou T, Pei X. Lactobacillus rhamnosus GG supplementation for preventing respiratory infections in children: a meta-analysis of randomized, placebo-controlled trials. *Indian pediatrics.* 2013;50(4):377-81. Epub 2013/05/15.
14. Vouloumanou EK, Makris GC, Karageorgopoulos DE, Falagas ME. Probiotics for the prevention of respiratory tract infections: a systematic review. *International journal of antimicrobial agents.* 2009;34(3):197. e1-. e10.
15. Rijkers GT, Bengmark S, Enck P, Haller D, Herz U, Kalliomaki M, et al. Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: current status and recommendations for future research. *J Nutr.* 2010;140(3):671S-6S. Epub 2010/02/05.
16. Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2002;82(1-4):279-89. Epub 2002/10/09.
17. Kalliomaki M, Isolauri E. Role of intestinal flora in the development of allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2003;3(1):15-20. Epub 2003/02/13.

18. Hatakka K, Savilahti E, Ponka A, Meurman JH, Poussa T, Nase L, et al. Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: double blind, randomised trial. *BMJ*. 2001;322(7298):1327. Epub 2001/06/02.
19. Maldonado J, Canabate F, Sempere L, Vela F, Sanchez AR, Narbona E, et al. Human milk probiotic *Lactobacillus fermentum* CECT5716 reduces the incidence of gastrointestinal and upper respiratory tract infections in infants. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2012;54(1):55-61. Epub 2011/08/30.
20. Agostoni C, Axelsson I, Braegger C, Goulet O, Koletzko B, Michaelsen KF, et al. Probiotic bacteria in dietetic products for infants: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2004;38(4):365-74.
21. Braegger C, Chmielewska A, Decsi T, Kolacek S, Mihatsch W, Moreno L, et al. Supplementation of infant formula with probiotics and/or prebiotics: a systematic review and comment by the ESPGHAN committee on nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2011;52(2):238-50.
22. Kunz C, Rodriguez-Palmero M, Koletzko B, Jensen R. Nutritional and biochemical properties of human milk, Part I: General aspects, proteins, and carbohydrates. *Clinics in perinatology*. 1999;26(2):307-33.
23. Stotts NA. Evidence-based practice: what is it and how is it used in wound care? *The Nursing clinics of North America*. 1999;34(4):955-63, vii-viii.
24. Galvão CM, Sawada NO, Mendes IAC. A busca das melhores evidências. *Rev Esc Enferm USP*. 2003;37(4):43-50.
25. GALVÃO C. A prática baseada em evidências: uma contribuição para a melhoria da assistência de enfermagem perioperatória. 2002.114 f: Tese (Livro-Docência)-Escola de Enfermagem, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto; 2002.
26. Atkins D, Eccles M, Flottorp S, Guyatt GH, Henry D, Hill S, et al. Systems for grading the quality of evidence and the strength of recommendations I: critical appraisal of existing approaches The GRADE Working Group. *BMC health services research*. 2004;4(1):38.
27. Atallah AN. Systematic reviews of medical literature and meta-analyses. *Sao Paulo medical journal = Revista paulista de medicina*. 1996;114(5):1285-7. Epub 1996/09/01.
28. Akobeng AK. Understanding systematic reviews and meta-analysis. *Archives of disease in childhood*. 2005;90(8):845-8. Epub 2005/07/26.
29. Mulrow CD. Rationale for systematic reviews. *BMJ*. 1994;309(6954):597-9. Epub 1994/09/03.
30. Hulley SB, Cumming SR, Browner WS, Grady DG, Hearst NB, Newman TB. Delineando a pesquisa clínica: uma abordagem epidemiológica. *Delineando a pesquisa clínica: uma abordagem epidemiológica: Artmed*; 2008.
31. Santos EC, Madalena. CRITICAL INTERPRETATION OF STATISTICAL RESULTS OF A META-ANALYSIS: METHODOLOGICAL STRATEGIES 2013;44 (janeiro/junho):85-98.
32. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *BMJ*. 2009;339:b2535. Epub 2009/07/23.
33. Higgins JPT, Green S, Cochrane Collaboration. *Cochrane handbook for systematic reviews of interventions*. Chichester, England ; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell; 2008. xxi, 649 p. p.
34. Guyatt GH, Oxman AD, Schunemann HJ, Tugwell P, Knottnerus A. GRADE guidelines: a new series of articles in the *Journal of Clinical Epidemiology*. *Journal of clinical epidemiology*. 2011;64(4):380-2. Epub 2010/12/28.

35. Guyatt GH, Oxman AD, Montori V, Vist G, Kunz R, Brozek J, et al. GRADE guidelines: 5. Rating the quality of evidence--publication bias. *Journal of clinical epidemiology*. 2011;64(12):1277-82. Epub 2011/08/02.
36. Cipriani A, Higgins JPT, Geddes JR, Salanti G. Conceptual and Technical Challenges in Network Meta-analysis. *Annals of Internal Medicine*. 2013;159(2):130-W54.
37. MGoulart MCT, B. R.; Santos, M. Diretriz Brasileira de Comparações Indiretas. DECIT Instituto Nacional de Cardiologia. 2013:17.
38. Lu G, Ades AE. Combination of direct and indirect evidence in mixed treatment comparisons. *Statistics in medicine*. 2004;23(20):3105-24. Epub 2004/09/28.
39. Silva M, Jacobus NV, Deneke C, Gorbach SL. Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1987;31(8):1231-3. Epub 1987/08/01.
40. Conway PL, Gorbach SL, Goldin BR. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *Journal of dairy science*. 1987;70(1):1-12. Epub 1987/01/01.
41. Hojsak I, Abdovic S, Szajewska H, Milosevic M, Krznaric Z, Kolacek S. *Lactobacillus* GG in the prevention of nosocomial gastrointestinal and respiratory tract infections. *Pediatrics*. 2010;125(5):e1171-7. Epub 2010/04/21.
42. Lin JS, Chiu YH, Lin NT, Chu CH, Huang KC, Liao KW, et al. Different effects of probiotic species/strains on infections in preschool children: A double-blind, randomized, controlled study. *Vaccine*. 2009;27(7):1073-9. Epub 2008/12/31.
43. Weizman Z, Asli G, Alsheikh A. Effect of a probiotic infant formula on infections in child care centers: comparison of two probiotic agents. *Pediatrics*. 2005;115(1):5-9. Epub 2005/01/05.
44. Hatakka K, Blomgren K, Pohjavuori S, Kaijalainen T, Poussa T, Leinonen M, et al. Treatment of acute otitis media with probiotics in otitis-prone children--a double-blind, placebo-controlled randomised study. *Clin Nutr*. 2007;26(3):314-21. Epub 2007/03/14.
45. ARAÚJO EA. Desenvolvimento e caracterização de queijo tipo Cottage adicionado de *Lactobacillus Delbrueckii* UFV H2b20 e de Inulina. (Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa 2007. p. 54.
46. Kumpu M, Kekkonen RA, Kautiainen H, Jarvenpaa S, Kristo A, Huovinen P, et al. Milk containing probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG and respiratory illness in children: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *European journal of clinical nutrition*. 2012;66(9):1020-3. Epub 2012/06/14.
47. Agustina R, Kok FJ, van de Rest O, Fahmida U, Firmansyah A, Lukito W, et al. Randomized trial of probiotics and calcium on diarrhea and respiratory tract infections in Indonesian children. *Pediatrics*. 2012;129(5):e1155-64. Epub 2012/04/12.
48. Rautava S, Salminen S, Isolauri E. Specific probiotics in reducing the risk of acute infections in infancy--a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *The British journal of nutrition*. 2009;101(11):1722-6. Epub 2008/11/07.
49. Taipale T, Pienihakkinen K, Isolauri E, Larsen C, Brockmann E, Alanen P, et al. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 in reducing the risk of infections in infancy. *The British journal of nutrition*. 2011;105(3):409-16. Epub 2010/09/25.

50. Cobo Sanz JM, Mateos JA, Munoz Conejo A. [Effect of *Lactobacillus casei* on the incidence of infectious conditions in children]. *Nutricion hospitalaria*. 2006;21(4):547-51. Epub 2006/08/18. Efecto de *Lactobacillus casei* sobre la incidencia de procesos infecciosos en niños/as.
51. Luoto R, Ruuskanen O, Waris M, Kalliomaki M, Salminen S, Isolauri E. Prebiotic and probiotic supplementation prevents rhinovirus infections in preterm infants: a randomized, placebo-controlled trial. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2014;133(2):405-13. Epub 2013/10/18.
52. Rojas MA, Lozano JM, Rojas MX, Rodriguez VA, Rondon MA, Bastidas JA, et al. Prophylactic probiotics to prevent death and nosocomial infection in preterm infants. *Pediatrics*. 2012;130(5):e1113-20. Epub 2012/10/17.
53. Kumpu M LL, Roivainen M, et al. . The use of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG and viral findings in the nasopharynx of children attending day care. *J Med Virol*. 2013;85(9):1632-8.
54. Hilde Kloster Smerud CRK ARM, Gisle Grave & Stein-Erik Birkeland. Effect of a probiotic milk product on gastrointestinal and respiratory infections in children attending day-care. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 2008;20:80-5.
55. Hojsak I, Snovak N, Abdovic S, Szajewska H, Misak Z, Kolacek S. *Lactobacillus* GG in the prevention of gastrointestinal and respiratory tract infections in children who attend day care centers: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Nutr*. 2010;29(3):312-6. Epub 2009/11/10.
56. Merenstein D MM, Fokar A, et al. Use of a fermented dairy probiotic drink containing *Lactobacillus casei* (DN-114 001) to decrease the rate of illness in kids: the DRINK study A patient-oriented, double-blind, cluster-randomized, placebo-controlled, clinical trial. *European journal of clinical nutrition*. 2010;64(7):669-77
57. Lehtoranta L, Soderlund-Venermo M, Nokso-Koivisto J, Toivola H, Blomgren K, Hatakka K, et al. Human bocavirus in the nasopharynx of otitis-prone children. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*. 2012;76(2):206-11. Epub 2011/11/29.
58. Honeycutt TC, El Khashab M, Wardrop RM, 3rd, McNeal-Trice K, Honeycutt AL, Christy CG, et al. Probiotic administration and the incidence of nosocomial infection in pediatric intensive care: a randomized placebo-controlled trial. *Pediatric critical care medicine : a journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies*. 2007;8(5):452-8; quiz 64. Epub 2007/08/19.
59. Di Pierro F DG, Fomia F, et al. Preliminary pediatric clinical evaluation of the oral probiotic *Streptococcus salivarius* K12 in preventing recurrent pharyngitis and/or tonsillitis caused by *Streptococcus pyogenes* and recurrent acute otitis media. *International journal of general medicine*. 2012;5:991-7.
60. Marseglia GL, Tosca M, Cirillo I, Licari A, Leone M, Marseglia A, et al. Efficacy of *Bacillus clausii* spores in the prevention of recurrent respiratory infections in children: a pilot study. *Therapeutics and clinical risk management*. 2007;3(1):13-7. Epub 2008/03/25.
61. Lehtoranta L, Soderlund-Venermo M, Nokso-Koivisto J, Toivola H, Blomgren K, Hatakka K, et al. Human bocavirus in the nasopharynx of otitis-prone children. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 2012;76(2):206-11.
62. Honeycutt TCB, El Khashab M, Wardrop RM, McNeal-Trice K, Honeycutt ALB, Christy CG, et al. Probiotic administration and the incidence of nosocomial infection in pediatric intensive care: A randomized placebo-controlled trial. *Pediatr Crit Care Me*. 2007;8(5):452-8.

63. Kumpu M, Lehtoranta L, Roivainen M, Ronkko E, Ziegler T, Soderlund-Venermo M, et al. The use of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG and viral findings in the nasopharynx of children attending day care. *Journal of Medical Virology*. 2013;85(9):1632-8.
64. Merenstein D, Murphy M, Fokar A, Hernandez RK, Park H, Nsouli H, et al. Use of a fermented dairy probiotic drink containing *Lactobacillus casei* (DN-114 001) to decrease the rate of illness in kids: the DRINK study A patient-oriented, double-blind, cluster-randomized, placebo-controlled, clinical trial. *Eur J Clin Nutr*. 2010;64(7):669-77.
65. Hilde Kloster Smerud CRK, Anette Roll Mosland, Gisle Grave & Stein-Erik Birkeland. Effect of a probiotic milk product on gastrointestinal and respiratory infections in children attending day-care. *Microbial Ecology in Health and Disease* 2008;20:80-5.
66. Di Pierro F, Donato G, Fomia F, Adami T, Careddu D, Cassandro C, et al. Preliminary pediatric clinical evaluation of the oral probiotic *Streptococcus salivarius* K12 in preventing recurrent pharyngitis and/or tonsillitis caused by *Streptococcus pyogenes* and recurrent acute otitis media. *Int J Gen Med*. 2012;5:991-7. Epub 2012/12/13.
67. THAMER KGP, A. L. B. Ciênc. Tecnol. Aliment. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2006;26(3):589-95.
68. Hasler CM, Bloch AS, Thomson CA, Enrione E, Manning C. Position of the American Dietetic Association: Functional foods. *Journal of the American Dietetic Association*. 2004;104(5):814-26. Epub 2004/05/06.
69. STRINGHETA PCO, T. T.; GOMES, R. C. . Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2007;43(2):181-94.
70. MORAES FPC, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. *Revista Eletrônica de Farmácia*. 2006;3(2):109-22.
71. BARRETO GPMS, N.; SILVA, E. D.; BOTELHO, L.; YIM, D. K.; ALMEIDA, C. G.; SABA, G. L. Quantificação de *Lactobacillus acidophilus*, Bifidobactérias e Bactérias Totais em Produtos Probióticos Comercializados no Brasil. . *Journal Food Technology*. ja/jun 2003;6(1):119-26.
72. SHAH NP. Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*. 2007;17:1262-77.
73. Isolauri E, Salminen S, Ouwehand AC. Microbial-gut interactions in health and disease. *Probiotics. Best practice & research Clinical gastroenterology*. 2004;18(2):299-313. Epub 2004/05/05.
74. GILLILAND SE. Probiotics and prebiotics. In: MARTH, E. H., STEELE, J. L. *Applied Dairy Microbiology*. 2001(327-343).
75. SAAD SMI. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2006;42(1):01-16.
76. Kopp-Hoolihan L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. *Journal of the American Dietetic Association*. 2001;101(2):229-38; quiz 39-41. Epub 2001/03/29.
77. LEE YKN, K.; SALMINEN, S.; GORBACH, S. L. . *Handbook of probiotics*. New York: Wiley, 1999
78. Morais MB, Jacob CM. The role of probiotics and prebiotics in pediatric practice. *Jornal de pediatria*. 2006;82(5 Suppl):S189-97. Epub 2006/12/01.

79. Hao Q, Lu Z, Dong BR, Huang CQ, Wu T. Probiotics for preventing acute upper respiratory tract infections. The Cochrane database of systematic reviews. 2011(9):CD006895. Epub 2011/09/09.
80. Bernaola Aponte G, Bada Mancilla CA, Carreazo NY, Rojas Galarza RA. Probiotics for treating persistent diarrhoea in children. The Cochrane database of systematic reviews. 2013;8:CD007401. Epub 2013/08/22.
81. Kibret T, Richer D, Beyene J. Bias in identification of the best treatment in a Bayesian network meta-analysis for binary outcome: a simulation study. *Clinical epidemiology*. 2014;6:451-60. Epub 2014/12/17.
82. Kitz R, Martens U, Zieseniss E, Enck P, Rose MA. Probiotic *E. faecalis* - adjuvant therapy in children with recurrent rhinosinusitis. *Central European Journal of Medicine*. 2012;7(3):362-5.
83. Hatakka K, Savilahti E, Ponka A, Meurman JH, Poussa T, Nase L, et al. Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: double blind, randomised trial. *Brit Med J*. 2001;322(7298):1327-9.
84. Experts from HIQA ravbHabamoWotEn. Guideline “Comparators and comparisons – Direct and Indirect Comparisons”2013:[34 p.].

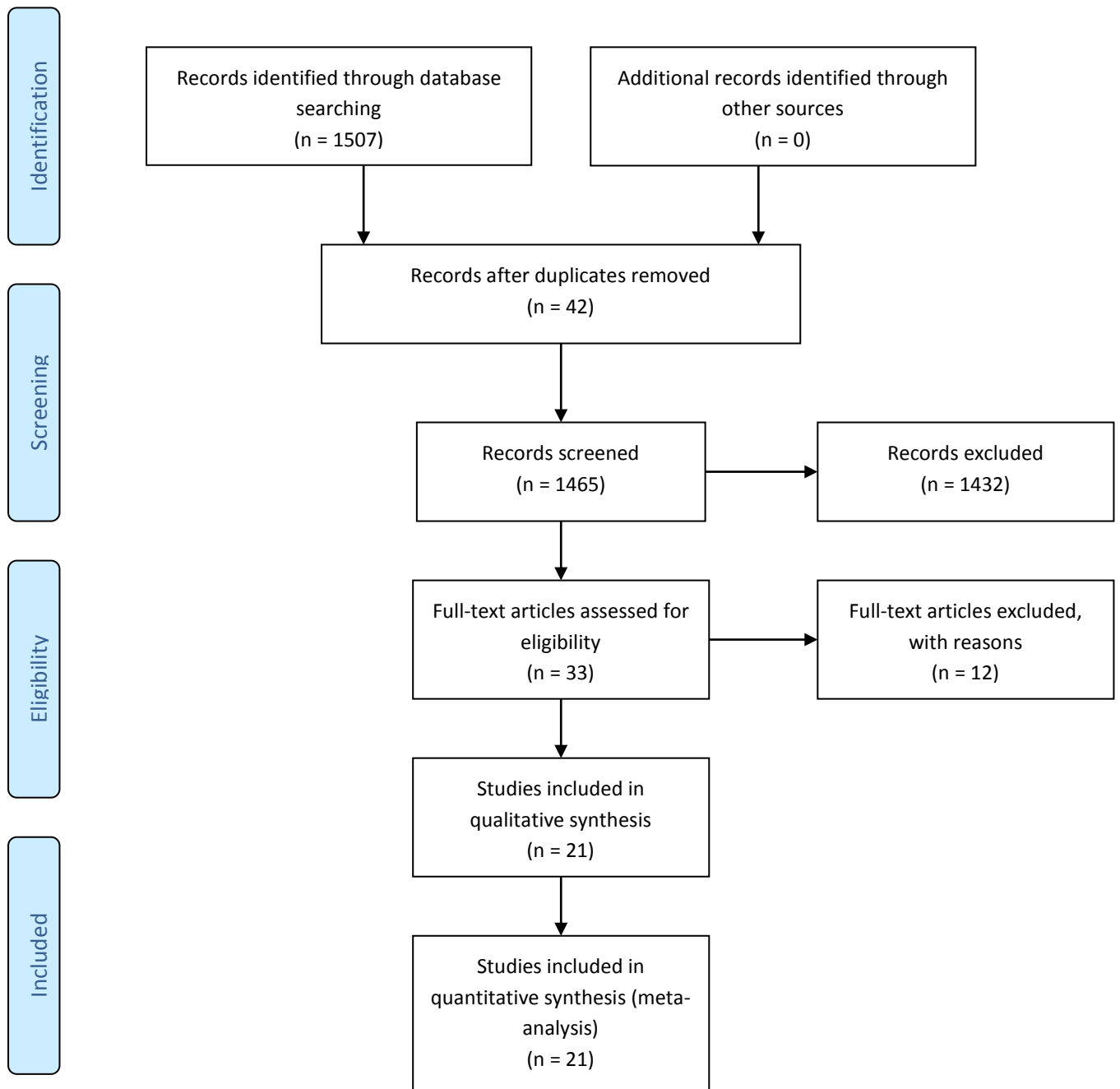


Figure 1. Study flow diagrams

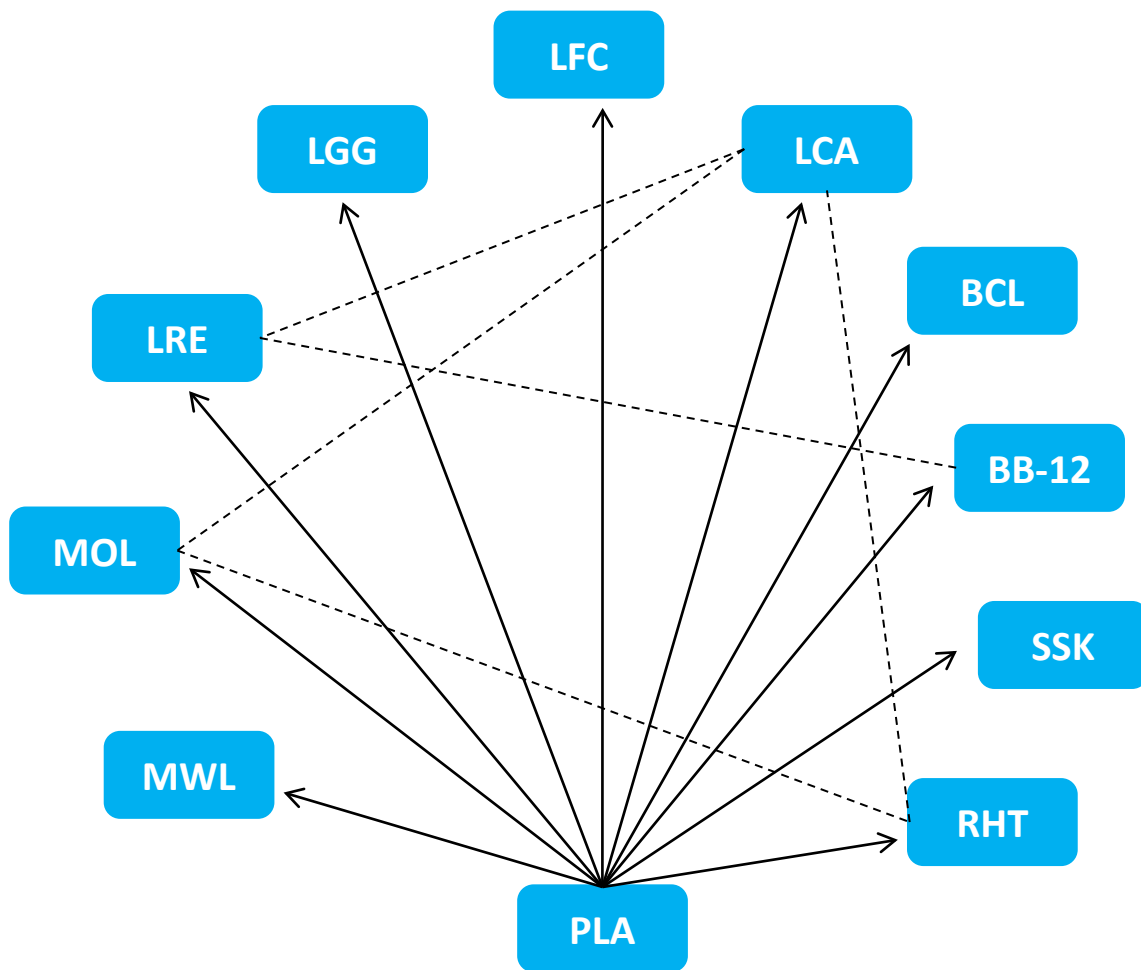


Figure 2. Geometry of the network

Subtitles: *Lactobacillus casei rhamnosus (LCA)*; *Lactobacillus rhamnosus T cell-1 (RHT)*; *Lactobacillus reuteri (LRE)*; *Bifidobacterium lactis (BB-12)*; *Lactobacillus rhamnosus GG (LGG)*; *Lactobacillus fermentum CECT5716 (LFC)*; *Streptococcus salivarius K12 (SSK)*; *Bacillus clausii (BCL)*; mixture of probiotics with LGG (MWL); mixture of probiotics without LGG (MOL); placebo (PLA).

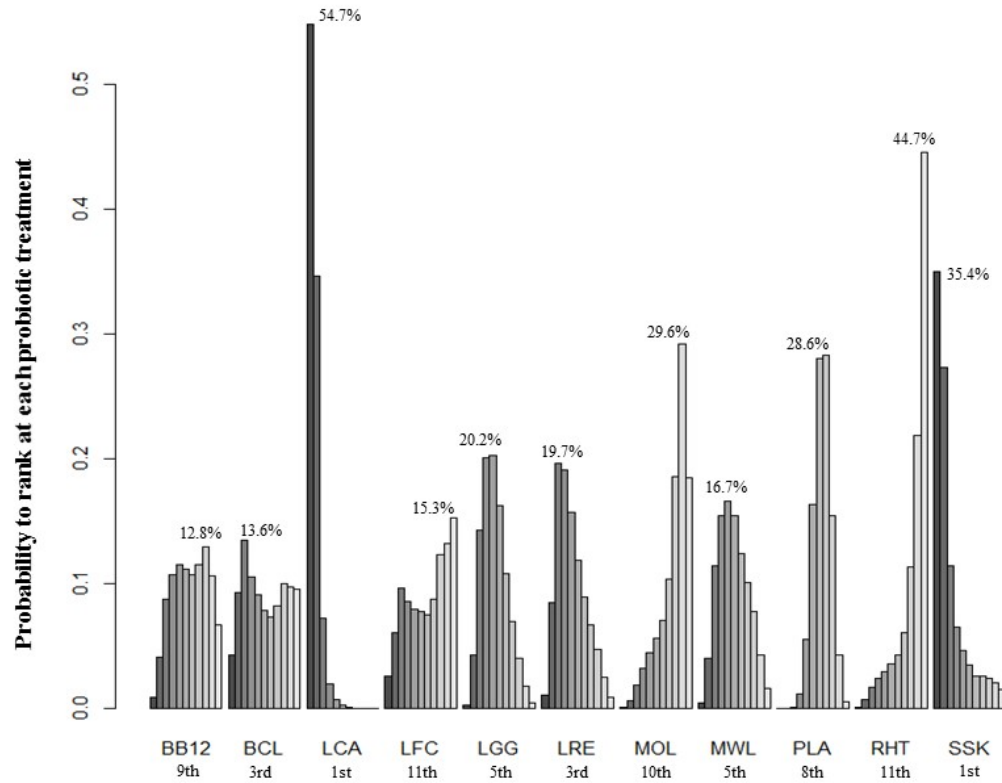
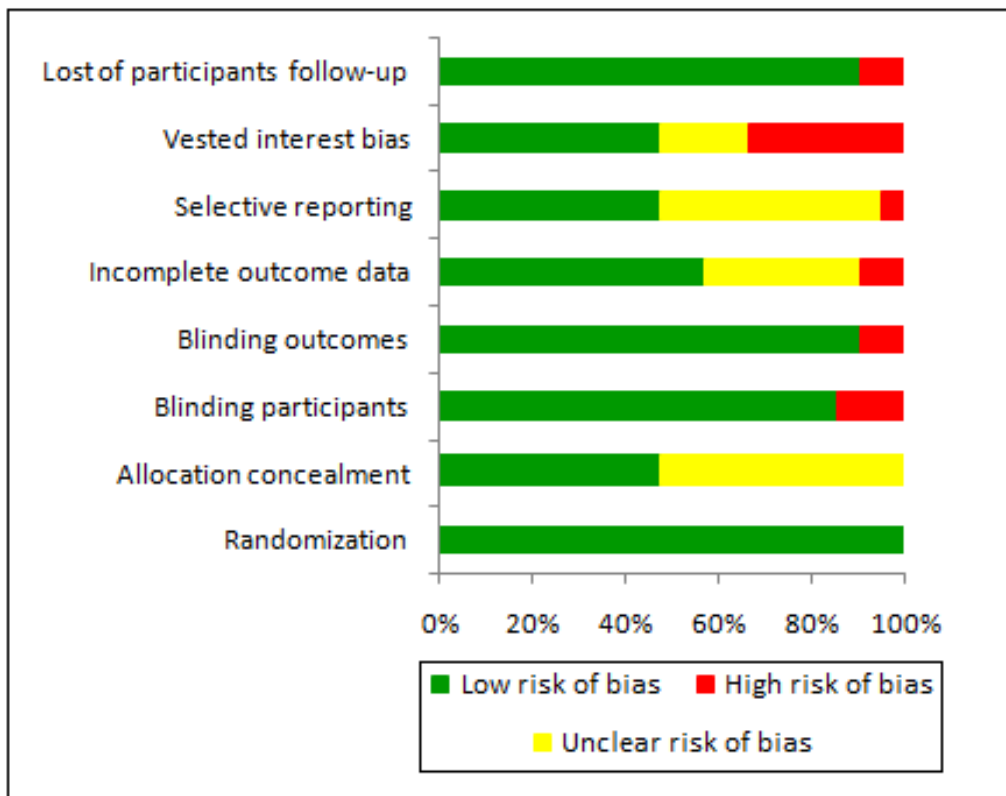


Figure 3. Rankograms for probiotics treatment for respiratory tract infections. On the horizontal axes are the possible ranks and on the vertical axes the probability that each treatment achieves each rank.

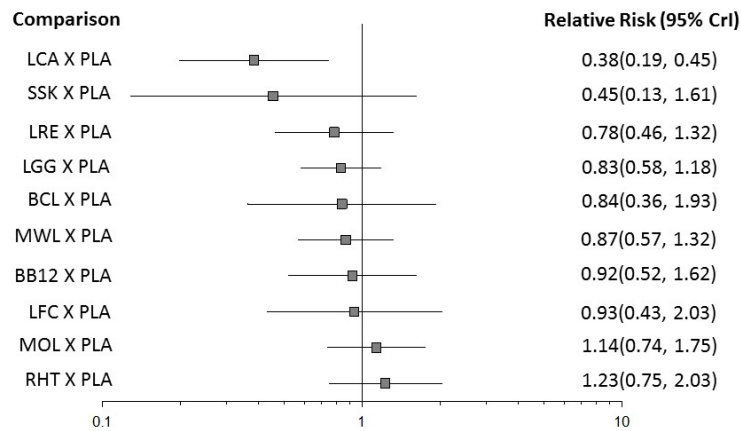
Figure 3. Rankograms for probiotics treatment for respiratory tract infections



eFigure 1. Risk of bias graph: review authors' judgements about each risk of bias item presented as percentages across all included studies.

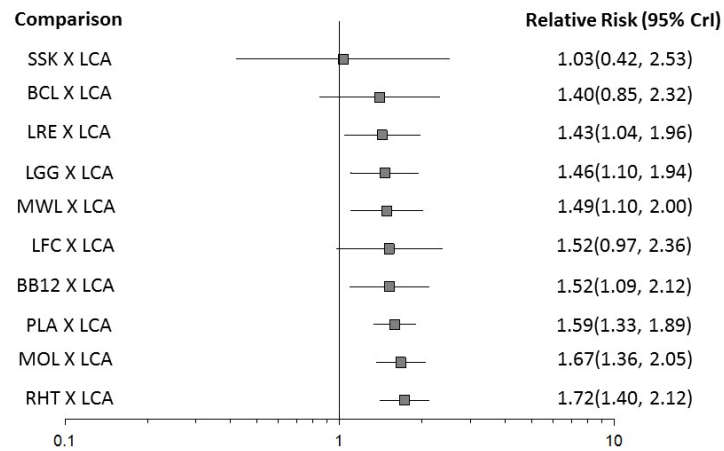
	Randomization	Allocation concealment	Blinding participants	Blinding outcomes	Incomplete outcome data	Selective reporting	Vested interest bias	Lost of participants follow-up
Jun-Song 2009	+	?	+	+	-	?	-	+
Zvi Weizmanet 2005	+	+	+	+	+	+	-	+
Katja Hatakka 2001	+	?	+	+	+	?	+	+
Jose Maldonado 2012	+	+	+	+	+	?	+	+
Iva Hojsak and Natalija Snovak 2010	+	?	+	+	+	+	+	+
Iva Hojsak 2010	+	+	+	+	+	+	+	+
M Kumpu 2012	+	+	+	+	?	+	+	+
Rina Agustina 2012	+	+	+	+	+	+	?	+
Samuli Rautava 2009	+	+	+	+	+	+	+	+
Katja Hatakkaa 2007	+	+	+	+	-	?	-	+
D Merenstein 2010	+	+	+	+	?	+	-	+
Teemu Taipale 2011	+	?	+	+	+	?	+	+
J. M. ^a Cobo Sanz 2006	+	?	+	+	+	-	-	+
Raakel Luoto 2004	+	+	+	+	?	+	-	+
Mario A. Rojas 2012	+	+	+	+	+	?	?	-
Liisa Lehtoranta 2012	+	?	+	+	+	?	-	+
Travis C. B. Honeycutt 2007	+	?	+	+	?	+	+	+
Minna Kumpu 2013	+	?	+	+	?	?	?	+
Francesco Di Pierro 2012	+	?	-	-	+	+	+	-
Gian Luigi Marseglia 2007	+	?	-	+	?	?	?	+
Hilde Kloster Smerud 2008	+	?	-	-	?	?	-	+

eFigure 2. Risk of bias summary: review authors' judgements about each risk of bias item for each included studies.



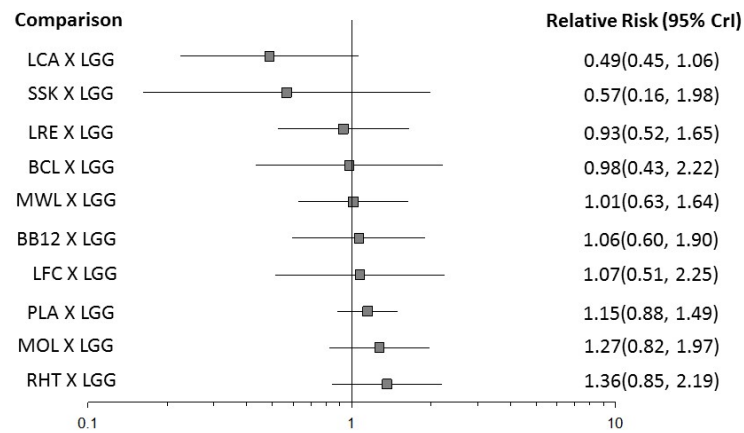
eFigure 3. Forest plot comparison all strains of probiotics VS. placebo

Subtitles: *Lactobacillus casei rhamnosus (LCA)*; *Lactobacillus rhamnosus T cell-1 (RHT)*; *Lactobacillus reuteri (LRE)*; *Bifidobacterium lactis (BB-12)*; *Lactobacillus rhamnosus GG (LGG)*; *Lactobacillus fermentum CECT5716 (LFC)*; *Streptococcus salivarius K12 (SSK)*; *Bacillus clausii (BCL)*; *mixture of probiotics with LGG (MWL)*; *mixture of probiotics without LGG (MOL)*; placebo (PLA).



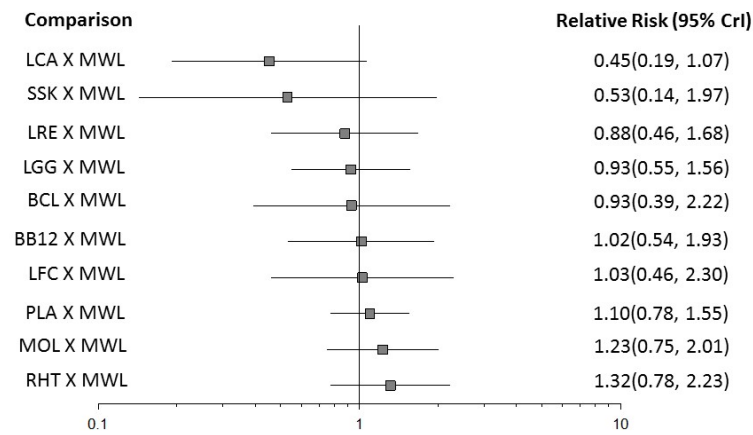
eFigure 4. Forest plot comparison LCA VS. all strains of probiotics

Subtitles: *Lactobacillus casei rhamnosus (LCA)*; *Lactobacillus rhamnosus T cell-1 (RHT)*; *Lactobacillus reuteri (LRE)*; *Bifidobacterium lactis (BB-12)*; *Lactobacillus rhamnosus GG (LGG)*; *Lactobacillus fermentum CECT5716 (LFC)*; *Streptococcus salivarius K12 (SSK)*; *Bacillus clausii (BCL)*; *mixture of probiotics with LGG (MWL)*; *mixture of probiotics without LGG (MOL)*; placebo (PLA).



eFigure 5. Forest plot comparison LGG VS. all strains of probiotics

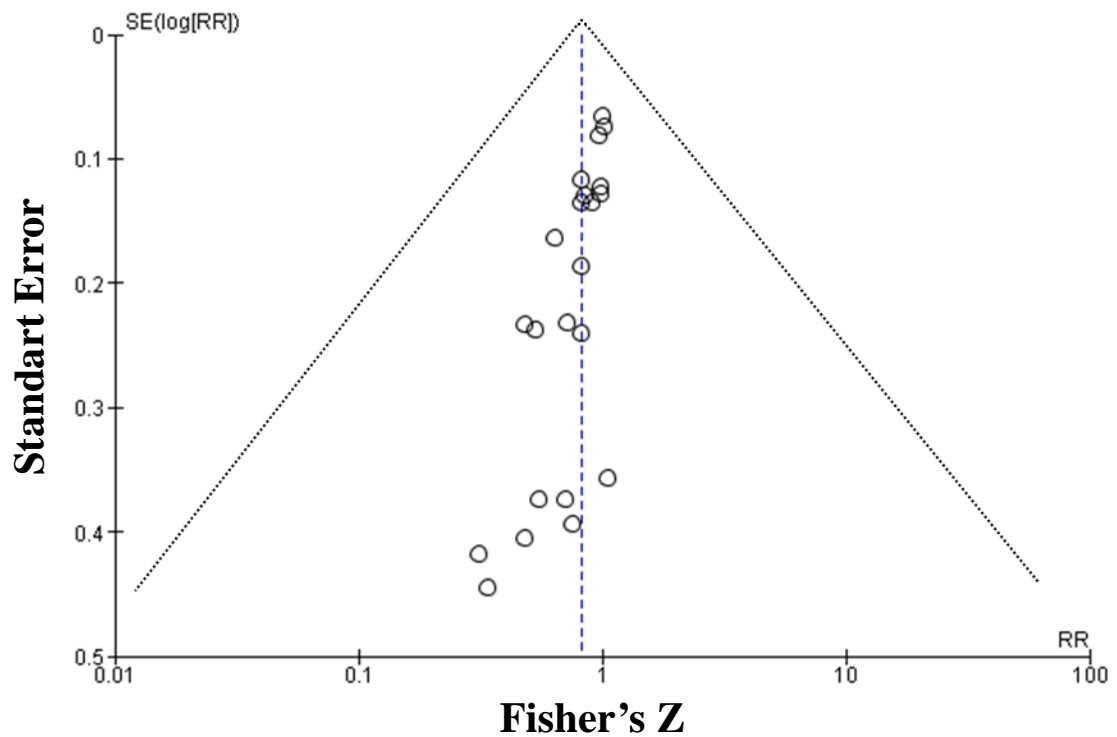
Subtitles: *Lactobacillus casei rhamnosus (LCA)*; *Lactobacillus rhamnosus T cell-1 (RHT)*; *Lactobacillus reuteri (LRE)*; *Bifidobacterium lactis (BB-12)*; *Lactobacillus rhamnosus GG (LGG)*; *Lactobacillus fermentum CECT5716 (LFC)*; *Streptococcus salivarius K12 (SSK)*; *Bacillus clausii (BCL)*; *mixture of probiotics with LGG (MWL)*; *mixture of probiotics without LGG (MOL)*; placebo (PLA).



eFigure 6. Forest plot comparison MWL VS. all strains of probiotics

Subtitles: *Lactobacillus casei rhamnosus (LCA)*; *Lactobacillus rhamnosus T cell-1 (RHT)*; *Lactobacillus reuteri (LRE)*; *Bifidobacterium lactis (BB-12)*; *Lactobacillus rhamnosus GG (LGG)*; *Lactobacillus fermentum CECT5716 (LFC)*; *Streptococcus salivarius K12 (SSK)*; *Bacillus clausii (BCL)*; *mixture of probiotics with LGG (MWL)*; *mixture of probiotics without LGG (MOL)*; placebo (PLA).

Funnel Plot of Standart Error by Fisher's Z



eFigure 7. Funnel Plot

Funnel plot all included studies in the Systematic Review. In the horizontal axis the differences between the observed log-relative risks of each active treatment versus placebo and their summary effect obtained from the pairwise meta-analysis are presented; in the vertical axis the standard errors of the log-relative risks are presented. Differences on the left of null represent studies with estimates larger than the comparison-specific mean.