

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO**

**Jonathan Rodrigo Lauxen**

**PROBIÓTICOS ORAIS *STREPTOCOCCUS*  
*SALIVARIUS K12* E *LACTOBACILLUS*  
*BREVIS CD2* PARA A PREVENÇÃO DE  
PNEUMONIA BACTERIANA SECUNDÁRIA  
EM PACIENTES COM COVID-19 GRAVE:  
UM ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO DE  
FASE 2**

Passo Fundo

2022

**Jonathan Rodrigo Lauxen**

**PROBIÓTICOS ORAIS *STREPTOCOCCUS*  
*SALIVARIUS K12* E *LACTOBACILLUS*  
*BREVIS CD2* PARA A PREVENÇÃO DE  
PNEUMONIA BACTERIANA SECUNDÁRIA  
EM PACIENTES COM COVID-19 GRAVE:  
UM ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO DE  
FASE 2**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da UPF, para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração em Clínica Odontológica, sob orientação do prof. Dr. Fernando Fornari e coorientação do prof. Dr. Pedro Henrique Corazza.

Passo Fundo

2022

Folha reservada para  
Ata de aprovação da Banca Examinadora

Observação:

Mantenha esta página no seu arquivo, imprimindo-a.  
Após, faça a substituição pela Ata de aprovação fornecida pela  
Secretaria para manter a correta numeração do seu trabalho.

Folha reservada para  
Ficha catalográfica

Observação:

Mantenha esta página no seu arquivo, imprimindo-a.  
Após, faça a substituição pela Ficha Catalográfica fornecida pela  
Secretaria para manter a correta numeração do seu trabalho.

## **BIOGRAFIA DO AUTOR**

Jonathan Rodrigo Lauxen, nascido dia 1º de março de 1990 na cidade de Ibirubá/RS. O autor é Cirurgião Dentista graduado pela Universidade de Passo Fundo (UPF) em 27 de Julho de 2013, sob orientação do Prof. Dr. Valmor Junior Barbosa Avila, com o trabalho de conclusão de curso intitulado “Estudo Epidemiológico das Lesões Traumáticas do Complexo Bucomaxilofacial em Passo Fundo/RS”. Obteve o título de Especialista em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial pelo CEOM/IMED/HSVP em 23 de setembro de 2017, sob orientação da Prof. Dra. Alessandra Kuhn Dall Magro com a monografia intitulada “Frenectomia lingual em Recém-Nascidos: Revisão de literatura”.

Atualmente integra o corpo clínico dos hospitais São Vicente de Paulo (Passo Fundo/RS), Clínicas de Passo Fundo, Cristo Redentor (Marau/RS) e São Lucas (Marau/RS) como Cirurgião Bucomaxilofacial, além de atuar em consultórios privados nas cidades de Passo Fundo, Marau, Nicolau Vergueiro e Júlio de Castilhos.

## OFERECIMENTOS E AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por proporcionar tudo o que tenho hoje, e também por despertar em mim o amor pela educação. Ser filho de professores nunca foi fácil, as cobranças sempre foram altas, porém vejo o quanto foi essencial no meu crescimento.

A minha família, principalmente ao meu filho, que sempre estiveram ao meu lado, incentivando meus estudos e entendendo as ausências para estudar, pesquisar e escrever este trabalho.

Aos meus professores, que mesmo em meio a dificuldades e adaptações para ministrar aulas em ano pandêmico, conseguiram com maestria, compartilhar o conhecimento e suas experiências na docência. Espero poder passar isso para meus alunos também.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando Fornari por aceitar a proposta de trabalho e principalmente ter me acompanhado e guiado durante esses dois anos de curso. Tenho muita gratidão e admiração pelo profissional e o ser humano empático que demonstrou ser.

Aos meus colegas, que apesar de termos um início complicado em meio a aulas EaD, conseguimos criar laços de parceria e amizade, auxiliando uns aos outros em todos os momentos, dividindo dúvidas, aflições, alegrias e conquistas.

Ao Hospital de Clínicas de Passo Fundo, a todos os médicos plantonistas, técnicos de enfermagem, enfermeiros, fisioterapeutas e

demais funcionários que auxiliaram no desenvolvimento desta pesquisa, inclusive compartilhando conhecimento sobre suas áreas de conhecimento, fazendo com que aprendesse muito sobre a rotina da UTI Covid.

A todos os pacientes e seus familiares, que aceitaram participar deste estudo. Vivi experiências que modificaram o modo como vejo a vida, e a forma como convivo com todas as pessoas ao meu redor. Chorei muito ao lado de leitos da UTI, mas mantive firme o pensamento de poder ajudar o próximo, muitas vezes o que eu tinha de melhor a oferecer era uma palavra de conforto e um abraço.

A Universidade de Passo Fundo e a Faculdade de Odontologia, a qual tenho um carinho imenso e um convívio de 17 anos, desde o ensino médio.

Por fim, a Deus, que permitiu que eu vivesse tudo isso, ao lado de pessoas incríveis que levarei para o resto da minha vida em um lugar muito especial dentro do meu coração.

## SUMÁRIO

|                                      |    |
|--------------------------------------|----|
| BIOGRAFIA DO AUTOR.....              | 5  |
| OFERECIMENTOS E AGRADECIMENTOS ..... | 6  |
| SUMÁRIO .....                        | 8  |
| LISTA DE TABELAS .....               | 9  |
| LISTA DE FIGURAS .....               | 10 |
| LISTA DE ABREVIATURAS .....          | 11 |
| 1. INTRODUÇÃO .....                  | 16 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA.....        | 19 |
| 3. PROPOSIÇÃO.....                   | 28 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS .....         | 29 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....     | 39 |
| 6. CONCLUSÕES .....                  | 48 |
| REFERÊNCIAS .....                    | 49 |
| APÊNDICES .....                      | 54 |
| ARTIGO SUBMETIDO .....               | 61 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1: Características basais de pacientes que completaram o tratamento de 7 dias de probióticos e placebo (n = 50).....                                       | 40 |
| Tabela 2: Espécies bacterianas isoladas a partir de análise de escarro de pacientes com COVID-19 grave e pneumonia bacteriana secundária (n = 22 pacientes) ..... | 41 |
| Gráfico 1: Diagnósticos de PAV (Número de PAV no mês / número de paciente-dia em VM) x 1000) .....                                                                | 29 |
| Gráfico 2- Casos confirmados por dia em Passo Fundo e média móvel (atualizado em 14/01/2021).....                                                                 | 30 |
| Gráfico 3- Taxa de ocupação de leitos adultos COVID-19 UTI e Clínico (atualizado em 14/01/2021) .....                                                             | 30 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                          |    |
|----------------------------------------------------------|----|
| Figura 1: Embalagem com código aleatório .....           | 36 |
| Figura 2: Embalagem contendo gel.....                    | 36 |
| Figura 3: Higiene oral com gaze e Clorexedina 0,12%..... | 37 |
| Figura 4: Aplicação do gel oral .....                    | 37 |
| Figura 5: Aplicação do gel oral .....                    | 37 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

Covid-19: *Corona Virus Disease – 2019*

nCoV: novel CoronaVirus

SARS-CoV: *Severe Acute Respiratory Syndrome - CoronaVirus*

SARS-CoV-2: *Severe Acute Respiratory Syndrome - novel CoronaVirus*

WHO: *World Health Organization*

UTI: Unidade de Terapia Intensiva

VM: Ventilação Mecânica

PAVM/PAV: Pneumonia Associada a Ventilação Mecânica

ITRs: Infecções do Trato Respiratório

ON: Óxido Nítrico

Ig: Imunoglobulina

PGE2: Prostaglandina E2

IFN- $\gamma$ : Interferon-gama

LAB: *Lactic Acid Bacteria*

pH: potencial Hidrogeniônico

HCPF: Hospital de Clínicas de Passo Fundo

RS: Rio Grande do Sul

SC: Santa Catarina

UPF: Universidade de Passo Fundo

CONEP: Conselho Nacional de Ética em Pesquisa

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

## RESUMO

**Justificativa e objetivos:** Pacientes com COVID-19 grave são propensos a pneumonia bacteriana secundária. Os probióticos contra patógenos orais podem prevenir a colonização pulmonar e a progressão para pneumonia bacteriana. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do *Streptococcus salivarius* K12 combinado com *Lactobacillus brevis* CD2 na prevenção de pneumonia bacteriana secundária em pacientes com COVID-19 grave. **Métodos:** Neste estudo de fase 2 randomizado e controlado por placebo, 70 pacientes graves com suposto diagnóstico de COVID-19 foram aleatoriamente designados para tratamento de 7 dias com gel oral contendo *Streptococcus salivarius* K12 2 bilhões de unidades formadoras de colônia (UFC) e *Lactobacillus brevis* CD2 4 bilhões de UFC a cada 8 horas ou placebo, começando no primeiro dia de unidade de terapia intensiva (UTI). O desfecho primário foi pneumonia bacteriana, enquanto os desfechos secundários foram sobrevida e estado de gravidade da doença em 14 dias. **Resultados:** Vinte pacientes não completaram o tratamento experimental de 7 dias (oito tiveram alta precoce da UTI, seis não confirmaram COVID-19, quatro desistiram e dois morreram). Entre 50 pacientes que completaram o experimento de 7 dias, 26 receberam probióticos (58,7 anos, 81% homens) e 24 receberam placebo (60,5 anos, 71% homens). Nesses grupos, a incidência de pneumonia bacteriana secundária foi de 35% e 54%,

respectivamente [risco relativo: 0,64 (IC 95%: 0,34–1,22)]. A probabilidade de sobrevida cumulativa no dia 14 foi de 0,835 para pacientes tratados com probióticos e 0,807 para aqueles tratados com placebo (P = 0,198). O estado de gravidade da doença em 14 dias não diferiu entre os grupos. **Conclusão:** Neste estudo preliminar de pacientes com COVID-19 grave, o uso de probióticos orais *Streptococcus salivarius* K12 e *Lactobacillus brevis* CD2 não preveniu a pneumonia bacteriana secundária. Identificador NCT: 05175833.

Palavras-chave: Probióticos, Coinfecção, Coronavírus Causador da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2, Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica

## ABSTRACT<sup>1</sup>

**Background and aims:** Patients with severe COVID-19 are prone to secondary bacterial pneumonia. Probiotics against oral pathogens might prevent lung colonization and progression to bacterial pneumonia. This study aimed to assess the effect of *Streptococcus salivarius* K12 combined with *Lactobacillus brevis* CD2 on the prevention of secondary bacterial pneumonia in patients with severe COVID-19. **Methods:** In this randomized, placebo-controlled phase 2 trial, 70 patients with severe COVID-19 were randomly assigned to a 7-day course of oral gel containing *Streptococcus salivarius* K12 2 billion colony-forming units (CFU) and *Lactobacillus brevis* CD2 4 billion CFU every 8 hours or placebo, starting in the first intensive care unit day. Primary outcome was bacterial pneumonia, whereas secondary outcomes were survival and 14-days illness severity status. **Results:** Twenty patients did not complete the 7-day experimental course (eight had early ICU discharge, six presented non-confirmed COVID-19, four dropped out and two died). Among 50 patients who completed the 7-day experiment, 26 received probiotics (58.7 years old, 81% men) and 24 received placebo (60.5 years old, 71% men). In these groups, the incidence of secondary bacterial pneumonia was 35% and 54%, respectively [relative risk: 0.64 (95%CI: 0.34–1.22)].

---

<sup>1</sup> Oral probiotics *Streptococcus salivarius* K12 and *Lactobacillus brevis* CD2 for the prevention of secondary bacterial pneumonia in patients with severe COVID-19: a phase 2 randomized clinical trial

The cumulative survival probability at day 14 was 0.835 for patients treated with probiotics and 0.807 for those treated with placebo ( $P = 0.198$ ). The 14-days illness severity status did not differ between groups.

**Conclusion:** In this preliminary study of patients with severe COVID-19, the use of oral probiotics *Streptococcus salivarius* K12 and *Lactobacillus brevis* CD2 did not prevent secondary bacterial pneumonia. NCT identifier: 05175833.

Key words: Probiotics, Coinfection, Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2, Pneumonia, Ventilator-Associated

## 1. INTRODUÇÃO

Desde dezembro de 2019 o mundo enfrenta a pandemia de COVID-19, uma doença viral sistêmica provocada pelo SARS-CoV2 (PAL et al., 2020; SHI et al., 2020). Até agora, 6 milhões de pessoas morreram de COVID-19 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022). Casos graves são tratados em unidade de terapia intensiva (UTI), recebendo suporte para falência de órgãos, como pneumonia viral com insuficiência respiratória (CHAKRABORTY *et al.*, 2020). Esses pacientes geralmente são intubados para ventilação mecânica, com riscos adicionais, como pneumonia bacteriana secundária (BERLIN; GULICK; MARTINEZ, 2020).

A cavidade oral pode ser porta de entrada para doenças bacterianas com acometimento sistêmico (SEMINARIO-AMEZ *et al.*, 2017). Abriga uma microbiota diversificada, composta por microrganismos comensais e patogênicos (ZHANG *et al.*, 2018), capazes de provocar infecções respiratórias. Fatores de risco adicionais, como má higiene oral, alterações salivares e doença periodontal podem facilitar a colonização de patógenos respiratórios na orofaringe, particularmente em pacientes de UTI (TEREZAKIS *et al.*, 2011). Intervenções que melhoram a higiene bucal podem reduzir a incidência de pneumonia em indivíduos de alto risco (HUA *et al.*, 2016; SCANNAPIECO; BUSH; PAJU, 2003). O uso de probióticos orais é um assunto atual e objeto de estudos (MISHRA;

RATH; MOHANTY, 2020). *Streptococcus salivarius* é um membro proeminente da microbiota do trato respiratório superior e alguns membros desta espécie exercem uma interferência bacteriana contra patógenos, incluindo *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* e *Haemophilus influenzae*, envolvido em faringite recorrente, amigdalite e otite média aguda (DOYLE *et al.*, 2018). Durante a ventilação mecânica, a placa dentária pode ser uma fonte de patógenos que podem levar à pneumonia secundária (SANDS *et al.*, 2016, 2017).

Um probiótico disponível comercialmente contendo *S. salivarius* sendo capaz de produzir substâncias semelhantes à bacteriocina com atividades inibitórias contra vários patógenos das vias aéreas *in vitro* e *in vivo*, além de propriedades imunomoduladoras *in vitro*. Estudos sugerem que *S. salivarius* K12 inibe a aderência pneumocócica bloqueando sítios de ligação bacteriana, embora outros mecanismos, como interferência direta pela ação de moléculas secretadas, também possam contribuir (DI PIERRO, 2020; MANNING *et al.*, 2016). O probiótico oral *Lactobacillus brevis* CD2 demonstrou inibir a mucosite oral em humanos (SHARMA *et al.*, 2016). Produz altos níveis de arginina deiminase, que inibe a produção de óxido nítrico, explicando suas propriedades anti-inflamatórias (MAEKAWA; HAJISHENGALLIS, 2014). Uma estratégia terapêutica para melhorar a qualidade da microbiota oral com reposição de probióticos benéficos pode ser útil para prevenir a colonização pulmonar por bactérias patogênicas.

A pneumonia associada à ventilação mecânica é responsável por pelo menos 25% da pneumonia bacteriana secundária em pacientes com COVID-19 grave. *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina foi o

agente causador em 47% dos casos (WU; ADHI; HIGHLAND, 2020). Micro-organismos comuns isolados de pacientes com infecções secundárias incluem *A baumannii*, *K pneumoniae*, *A flavus*, *C glabrata* e *C albicans* (CHEN *et al.*, 2020). Protocolos instituídos em UTI incluem monitoramento de sinais de infecção secundária em pacientes com COVID-19 grave, principalmente a partir de 48 horas da admissão. Tanto o longo curso da doença quanto o estado imunossuprimido colocam pacientes críticos com COVID-19 em alto risco de infecção secundária, causadas tanto por bactérias quanto por fungos (SHANG *et al.*, 2020). Nossa hipótese é que o uso de probióticos orais contendo *S. salivarius K12* e *L. brevis CD2* pode prevenir a ocorrência de pneumonia bacteriana secundária em pacientes de UTI com COVID-19 grave. Este ensaio clínico de fase 2 teve como objetivo avaliar o efeito dos referidos probióticos na prevenção da pneumonia bacteriana secundária nesta população.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### Covid-19

A partir de dezembro de 2019, um grupo de pacientes com pneumonia foi confirmado como infectado com um novo CoronaVirus (nCoV), que não era observado anteriormente em humanos. Em 7 de janeiro de 2020, o vírus recém-descoberto, causando uma infecção semelhante (SARS-CoV), foi inicialmente nomeado como nCoV 2019 e mais tarde foi chamado SARS-CoV-2 em fevereiro de 2020 (PAL *et al.*, 2020; SHI *et al.*, 2020).

A transmissão do novo coronavírus ocorre homem-a-homem por meio de gotículas provenientes de trato respiratório superior ou por contato direto. Estima-se que a infecção tenha um período médio de incubação de 6,4 dias e um número básico de reprodução de 2,24-3,58. Entre os pacientes com pneumonia causada por SARS-CoV-2, a febre tem sido o sintoma mais comum, seguido de tosse. O envolvimento pulmonar bilateral com opacidade em vidro fosco foi o achado mais comum nas imagens de tomografia computadorizada do tórax. As características clínicas dos 41 pacientes iniciais confirmados como infectados com SARS-CoV-2 incluíam doenças do trato respiratório inferior com febre, tosse seca e dispneia, semelhante à duas outras doenças causadas por coronavírus, Síndrome Respiratória Aguda Grave (*Severe Acute Respiratory Syndrome* [SARS], em inglês) e síndrome respiratória do Oriente Médio (*Middle East respiratory syndrome coronavirus* [MERS-CoV] em inglês) (SHI *et al.*, 2020).

O número de casos tem aumentado rapidamente: em 15 de fevereiro de 2020, mais de 60.000 casos de pneumonia por Covid-19 haviam sido relatados na China e em outros países do mundo (incluindo Tailândia, Japão, Coréia do Sul e EUA), e 1524 pacientes morreram, equivalente a uma taxa de mortalidade de cerca de 2% (SHI *et al.*, 2020). Na semana do dia 20 de março 2022, conforme documento da Organização Mundial da Saúde (World Health Organization [WHO], em inglês), o número de pessoas infectadas no mundo era de 468.202.755. O número total de óbitos no mundo era de 6.074.058. Neste mesmo dia, o Brasil somava 29.729.991 pessoas infectadas, e 657.998 óbitos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022). No dia 24 de março de 2020, em Passo Fundo/RS, somavam-se 57.668 casos, e 778 óbitos, tendo 296 casos ativos, sendo 14 pacientes internados em UTI e 13 em leitos clínicos (PMPF, 2022).

### **Pneumonia secundária em paciente com Covid-19 grave**

Pneumonia viral e bacteriana combinada e pneumonia bacteriana secundária por *Staphylococcus aureus* e outros patógenos comuns de pneumonia adquirida na comunidade foram melhor estudados na gripe sazonal e pandêmica e contribuem significativamente para a morbimortalidade. Pneumonia bacteriana secundária com infecção pelo vírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV) ocorreu como pneumonia associada à ventilação mecânica em pelo menos 25% dos pacientes em um único centro, sendo o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina o organismo causador em 47% dos casos, embora houvesse preocupação significativa com a transmissão cruzada (WU; ADHI;

HIGHLAND, 2020). Outro estudo relata que alguns pacientes, especialmente os gravemente enfermos, tiveram co-infecções por bactérias e fungos. As culturas bacterianas comuns de pacientes com infecções secundárias incluem *A baumannii*, *K pneumoniae*, *A flavus*, *C glabrata* e *C albicans* (CHEN *et al.*, 2020).

Especialistas sugerem monitoramento dos sinais de infecção secundária, especialmente em pacientes gravemente enfermos com COVID-19 que foram admitidos em UTI, principalmente a partir de 48 horas. Tanto o curso longo da doença quanto o estado imunossuprimido, colocam os pacientes graves e críticos com COVID-19 em alto risco de infecção secundária (incluindo bactérias e fungos) (SHANG *et al.*, 2020). Com base nas evidências do H1N1, a infecção secundária é muito comum em pacientes internados em UTI > 48 h (SCHAUWVLIEGHE *et al.*, 2018). Embora um sistema completo de prevenção e controle de infecção hospitalar tenha sido estabelecido em Wuhan, de acordo com as diretrizes disponíveis, pneumonia associada a ventilação mecânica e pneumonia adquirida no hospital foram ocorrências muito comuns na UTI, principalmente pelo esgotamento físico e emocional da equipe médica em virtude do uso equipamentos de proteção individual e uma sobrecarga de trabalho, causando uma implementação incompleta dessas medidas. Portanto, as estratégias para prevenção de infecção hospitalar devem ser efetivamente implementadas e amostras de sangue, escarro etc. devem ser coletadas rotineiramente para monitorar os sinais de infecção secundária (SHANG *et al.*, 2020).

Em exames pós-morte de paciente com Covid-19 positivos, é possível notar que as características macroscópicas do Covid-19 estão no tórax. Podem ser citadas: pleurisia, pericardite, consolidação pulmonar e

edema pulmonar. O peso pulmonar pode estar acima do normal, provavelmente devido a uma infecção secundária sobreposta à infecção viral, que pode levar a inflamação purulenta, mais típica de infecção bacteriana (HANLEY *et al.*, 2020).

### **Probióticos orais e infecção bacteriana de via aérea superior e inferior**

Os microrganismos isolados da cavidade oral podem migrar para as vias aéreas inferiores durante a ventilação mecânica (VM), levando à pneumonia associada a ventilação mecânica (PAVM). Após a inserção do tubo endotraqueal, podem ocorrer alterações no microambiente oral e no microbioma oral. Foi sugerida a hipótese de facilitar a colonização e proliferação de patógenos respiratórios e outros patógenos potencialmente exploradores em nichos orais e pulmonares. Os mecanismos subjacentes a essa 'mudança microbiana' não são claros, mas podem, em parte, ser devidos à presença física do tubo endotraqueal, que afeta a depuração da placa, o fluxo da saliva e a desidratação da mucosa, além das intervenções e medicações relacionadas ao manejo da condição subjacente durante doença crítica (BAO *et al.*, 2020; SANDS *et al.*, 2016).

As infecções do trato respiratório (ITRs) são uma das principais causas de morbimortalidade em todo o mundo. Patógenos virais são os agentes etiológicos mais comuns da doença respiratória aguda. Atualmente, os únicos antivirais e vacinas eficazes para a prevenção e tratamento de infecções por vírus respiratórios estão disponíveis contra vírus influenza e adenovírus (LEHTORANTA; PITKÄRANTA; KORPELA, 2014).

As microbiotas oral e do trato respiratório superior contêm grandes populações do gênero *Streptococcus*, com estreptococos comensais e patogênicos competindo por vários nichos usando uma variedade de estratégias. O *Streptococcus salivarius* é um membro de fundação numericamente proeminente da microbiota do trato respiratório superior e alguns membros desta espécie exercem uma interferência bacteriana contra *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* e *Haemophilus influenzae*, patógenos envolvidos na recorrência faringite, amigdalite e na otite média aguda (BAO *et al.*, 2020; DI PIERRO, 2020; DOYLE *et al.*, 2018; SANDS *et al.*, 2016)

A importância da microbiota do trato gastrointestinal na geração de respostas imunes da mucosa e tolerância à mucosa tem sido amplamente documentada e sua interação com a patologia respiratória é uma nova área para pesquisa (AHANCHIAN; JAFARI, 2016; PULVIRENTI *et al.*, 2019). Com base em uma revisão Cochrane de 14 ensaios clínicos randomizados, os probióticos foram melhores que o placebo na redução do número de episódios de infecções agudas do trato respiratório superior e na redução do uso de antibióticos, enquanto não houve diferenças na duração média de um episódio nem aumento de eventos adversos (HAO; DONG; WU, 2015).

Probióticos são definidos como microrganismos vivos que conferem um benefício à saúde do hospedeiro. Os tipos mais comuns de micróbios usados como probióticos são lactobacilos e bifidobactérias (LEHTORANTA; PITKÄRANTA; KORPELA, 2014; MAEKAWA; HAJISHENGALLIS, 2014).

Possíveis mecanismos de efeito antiviral de probióticos em infecções por vírus respiratórios: 1. Ligação direta ao vírus e inibição da

ligação do vírus ao receptor da célula hospedeira; 2. A adesão de probióticos na superfície epitelial pode bloquear os locais dos receptores virais de maneira inespecífica ou competindo por receptores específicos de carboidratos; 3. Os probióticos podem induzir a regeneração da mucosa: as mucinas intestinais podem se ligar a vírus e inibir sua adesão às células epiteliais; 4. Os probióticos também mostram atividade antimicrobiana direta contra vírus, produzindo substâncias antimicrobianas; 5. A indução da produção de óxido nítrico (ON) de baixo grau pode ter atividades antivirais; 6. Modulação das respostas imunes por meio de células epiteliais, macrófagos e células dendríticas; 7. Após a ativação, os linfócitos T CD8 + se diferenciam em linfócitos T citotóxicos, que destroem as células infectadas por vírus; 8. Os linfócitos T CD4 + diferenciam-se em células Th1 e Th2; 9. As células T auxiliares tipo 1 (Th1) ativam os fagócitos, promovendo a morte do vírus; 10. As células Th2 induzem a proliferação de células B, que viajam para os órgãos linfáticos secundários no tecido linfóide associado à mucosa e se diferenciam em células plasmáticas produtoras de imunoglobulina (Ig), que podem migrar de volta para o local da infecção; 11. Anticorpos secretores neutralizam o vírus (AHANCHIAN; JAFARI, 2016).

O *Streptococcus salivarius* é sugerido como uma espécie probiótica apropriada, uma vez que é um colonizador conhecido do trato respiratório superior em humanos e está disponível comercialmente como probiótico oral há mais de uma década. Foi demonstrado que produz substâncias do tipo bacteriocina com atividades inibitórias contra vários patógenos importantes das vias aéreas in vitro e in vivo, além de possuir propriedades imunomoduladoras in vitro. Os resultados sugerem que *S. salivarius* K12 inibe a aderência pneumocócica bloqueando os locais de

ligação pneumocócica, embora outros mecanismos, como a interferência direta pela ação de moléculas segregadas, também possam contribuir (LICCIARDI *et al.*, 2012; MANNING *et al.*, 2016).

Juntamente com outros comensais orais, o *Streptococcus salivarius* é um membro comum da microbiota eubiótica pulmonar e sua presença no pulmão se correlaciona com condições saudáveis ou mais estáveis. Os pacientes com Covid-19 têm uma microbiota pulmonar significativamente alterada, particularmente enriquecida por espécies de bactérias potencialmente patogênicas e marcadamente diferentes da de indivíduos saudáveis (HERNÁNDEZ-TERÁN *et al.*, 2021; ZHU *et al.*, 2020). A cepa K12 é a cepa mais estudada do *Streptococcus salivarius*. A colonização do trato respiratório superior com a cepa K12 leva a uma ocorrência significativamente reduzida de muitas infecções virais do trato respiratório, tanto em crianças quanto em adultos, possivelmente devido à sua capacidade de estimular a liberação de IFN- $\gamma$  e ativar células assassinas naturais sem desencadear respostas inflamatórias agressivas (DI PIERRO, 2020).

O probiótico *Lactobacillus brevis* CD2 demonstrou anteriormente inibir a inflamação gengival em humanos. A cepa CD2 de *L. brevis* (uma espécie de bactéria ácido-lática (LAB [*Lactic acid bacteria*, em inglês]) Gram-positiva em forma de bastonete) produz altos níveis de arginina desiminase, uma enzima que inibe a produção de óxido nítrico, competindo com o óxido nítrico sintase pelo mesmo substrato, arginina. Pensa-se que esta propriedade da arginina desiminase seja responsável pelos efeitos anti-inflamatórios de *L. brevis* CD2 (MAEKAWA; HAJISHENGALLIS, 2014). Tornou-se evidente nos últimos anos que a cavidade oral pode ser um importante reservatório de patógenos

bacterianos que causam doenças pulmonares. A incidência de colonização orofaríngea por patógenos respiratórios parece ser mais comum em pacientes com dentes ou dentaduras do que em pacientes desdentados que não usam dentaduras. Salivação diminuída e alterações do pH salivar podem promover a colonização por patógenos respiratórios. A má higiene bucal e a doença periodontal podem promover a colonização de patógenos respiratórios na orofaringe, e os pacientes hospitalizados ou que residem em um lar de idosos geralmente apresentam uma higiene oral pior do que os indivíduos da comunidade. Finalmente, várias intervenções orais que melhoram a higiene bucal resultam em uma redução na incidência pneumonia em indivíduos de alto risco (SCANNAPIECO; BUSH; PAJU, 2003; TAN *et al.*, 2019).

Estudos recentes mostraram que a cavidade oral serve como reservatório de infecção para patógenos respiratórios nosocomiais. Além disso, vários estudos controlados demonstraram que intervenções que reduzem a carga microbiana oral ou a colonização por patógenos respiratórios orais impedem a pneumonia nosocomial (BAO *et al.*, 2020). Os dados apoiam uma associação entre pneumonia hospitalar e saúde bucal ruim para indivíduos de alto risco (ou seja, pacientes em unidades de terapia intensiva e residentes em casas de repouso). Embora os biofilmes orais pareçam ser um importante reservatório para patógenos respiratórios, o papel da doença periodontal nessa associação não é claro e precisa ser abordado em estudos futuros (SCANNAPIECO; BUSH; PAJU, 2003).

A saliva dos pacientes com periodontite apresentou um nível significativamente maior de nitritos / nitratos quando comparados com indivíduos normais ( $P < 0,01$ ). A saliva dos pacientes com periodontite foi

analisada quanto aos níveis de nitrito / nitrato antes (T0) e após (T1) do tratamento com pastilhas contendo *L. brevis*. Em todos os pacientes, o tratamento foi associado a uma redução significativa nos níveis de nitrito e nitrato. Além disso, os níveis de PGE2 e IFN- $\gamma$  foram significativamente mais altos nos pacientes com periodontite do que nos controles ( $P < 0,01$ ). O tratamento com pastilhas contendo *L. brevis* foi associado a uma forte diminuição nos níveis dessas moléculas associadas à inflamação ( $P < 0,01$ ) (RICCIA *et al.*, 2007).

Os efeitos protetores de *L. brevis* CD2 contra a indução de inflamação periodontal e perda óssea podem estar relacionados, pelo menos em parte, a uma possível influência na microbiota associada à doença. Em uma análise microbiológica de ratos com periodontite induzida revelou que o tratamento tópico com *L. brevis* CD2 exerceu efeitos diferenciais nas microbiotas aeróbica e anaeróbica. Especificamente, o tratamento com *L. brevis* CD2 resultou em contagens significativamente mais altas de bactérias aeróbicas e, inversamente, em números significativamente mais baixos de bactérias anaeróbicas em comparação ao grupo controle tratado com placebo ( $P < 0,01$ ). Como as bactérias associadas à periodontite são predominantemente (se não exclusivamente) anaeróbicas, esse achado sugere que o tratamento com *L. brevis* CD2 pode inibir a periodontite, pelo menos em parte, por meio da modulação da microbiota periodontal (MAEKAWA; HAJISHENGALLIS, 2014).

### 3. PROPOSIÇÃO

Esse estudo tem por objetivo testar a hipótese de que o tratamento com um composto de probióticos (*Streptococcus salivarius K12* e *Lactobacillus brevis CD2*) em pacientes com COVID-19 grave em início de ventilação mecânica, é eficaz na prevenção da pneumonia bacteriana secundária, podendo reduzir o estado de gravidade da doença no 14º dia de internação e aumentar a sobrevida.

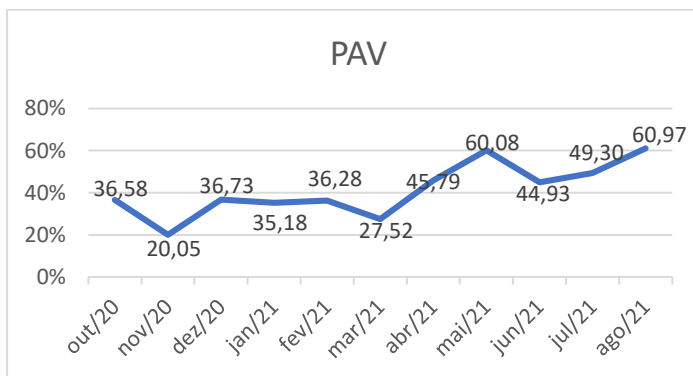
## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### Desenho de pesquisa, Cenário e Participantes

Este foi um ensaio clínico de fase 2 randomizado, duplo-cego, controlado por placebo, de grupos paralelos. Todos os participantes incluídos estavam internados na UTI do Hospital das Clínicas de Passo Fundo (HCPF). O período de inclusão foi de 10/09/2020 a 25/01/2021. Esta instituição é referência regional para o tratamento da COVID-19, com UTI especializada para esta condição, atendendo uma população estimada acima de 2.000.000 habitantes.

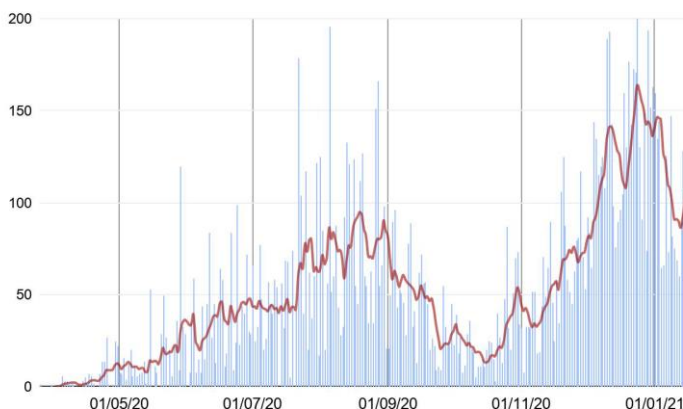
Dados do Serviço de Controle de Infecção Hospitalar do Hospital de Clínicas de Passo Fundo (SCIH/HCPF) demonstram a evolução de diagnósticos de PAV (gráfico 1) durante os meses de intervenção do pesquisador na UTI (outubro/2020 a março/2021) e logo após o término da coleta de dados (abril/2021 a agosto/2021)

*Gráfico 1: Diagnósticos de PAV (Número de PAV no mês / número de paciente-dia em VM) x 1000)*

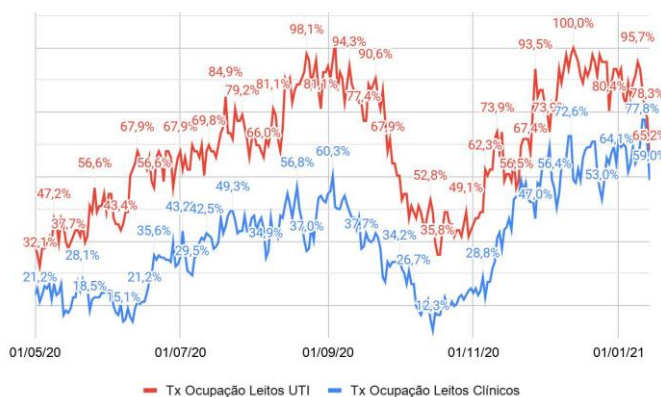


Conforme dados da Secretaria de Saúde da cidade de Passo Fundo/RS, no início do protocolo do estudo, tínhamos uma curva ascendente de casos confirmados, bem como uma elevação nas internações em UTI (gráficos 2 e 3)(PMPF, 2021).

*Gráfico 2- Casos confirmados por dia em Passo Fundo e média móvel (atualizado em 14/01/2021)*



*Gráfico 3- Taxa de ocupação de leitos adultos COVID-19 UTI e Clínico (atualizado em 14/01/2021)*



Pacientes adultos com diagnóstico suspeito ou confirmado de COVID-19 que se apresentaram ao HCPF com síndrome respiratória aguda grave, necessitando de internação em UTI, foram convidados a participar. Os critérios de inclusão foram: i. Pacientes internados na UTI com síndrome respiratória aguda grave, com piora do estado ventilatório nas primeiras 48 horas, com risco de progressão para ventilação mecânica; ii. Diagnóstico confirmado de COVID-19 em até 3 dias da admissão na UTI; iii. Aceitação para participar. Os critérios de exclusão foram: i. Imunodeficiência relevante, como quimioterapia, HIV descompensado e câncer agressivo; ii. Doença sistêmica descompensada antes do início do COVID-19. O diagnóstico laboratorial de COVID-19 foi realizado com análise de secreções nasofaríngeas, coletadas por profissionais de saúde. As amostras foram avaliadas com teste de amplificação de ácido nucleico (RT-PCR) e/ou detecção de antígeno com tecnologia de base imunológica (LAI; LAM, 2021).

Este projeto seguiu as normas da Declaração de Helsinque e foi realizado após aprovação do Comitê de Ética do HCPF e do Comitê de Ética em Pesquisa da UPF/CONEP (número 4.240.135). Os pacientes foram incluídos após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, pelo próprio paciente ou seu responsável.

### **Gerenciamento de UTI**

Os pacientes seguiram a rotina clínica praticada na UTI do HCPF. Receberam suporte ventilatório (não invasivo ou invasivo), hemodinâmico, nutricional, entre outros, além de tratamento direcionado para COVID-19 em casos graves, utilizando medicamentos a critério do protocolo hospitalar. Pacientes com suspeita de infecção bacteriana

sobreposta receberam antibioticoterapia de amplo espectro. O monitoramento do estado pulmonar foi realizado com exames de rotina, incluindo laboratoriais, de imagem e microbiologia, além de avaliação frequente à beira do leito pela equipe da UTI.

### **Prevenção da PAV na UTI**

A instituição possui acreditação ONA (Organização Nacional de Acreditação), sendo a segurança do paciente e a redução das infecções relacionadas à assistência à saúde critérios avaliados para obtenção do certificado. É necessário ressaltar também que a instituição segue as recomendações da ANVISA para a prevenção da PAV (elevação da cabeceira do leito, avaliação da sedação e bloqueio neuromuscular, aspiração da cavidade oral e higiene oral com clorexedina 0,12%)

### **Probiótico e placebo**

Os pacientes foram tratados com um gel contendo *Streptococcus salivarius* K12 (2 bilhões de bacilos vivos) e *Lactobacillus brevis* CD2 (4 bilhões de bacilos vivos) ou placebo. Os probióticos e placebo foram preparados em sachê contendo um grama de gel, pela farmácia de manipulação Natupharma (probióticos comercializados pela Fragon, Holanda). Esses probióticos estão isentos de registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Cada paciente recebeu 1 grama de gel oral a cada 8 horas por 7 dias, aplicado pelo pesquisador (JL), iniciando a partir da inclusão do paciente no estudo.

## **Desfechos**

O desfecho principal foi a ocorrência de pneumonia bacteriana secundária, suspeitada por critérios clínicos, laboratoriais e de imagem, e confirmada após identificação da bactéria em cultura de escarro. A pneumonia bacteriana secundária foi identificada de acordo com os parâmetros atuais da literatura (WU; ADHI; HIGHLAND, 2020): febre nova ou recrudescente; início ou mudança no caráter do escarro; nova leucocitose e/ou nova neutrofilia; achados de imagem novos e relevantes; necessidade nova ou crescente de suporte de oxigênio. Outras fontes de infecções hospitalares, como a permanência de cateteres venosos centrais ou cateteres urinários, também foram consideradas. Em pacientes intubados, pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) foi definida como pneumonia iniciada 48 horas ou mais após a intubação endotraqueal sem evidência de pneumonia bacteriana no momento da intubação (AMERICAN THORACIC SOCIETY; INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA, 2005; KOULENTI; TSIGOU; RELLO, 2017). Os desfechos secundários foram sobrevida hospitalar após admissão na UTI, estado de gravidade da doença em 14 dias e efeitos adversos relacionados à administração de probióticos orais. A sobrevida foi definida como o tempo em dias desde a admissão na UTI até a morte do paciente ou alta hospitalar (utilizando estimativas de Kaplan-Meier). O estado de gravidade da doença em 14 dias foi adaptado do estudo de Somers e colaboradores (SOMERS *et al.*, 2021). A partir de um escore ordinal com seis escalas calculado no 28º dia de admissão na UTI, simplificamos o escore para quatro escalas estado de gravidade da doença, definido no 14º dia, da seguinte forma: 1. Alta da UTI com vida; 2. Na UTI/sem ventilação mecânica; 3. Na UTI/em ventilação mecânica; 4.

Falecido. Em caso de efeitos adversos relacionados ao uso de probióticos, considerando efeitos orais ou sistêmicos, seriam registrados no prontuário do paciente. Quando havia suspeita de efeito adverso grave, a CONEP seria imediatamente informada.

### **Tamanho da amostra**

O número de pacientes foi estimado de acordo com o desfecho “incidência de pneumonia bacteriana secundária”. Considerando como 65% (MARJANOVIC *et al.*, 2017; SANTI; SANTOS, 2016) a probabilidade de ocorrência deste desfecho sem tratamento (placebo), redução para 30% após o uso de tratamento experimental (probióticos), teste bilateral para alfa 0,05 e poder 0,8, o número de participantes em cada grupo foi 30. Assim, o tamanho total estimado da amostra foi de 60 pacientes.

### **Protocolo de estudo**

Todas as atividades de pesquisa foram realizadas na UTI. Após preencher os critérios de elegibilidade e assinar o consentimento informado, cada paciente foi sorteado para receber um probiótico ou placebo. Os tratamentos foram codificados com números aleatórios gerados por computador (grupos com dois tratamentos 1:1 = probiótico: placebo) (Figura 1), sendo acondicionados em blocos de 4 tratamentos (dois placebos e dois probióticos). A lista de códigos ficou sob responsabilidade do farmacêutico pesquisador, para divulgação após análise dos dados. Os códigos foram acondicionados em envelope pardo para serem retirados pelo paciente ou seu familiar. Ao término de cada bloco de quatro códigos de tratamento, eram incluídos os próximos quarto

a serem sorteados. Os géis eram idênticos, de modo que nem os pesquisadores nem os pacientes/familiares sabiam qual tratamento estava sendo oferecido (Figura 2). A cada visita do pesquisador à UTI, o paciente era examinado para verificação do estado bucal e odontológico. Em seguida, foi realizada higiene bucal e aplicação do gel com probióticos ou placebo (Figura 3, 4 e 5). Este procedimento foi repetido 3 vezes ao dia (a cada 8 horas) durante 7 dias, sempre pelo mesmo pesquisador (JL). Quaisquer reações no local da aplicação (boca) foram monitoradas e registradas diariamente pelo pesquisador que aplicou os tratamentos. A ocorrência de eventos pulmonares incomuns, em qualidade (sintomas e achados laboratoriais/imagens) e/ou quantidade (intensidade das manifestações), potencialmente relacionados ao uso de probióticos, foi monitorada pelo pneumologista responsável. Os pesquisadores responsáveis se comprometeram a notificar a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa em até 24 horas se constatassem eventos adversos graves. A ocorrência de eventos adversos graves também foi observada por um comitê independente de monitoramento de dados e segurança, composto por dois médicos com experiência na área (um pneumologista e um intensivista).



Figura 1: Embalagem com código aleatório



Figura 2: Embalagem contendo gel



Figura 3: Higiene oral com gaze e Clorexedina 0,12%



Figura 4: Aplicação do gel oral



Figura 5: Aplicação do gel oral

## **Análise estatística**

As características basais são descritas usando média e desvio padrão ou frequências absolutas e percentuais. Os testes *t* de Student e exato de Fisher foram empregados para comparar os braços de tratamento para as variáveis basais. Para descrever a associação entre tratamento e pneumonia bacteriana secundária ou gravidade da doença, estimamos o risco relativo (RR) usando regressão de Poisson com variância robusta. Curvas de Kaplan-Meier e teste de log rank foram empregados para analisar os dados de sobrevida. Os tratamentos foram mantidos às cegas entre pesquisadores e pacientes. Os dados foram analisados com os softwares SPSS v.18 e WinPEPI. Consideramos  $P < 0,05$  como indicativo de significância estatística.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### **Pacientes**

Setenta pacientes foram convidados a participar. No início da pesquisa, dez pacientes foram excluídos, sendo seis pela não confirmação de COVID-19 e quatro por desistência da participação. Entre 60 pacientes com COVID-19 que continuaram no estudo, 32 foram tratados com probióticos (72% homens, 56,6 anos) e 28 receberam placebo (68% homens, 60,4 anos). Dos 60 pacientes que iniciaram o experimento, 10 foram excluídos antes do término do estudo: 6 tratados com probióticos (5 altas precoce da UTI e 1 óbito) e 4 tratados com placebo (3 altas precoce e 1 óbito). Foram analisados 50 pacientes que completaram a intervenção de 7 dias (Tabela 1). Os homens eram aproximadamente três quartos dos participantes em ambos os braços de tratamento, com idade próxima a 60 anos. A comorbidade mais prevalente foi a hipertensão arterial sistêmica, enquanto que diabetes e obesidade foram observados em cerca de 35% dos indivíduos, em frequências igualmente distribuídas entre os braços de tratamento. Quase três quartos dos participantes necessitaram de ventilação mecânica durante a permanência na UTI, independentemente do uso de probióticos ou placebo. A maioria dos diagnósticos de COVID-19 foi confirmado por RT-PCR em ambos os grupos (probiótico 69%: 87% placebo;  $P = 0,175$ ).

### **Segurança de probióticos e placebo**

Entre 60 pacientes com COVID-19 confirmado que iniciaram o tratamento com probióticos ou placebo, 50 completaram o teste de 7 dias. Entre os 10 excluídos, 8 receberam alta e dois morreram (probiótico 1:1

placebo). Todas as sessões de tratamento foram executadas pelo primeiro autor, sem relato de efeito adverso grave inequivocamente relacionado com o gel oral aplicado.

*Tabela 1: Características basais de pacientes que completaram o tratamento de 7 dias de probióticos e placebo (n = 50)*

|                                | Probióticos<br>N = 26 | Placebo<br>N = 24 | P       |
|--------------------------------|-----------------------|-------------------|---------|
| Homens, n (%)                  | 21 (81)               | 17 (71)           | 0.514*  |
| Idade em anos, média ± DS      | 58.7 ± 15.8           | 60.5 ± 13.2       | 0.677** |
| RT-PCR/antígeno §              | 18/8                  | 21/3              | 0.175   |
| Comorbidades, n (%)            |                       |                   |         |
| Hipertensão                    | 14 (54)               | 17 (71)           | 0.295*  |
| Diabetes                       | 6 (23)                | 11 (46)           | 0.136*  |
| Obesidade                      | 9 (35)                | 9 (38)            | 0.999*  |
| DPOC/asma§§                    | 3 (12)                | 2 (8)             | 0.999*  |
| Ventilação mecânica, n (%)     | 19 (73)               | 16 (67)           | 0.760*  |
| Dias em VM, média (AIQ25%-75%) | 11 (7-15)             | 17 (8.3-23.3)     | 0.071   |

\*Fisher exact test; \*\*Student *t*-test; §Teste laboratorial para confirmar COVID-19; §§Doença pulmonar obstrutiva crônica e/ou asma

### Pneumonia bacteriana secundária

Entre 50 pacientes que completaram o estudo de 7 dias, a incidência de pneumonia bacteriana foi de 35% (n = 9) em pacientes tratados com probiótico e 54% (n = 13) naqueles tratados com placebo [risco relativo: 0,64 (95% IC: 0,34 – 1,22); P = 0,173]. Todos os pacientes que desenvolveram pneumonia bacteriana necessitaram de ventilação mecânica durante a permanência na UTI. Onze espécies bacterianas foram isoladas da cultura de escarro como causadoras de pneumonia em 22 pacientes (Tabela 2). As espécies mais comuns em ambos os braços de tratamento foram cepas gram negativas, principalmente *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabela 2: Espécies bacterianas isoladas a partir de análise de escarro de pacientes com COVID-19 grave e pneumonia bacteriana secundária (n = 22 pacientes)

|                                | Probióticos<br>N (%) em 9 pacientes | Placebo<br>N (%) em 13 pacientes* |
|--------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>   | 5 (55)                              | 4 (31)                            |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  | 3 (33)                              | 5 (38)                            |
| <i>Klebsiella aerogenes</i>    | -                                   | 1 (8)                             |
| <i>Escherichia coli</i>        | -                                   | 1 (8)                             |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | -                                   | 2 (16)                            |
| <i>Enterococcus spp</i>        | 1 (11)                              | -                                 |
| <i>Serratia marcescens</i>     | 1 (11)                              | 1 (8)                             |

|                                     |        |       |
|-------------------------------------|--------|-------|
| <i>Staphylococcus aureus</i>        | 1 (11) | -     |
| <i>Enterobacter cloacae</i>         | -      | 1 (8) |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | 1 (11) | -     |
| <i>Burkholderia cepacia</i>         | -      | 1 (8) |

---

\**Candida albicans* foi identificado no escarro de um paciente.

### **Sobrevivência**

As curvas de sobrevivência não diferiram entre os pacientes tratados com probióticos e placebo (log rank  $P = 0,198$ ). A probabilidade de sobrevida cumulativa no dia 14 foi de 0,835 para pacientes que receberam probióticos e 0,807 para aqueles tratados com placebo. O tempo médio de sobrevida estimado pela análise de sobrevida foi de 19 dias para pacientes tratados com probióticos e 31 dias para pacientes tratados com placebo. Todos os 15 pacientes tratados apenas com ventilação não invasiva sobreviveram (probióticos 7:8 placebo) e receberam alta da UTI.

### **Estado de gravidade da doença no 14º dia**

O estado de gravidade da doença no 14º dia não diferiu entre os pacientes tratados com probióticos e placebo ( $P = 0,714$ ; Tabela 3). Ao agruparmos o estado mais grave 3 (Na UTI em ventilação mecânica) e 4 (Falecido) para comparação com o estado 1 (Alta) e 2 (Na UTI sem ventilação mecânica) como grupo de referência, observamos que os pacientes tratados com probióticos apresentaram risco relativo menor,

mas não significativo, de status 3 ou 4 no dia 14 [RR 0,72 (IC95% 0,41-1,27); P = 0,263].

**Tabela 3.** Associação entre tratamentos e estado de gravidade da doença no 14º dia: risco relativo de uma condição mais grave para pacientes tratados com probióticos.

| Gravidade   | RR   | 95% IC    | p     | Pacientes em cada Status |           |
|-------------|------|-----------|-------|--------------------------|-----------|
|             |      |           |       | Probióticos              | Placebo   |
| 2 vs. 1     | 1.33 | 0.30-5.93 | 0.706 | 4 vs. 11                 | 2 vs. 8   |
| 3 vs. 1+2   | 0.64 | 0.30-1.35 | 0.239 | 7 vs. 15                 | 10 vs. 10 |
| 4 vs. 1+2.3 | 0.92 | 0.26-3.29 | 0.902 | 4 vs. 22                 | 4 vs. 20  |
| 3+4 vs. 1+2 | 0.72 | 0.41-1.27 | 0.263 | 11 vs. 15                | 14 vs. 10 |

Gravidade: 1. Alta vivo; 2. Na UTI/Sem VM; 3. Na UTI/Em VM; 4. Falecido. Comparação entre os grupos de tratamento para todos os estados de gravidade: teste exato de Fisher p = 0.714.

## DISCUSSÃO

“Potenciais benefícios dos probióticos no COVID-19” está agora no título de muitos manuscritos publicados (BAINDARA *et al.*, 2021; BAUD *et al.*, 2020; GIANNONI *et al.*, 2020; HU *et al.*, 2021), mas os relatórios originais ainda são escassos (PAWAR *et al.*, 2021) . Este estudo

teve como objetivo abordar se os probióticos orais *Streptococcus salivarius* K12 e *Lactobacillus brevis* CD2 podem prevenir pneumonia bacteriana secundária em pacientes com COVID-19 graves tratados em UTI. Nossa hipótese é que os probióticos mencionados acima podem prevenir a colonização pulmonar com patógenos orais e consequente pneumonia bacteriana, uma complicação importante que pode aumentar a mortalidade, o sofrimento e os custos de pacientes graves com COVID-19.

Neste ensaio clínico randomizado de fase 2, os principais achados foram: 1. As incidências de pneumonia bacteriana secundária em pacientes tratados com probióticos orais e placebo foram de 35% versus 54%, sem significância estatística; 2. A sobrevida e o estado de gravidade da doença no dia 14 foram semelhantes entre os pacientes tratados com probióticos e placebo; 3. Nenhum efeito adverso grave foi identificado devido à aplicação de probióticos orais; e 4. Entre os patógenos envolvidos na pneumonia bacteriana secundária, a maioria eram bactérias gram negativas, independentemente do tratamento com probióticos e placebo.

Entre 50 pacientes que completaram o teste de 7 dias de probióticos ou placebo, a incidência de pneumonia bacteriana secundária foi 19% menor no tratamento com probiótico (probióticos 35% versus 54% placebo). O status de gravidade da doença também foi menor para usuários de probióticos. Apesar de não serem estatisticamente significativos, esses resultados favorecem o uso de probióticos. Todos os pacientes que desenvolveram infecção bacteriana estavam em ventilação mecânica, caracterizando pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) (PAPAZIAN; KLOMPAS; LUYT, 2020). A provável explicação

para a falta de diferença entre os tratamentos é o número limitado de participantes, típico de um estudo de fase 2. Uma revisão Cochrane envolvendo 18 ensaios clínicos randomizados (6.016 participantes) concluiu que os cuidados com a higiene bucal reduzem o risco de desenvolver pneumonia associada à ventilação mecânica em pacientes críticos de 24% para cerca de 18% (HUA *et al.*, 2016). Em um estudo que avaliou a adesão das medidas de prevenção da PAV, a higiene oral teve a menor adesão (77,3%), quando comparada as outras medidas (cabeceira em 30 – 45° [88,7%], posição do filtro [94%], pressão do balonete [91,7%]) (SILVA LOURENÇONE *et al.*, 2019). O controle da higiene oral durante a permanência do pesquisador na UTI pode ser o motivo pela redução das PAV esperada (65%), tendo em vista o aumento após o término do protocolo de estudo (MARJANOVIC *et al.*, 2017; TANTIPONG *et al.*, 2008). Com base nos dados preliminares do presente estudo, seria necessário um ensaio com 224 pacientes (112 recebendo probióticos e 112 tratados com placebo) para atingir um risco relativo de 0,64 com intervalo de confiança de 95% abaixo da unidade, apoiando que o probiótico oral preveniria pneumonia bacteriana secundária em COVID-19 grave. Estudos futuros são necessários para confirmar esse efeito potencial.

No dia 14 após a admissão na UCI, a sobrevida e o estado de gravidade da doença foram semelhantes entre os pacientes tratados com probióticos e placebo. Aproximadamente 80% dos pacientes estavam vivos no dia 14, independentemente do uso de probióticos ou placebo. Hua e colegas também não encontraram benefício dos cuidados de higiene bucal na sobrevivência e morbidades relacionadas à UTI (HUA *et al.*, 2016).

O uso de probióticos é geralmente considerado seguro (DIDARI *et al.*, 2014), embora estudos com pacientes de UTI tenham relatado sepse, fungemia e isquemia gastrointestinal (MARTEAU; SHANAHAN, 2003). Tais estudos focaram em probióticos que atuam no lúmen intestinal e não na cavidade oral. No presente estudo, nenhum efeito adverso grave foi identificado devido à aplicação de probióticos orais. Destaca-se que todos os procedimentos de aplicação de gel oral foram realizados por um dentista único, fortalecendo a metodologia do estudo. Probióticos contendo *Streptococcus salivarius* e *Lactobacillus brevis* foram recentemente testados em ensaios clínicos randomizados e mostraram benefício para várias condições bucais (MOUSQUER *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2021).

Entre 22 pacientes que desenvolveram pneumonia bacteriana secundária, os principais patógenos foram bactérias Gram-negativas, principalmente *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. Todos esses pacientes estavam sob ventilação mecânica durante a permanência na UTI, um forte fator de risco para colonização pulmonar com patógenos do sistema aerodigestivo superior, incluindo bactérias orais (PAPAZIAN; KLOMPAS; LUYT, 2020). Os microrganismos Gram-negativos habituais envolvidos na PAV são *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e espécies de *Acinetobacter*, enquanto *Staphylococcus aureus* é a principal bactéria Gram-positiva (DI PASQUALE *et al.*, 2014; LUYT *et al.*, 2018). No presente estudo, um tratamento de sete dias com probióticos orais iniciado na admissão na UTI tentou proteger contra PAV de início precoce, ocorrendo nos primeiros quatro dias de internação (KALIL *et al.*, 2016).

Este estudo tem limitações. O tamanho limitado da amostra impossibilitou a obtenção de significância estatística em relação ao desfecho principal do estudo, enquanto a falta de demonstração in vitro dos efeitos antibacterianos contra os principais patógenos pulmonares pode esclarecer o mecanismo de ação dos probióticos testados.

No entanto, os dados apontam para um efeito benéfico dos probióticos e, se estudos adicionais e maiores confirmarem que os probióticos orais previnem a pneumonia bacteriana secundária, esse tratamento pode ser testado não apenas para pacientes com COVID-19, mas também em todos os pacientes que eventualmente precisem de suporte invasivo para insuficiência pulmonar, ampliando a generalização do uso de probióticos em pacientes de UTI.

## 6. CONCLUSÕES

Executamos um ensaio clínico randomizado de fase 2 para avaliar se um probiótico oral contendo *Streptococcus salivarius* K12 e *Lactobacillus brevis* CD2 pode prevenir pneumonia bacteriana secundária em pacientes com COVID-19 grave. A incidência desse desfecho foi de 35% nos pacientes tratados com probiótico e 54% naqueles que receberam placebo, apontando para um efeito benéfico, mas sem significância estatística. Por causa disso, estudos maiores são necessários para confirmar ou refutar um efeito preventivo dos probióticos orais contra pneumonia bacteriana secundária em pacientes graves com COVID-19.

## REFERÊNCIAS

- AHANCHIAN, Hamid; JAFARI, Seyed Ali. Probiotics and Prebiotics for Prevention of Viral Respiratory Tract Infections. *In: PROBIOTICS, PREBIOTICS, AND SYNBIOTICS: BIOACTIVE FOODS IN HEALTH PROMOTION*. [S. l.]: Elsevier Inc., 2016. p. 575–583.
- AMERICAN THORACIC SOCIETY; INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *American journal of respiratory and critical care medicine*, [s. l.], v. 171, n. 4, 2005, p. 388–416. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15699079>.
- BAINDARA, P. *et al.* Oral probiotics in coronavirus disease 2019: connecting the gut–lung axis to viral pathogenesis, inflammation, secondary infection and clinical trials. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2021.
- BAO, Lirong *et al.* Oral Microbiome and SARS-CoV-2: Beware of Lung Co-infection. [S. l.]: Frontiers Media S.A., 2020.
- BAUD, David *et al.* Using Probiotics to Flatten the Curve of Coronavirus Disease COVID-2019 Pandemic. *Frontiers in Public Health*, [s. l.], v. 8, 2020.
- BERLIN, David A.; GULICK, Roy M.; MARTINEZ, Fernando J. Severe Covid-19. *New England Journal of Medicine*, [s. l.], v. 383, n. 25, p. 2451–2460, 2020.
- CHAKRABORTY, C *et al.* SARS-CoV-2 causing pneumonia-associated respiratory disorder (COVID-19): diagnostic and proposed therapeutic options. *European review for medical and pharmacological sciences*, [s. l.], v. 24, n. 7, p. 4016–4026, 2020. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32329877>. Acesso at: 26 Mar. 2022.
- CHEN, Nanshan *et al.* Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *The Lancet*, [s. l.], v. 395, n. 10223, p. 507–513, 2020.
- DI PASQUALE, Marta *et al.* Assessment of severity of ICU-acquired pneumonia and association with etiology. *Critical Care Medicine*, [s. l.], v. 42, n. 2, p. 303–312, 2014.
- DI PIERRO, Francesco. A possible probiotic (*S. salivarius* K12) approach to improve oral and lung microbiotas and raise defenses against SAR S-CoV-2. [S. l.]: Edizioni Minerva Medica, 2020.

DIDARI, Tina *et al.* A systematic review of the safety of probiotics. [S. l.: s. n.], 2014.

DOYLE, Hélène *et al.* Effect of Oral Probiotic *Streptococcus salivarius* K12 on Group A *Streptococcus* Pharyngitis: A Pragmatic Trial in Schools. *Pediatric Infectious Disease Journal*, [s. l.], v. 37, n. 7, p. 619–623, 2018.

GIANNONI, Eric *et al.* Probiotics and COVID-19. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, [s. l.], v. 5, n. 8, p. 720–721, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2468125320301953>.

HANLEY, Brian *et al.* Autopsy in suspected COVID-19 cases. *Journal of Clinical Pathology*, [s. l.], v. 73, n. 5, p. 239–242, 2020.

HAO, Qiukui; DONG, Bi Rong; WU, Taixiang. Probiotics for preventing acute upper respiratory tract infections. [S. l.]: John Wiley and Sons Ltd, 2015.

HERNÁNDEZ-TERÁN, Alejandra *et al.* Dysbiosis and structural disruption of the respiratory microbiota in COVID-19 patients with severe and fatal outcomes. *Scientific Reports*, [s. l.], v. 11, n. 1, 2021.

HU, Jielun *et al.* Review article: Probiotics, prebiotics and dietary approaches during COVID-19 pandemic. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2021.

HUA, Fang *et al.* Oral hygiene care for critically ill patients to prevent ventilator-associated pneumonia. [S. l.]: John Wiley and Sons Ltd, 2016.

KALIL, Andre C. *et al.* Management of Adults With Hospital-acquired and Ventilator-associated Pneumonia: 2016 Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. [S. l.]: Oxford University Press, 2016.

KOULENTI, D.; TSIGOU, E.; RELLO, J. Nosocomial pneumonia in 27 ICUs in Europe: perspectives from the EU-VAP/CAP study. [S. l.]: Springer Verlag, 2017.

LAI, Christopher K.C.; LAM, Wilson. Laboratory testing for the diagnosis of COVID-19. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, [s. l.], v. 538, p. 226–230, 2021.

LEHTORANTA, L.; PITKÄRANTA, A.; KORPELA, R. Probiotics in respiratory virus infections. [S. l.]: Springer Verlag, 2014.

LICCIARDI, Paul v. *et al.* Protecting against pneumococcal disease: Critical interactions between probiotics and the airway microbiome. *PLoS Pathogens*, [s. l.], v. 8, n. 6, 2012.

LUYT, Charles Edouard *et al.* Microbial cause of ICU-acquired pneumonia: Hospital-acquired pneumonia versus ventilator-associated pneumonia. [S. l.]: Lippincott Williams and Wilkins, 2018.

MAEKAWA, T.; HAJISHENGALLIS, G. Topical treatment with probiotic *Lactobacillus brevis* CD2 inhibits experimental periodontal inflammation and bone loss. *Journal of Periodontal Research*, [s. l.], v. 49, n. 6, p. 785–791, 2014.

MANNING, Jayne *et al.* Investigation of *Streptococcus salivarius*-mediated inhibition of pneumococcal adherence to pharyngeal epithelial cells. *BMC Microbiology*, [s. l.], v. 16, n. 1, 2016.

MARJANOVIC, Nicolas *et al.* Multicentre randomised controlled trial to investigate the usefulness of continuous pneumatic regulation of tracheal cuff pressure for reducing ventilator-associated pneumonia in mechanically ventilated severe trauma patients: The AGATE study protocol. *BMJ Open*, [s. l.], v. 7, n. 8, 2017.

MARTEAU, Philippe; SHANAHAN, Fergus. Basic aspects and pharmacology of probiotics: An overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects. *Bailliere's Best Practice and Research in Clinical Gastroenterology*, [s. l.], v. 17, n. 5, p. 725–740, 2003.

MISHRA, Sumita; RATH, Shakti; MOHANTY, Neeta. Probiotics—A complete oral healthcare package. [S. l.]: Elsevier (Singapore) Pte Ltd, 2020.

MOUSQUER, Camila Rafaela *et al.* Are *Lactobacillus salivarius* G60 and inulin more efficacious to treat patients with oral halitosis and tongue coating than the probiotic alone and placebo? A randomized clinical trial. *Journal of Periodontology*, [s. l.], v. 91, n. 6, p. 775–783, 2020.

PAL, Mahendra *et al.* Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2): An Update. *Cureus*, [s. l.], v. 2, n. 3, 2020.

PAPAZIAN, Laurent; KLOMPAS, Michael; LUYT, Charles Edouard. Ventilator-associated pneumonia in adults: a narrative review. [S. l.]: Springer, 2020.

PAWAR, Kirti S. *et al.* Oral Curcumin With Piperine as Adjuvant Therapy for the Treatment of COVID-19: A Randomized Clinical Trial. *Frontiers in Pharmacology*, [s. l.], v. 12, 2021.

PMPF. Boletim Epidemiológico 24/03/2022. Passo Fundo: [s. n.], 2022. Disponível em: [https://www.pmpf.rs.gov.br/prevencao-do-coronavirus/wp-content/uploads/sites/60/2021/12/boletim\\_diario\\_coronavirus\\_24032022.jpg](https://www.pmpf.rs.gov.br/prevencao-do-coronavirus/wp-content/uploads/sites/60/2021/12/boletim_diario_coronavirus_24032022.jpg). Acesso at: 26 Mar. 2022.

PMPF. Boletim Epidemiológico Semanal 14/10/2021. [S. l.: s. n.], 2021. Disponível em: [https://www.pmpf.rs.gov.br/prevencao-do-coronavirus/wp-content/uploads/sites/60/2021/10/boletim\\_semanal\\_coronavirus\\_14102021.jpg](https://www.pmpf.rs.gov.br/prevencao-do-coronavirus/wp-content/uploads/sites/60/2021/10/boletim_semanal_coronavirus_14102021.jpg). Acesso at: 26 Mar. 2022.

content/uploads/sites/60/2021/12/boletim\_epidemiologico\_semanal\_14012021.pdf. Acesso at: 19 May 2022.

PULVIRENTI, Giulio *et al.* Lower airway microbiota. [S. l.]: Frontiers Media S.A., 2019.

RICCIA, D. N.Della *et al.* Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus brevis* (CD2) on periodontal disease. *Oral Diseases*, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 376–385, 2007.

SANDS, Kirsty M. *et al.* Microbial profiling of dental plaque from mechanically ventilated patients. *Journal of Medical Microbiology*, [s. l.], v. 65, n. 2, p. 147–159, 2016.

SANDS, Kirsty M. *et al.* Respiratory pathogen colonization of dental plaque, the lower airways, and endotracheal tube biofilms during mechanical ventilation. *Journal of Critical Care*, [s. l.], v. 37, p. 30–37, 2017.

SANTI, Samantha Simoni; SANTOS, Rubem Beraldo. A prevalência da pneumonia nosocomial e sua relação com a doença periodontal: revisão de literatura. *Revista da Faculdade de Odontologia - UPF*, [s. l.], v. 21, n. 2, 2016.

SCANNAPIECO, Frank A.; BUSH, Renee B.; PAJU, Susanna. Associations Between Periodontal Disease and Risk for Nosocomial Bacterial Pneumonia and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. A Systematic Review. *Annals of Periodontology*, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 54–69, 2003. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1902/annals.2003.8.1.54>.

SCHAUWVLIEGHE, Alexander F.A.D. *et al.* Invasive aspergillosis in patients admitted to the intensive care unit with severe influenza: a retrospective cohort study. *The Lancet Respiratory Medicine*, [s. l.], v. 6, n. 10, p. 782–792, 2018.

SEMINARIO-AMEZ, Maria *et al.* Probiotics and oral health: A systematic review. [S. l.]: Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal, 2017.

SHANG, You *et al.* Management of critically ill patients with COVID-19 in ICU: statement from front-line intensive care experts in Wuhan, China. [S. l.]: Springer, 2020.

SHARMA, Atul *et al.* *Lactobacillus brevis* CD2 lozenges prevent oral mucositis in patients undergoing high dose chemotherapy followed by haematopoietic stem cell transplantation. *In:* , 2016. ESMO Open. [S. l.]: BMJ Publishing Group, 2016.

SHI, Heshui *et al.* Radiological findings from 81 patients with COVID-19 pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *The Lancet Infectious*

Diseases, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 425–434, 2020. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30086-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30086-4).

SILVA LOURENÇONE, Emerson Matheus *et al.* Adesão às medidas preventivas versus incidência de pneumonia associada à ventilação mecânica. *Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção*, [s. l.], v. 9, n. 2, 2019. Disponível em:

<https://online.unisc.br/seer/index.php/epidemiologia/article/view/12596>.

SILVA, Nathália Louize Nunes Vieira *et al.* *Lactobacillus brevis* CD2 attenuates traumatic oral lesions induced by fixed orthodontic appliance: A randomized phase 2 trial. *Orthodontics and Craniofacial Research*, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 379–385, 2021.

SOMERS, Emily C. *et al.* Tocilizumab for treatment of mechanically ventilated patients with COVID-19. *Clinical Infectious Diseases*, [s. l.], v. 73, n. 2, p. E445–E454, 2021.

TAN, Lisi *et al.* Relationship among clinical periodontal, microbiologic parameters and lung function in participants with chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Periodontology*, [s. l.], v. 90, n. 2, p. 134–140, 2019.

TANTIPONG, Hutsaya *et al.* Randomized Controlled Trial and Meta-analysis of Oral Decontamination with 2% Chlorhexidine Solution for the Prevention of Ventilator-Associated Pneumonia. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 131–136, 2008.

TEREZAKIS, Emmanuel *et al.* The impact of hospitalization on oral health: A systematic review. [S. l.: s. n.], 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Weekly epidemiological update on COVID-19 - 22 March 2022. [S. l.: s. n.], 2022.

WU, Chao Ping; ADHI, Fatima; HIGHLAND, Kristin. Recognition and management of respiratory coinfection and secondary bacterial pneumonia in patients with COVID-19: Posted april 27, 2020. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, [s. l.], v. 87, n. 5, p. 659–663, 2020.

ZHANG, Yangheng *et al.* Human oral microbiota and its modulation for oral health. [S. l.]: Elsevier Masson SAS, 2018.

ZHU, Xiaojuan *et al.* Co-infection with respiratory pathogens among COVID-2019 cases. *Virus Research*, [s. l.], v. 285, 2020.

## APÊNDICES

### APÊNDICE 1 – Termo de Consentimento livre e esclarecido



UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO  
Faculdade de Odontologia  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia  
(PPGOdonto)

#### III - Termo de consentimento livre e esclarecido

Prezado(a) participante:

Você está sendo convidado para participar da pesquisa intitulada “Efeito dos probióticos orais *Streptococcus salivarius* K12 e *Lactobacillus brevis* CD2 nos desfechos clínicos de pacientes com Covid-19 tratados em unidade de terapia intensiva: um ensaio clínico randomizado”, de responsabilidade do Professor Fernando Fornari e do mestrando Jonathan Rodrigo Lauxen.

O objetivo deste estudo é avaliar o efeito dos probióticos orais *Streptococcus salivarius* K12 e *Lactobacillus brevis* CD2 nos desfechos clínicos de pacientes com Covid-19 grave tratados em UTI.

Seu familiar está sendo convidado porque preenche os critérios de seleção dos grupos de participantes do estudo: i. pacientes internados na UTI do HC com síndrome respiratória aguda grave, com deterioração progressiva do quadro ventilatório nas primeiras 48 horas de UTI, necessitando de ventilação mecânica dentro deste período; ii. Diagnóstico confirmado de Covid-19, até 3 dias após o início do tratamento. Todos os atos da pesquisa serão conduzidos no leito da UTI. Após a leitura e assinatura deste consentimento, você responderá a perguntas sobre dados clínicos. A cada visita do pesquisador (dentista Jonathan), o paciente será examinado para constatação de problemas odontológicos. Na sequência, será realizado a higiene oral e aplicação do gel com probióticos ou placebo. Este procedimento será repetido 3 x ao dia, (a cada 8 horas) por 7 dias. A escolha de aplicação do medicamento (probiótico) ou placebo será realizado por sorteio, sendo que o paciente deverá receber o mesmo tratamento durante o período do estudo. É importante salientar que nem o pesquisador nem o paciente saberão o que cada paciente receberá de medicamento (probiótico ou placebo).

O uso dos probióticos desta pesquisa tem se mostrado seguro em outros estudos, sem portanto agregar riscos para os participantes. Da mesma forma, o uso do placebo não acarretará em riscos adicionais. Os participantes que por sorteio receberem os probióticos poderão inclusive se beneficiar com um menor índice de complicações respiratórias como pneumonia bacteriana caso os probióticos funcionem. Sua participação nesta pesquisa não é obrigatória e você poderá desistir a qualquer momento, retirando seu consentimento. Sua identidade escrita no termo será mantida sob sigilo e não haverá custo algum para você.

Caso você tenha dúvidas sobre a pesquisa ou caso se considere prejudicado na sua autonomia, você pode entrar em contato com o Prof. Fernando Fornari (54 996921636), o mestrando Jonathan R Lauxen (54 991768330) ou com o comitê de ética em pesquisa da UPF pelo fone (54) 3316 8157 (de segunda a sexta-feira, das 8 às 12 hs e das 13:30 as 17:30hs). Agradecemos sua colaboração e solicitamos a sua assinatura de autorização neste termo, que será também assinado pelo pesquisador responsável (duas vias), sendo que uma ficará com você.

Passo Fundo, \_\_\_\_ de \_\_\_\_ de 2020

Nome do (a) participante: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome do (a) pesquisador (a): \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## APÊNDICE 2 – Lotes de probióticos utilizados

**08/09/2020**

Fab: 08/09/20 Val: 07/12/20

30 caixas com 21 sachês de 1g cada.

4blh de bifidobacterium breve lote: 19/BV1310/02 val: 03/10/2021 fornecedor:  
FAGRON

2blh de lactobacillus salivaris LOTE 19/LSA210/03 VAL: 14/10/2021 FORN: fagron

Gel não iônico qsp 1g lote: 264109 val: 28/08/21 Fornecedor: farmácias natupharma

**27/11/20**

**Fab: 23/11/20 val: 21/02/21**

6 caixas com 21 saches

Gel não iônico 1g

Lote: 265326 Val: 28/10/21 Fornecedor: farmácias natupharma

**27/11/20**

Fab: 23/11/20 Val: 21/02/21

30 caixas com 21 sachês de 1g cada.

4blh de bifidobacterium breve lote: 19/BV1310/02 val: 03/10/2021 fornecedor:  
FAGRON

2blh de lactobacillus salivaris LOTE 19/LSA210/03 VAL: 14/10/2021 FORN: fagron

Gel não iônico qsp 1g lote: 265326 val: 28/10/21 Fornecedor: farmácias natupharma

**11/11/20**

Fab: 11/11/20 val: 09/02/21

2 caixas com 30 sachês de 1g cada.

4blh de bifidobacterium breve lote: 19/BV1310/02 val: 03/10/2021 fornecedor:  
FAGRON

2blh de lactobacillus salivaris LOTE 19/LSA210/03 VAL: 14/10/2021 FORN: fagron

Gel não iônico qsp 1g lote: 265326 val: 28/10/21 Fornecedor: farmácias natupharma

**11/11/20**

Fab: 11/11/20 val: 09/02/21

2 caixas com 30 sachês de 1g cada.

Gel não iônico 1g

Lote: 264993 Val: 14/10/21 Fornecedor: farmácias natupharma

Os probióticos e placebo são de armazenagem de 2°C a 8°C.

91.033.621/0002-08

GRAZZIOTIN & SCUSSEL LTDA.

Rua Uruguai, nº 1570 - Loja 05  
Centro - CEP 99.010-112  
Passo Fundo - RS

CRF-RS - 552287

Vitoria Aquino Rosano

## APÊNDICE 3 – Aceite CONEP

### Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

**Endereço:** SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.719-040

**UF:** DF

**Município:** BRASILIA

**Telefone:** (61)3315-5877

**E-mail:** conep@saude.gov.br

Página 08 de 10

### Situação do Parecer:

Aprovado

COMISSÃO NACIONAL DE  
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.240.135

BRASILIA, 27 de Agosto de 2020

---

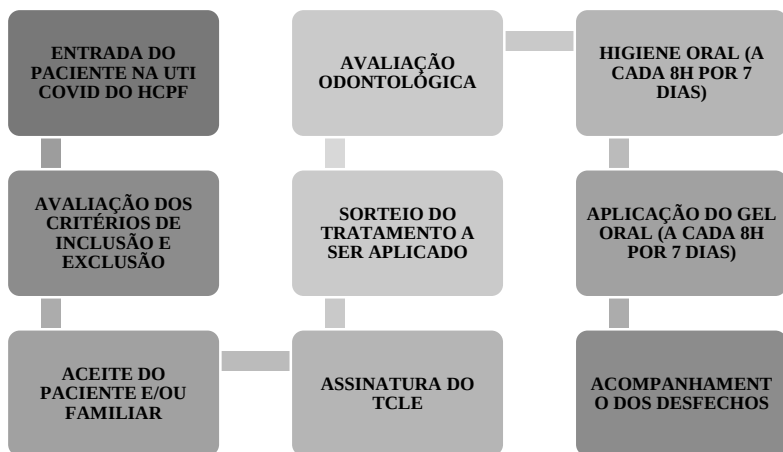
**Assinado por:**

**Jorge Alves de Almeida Venancio**  
(Coordenador(a))

#### APÊNDICE 4 – Fluxograma da Randomização



## APÊNDICE 5 – Fluxograma do Protocolo de Estudo



## ARTIGO SUBMETIDO

---

### Oral probiotics *Streptococcus salivarius* K12 and *Lactobacillus brevis* CD2 for the prevention of secondary bacterial pneumonia in patients with severe COVID-19: a phase 2 randomized clinical trial <sup>2</sup>

#### ABSTRACT

**Purpose:** Patients with severe COVID-19 are prone to secondary bacterial pneumonia. Probiotics against oral pathogens might prevent lung colonization and progression to bacterial pneumonia. This study aimed to assess the effect of *Streptococcus salivarius* K12 combined with *Lactobacillus brevis* CD2 on the prevention of secondary bacterial pneumonia in patients with severe COVID-19. **Methods:** In this randomized, placebo-controlled, phase 2 trial, 70 patients with presumptive diagnosis of severe COVID-19 were randomly assigned to a 7-day course of oral gel containing *Streptococcus salivarius* K12 2 billion colony-forming units and *Lactobacillus brevis* CD2 4 billion colony-forming units every 8 hours or placebo, starting in the first intensive care unit (ICU) day. Primary outcome was bacterial pneumonia, while secondary outcomes were survival and 14-days illness severity status. **Results:** Twenty patients did not complete the 7-day experimental course (eight had early ICU discharge, six presented non-confirmed COVID-19, four dropped out and two died). Among 50 patients who completed the 7-day experiment, 26 received probiotics (58.7 years old, 81% men) and 24 received placebo (60.5 years old,

---

<sup>2</sup> Jonathan Rodrigo Lauxen<sup>1</sup>, Sidia Maria Callegari-Jacques<sup>2</sup>, Amanda Prando<sup>3</sup>, Augusto Mombelli<sup>3</sup>, Tiago Teixeira Simon<sup>4</sup>, Juarez Dal Vesco<sup>5</sup>, Pedro Corazza<sup>1</sup>, Fernando Fornari<sup>1,3,4</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo-RS; <sup>2</sup>Departamento de Estatística, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS; <sup>3</sup>Faculdade de Medicina, UPF; <sup>4</sup>Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Passo Fundo; <sup>5</sup>Hospital de Clínicas de Passo Fundo, Brazil.

71% men). The incidence of secondary bacterial pneumonia was 35% for probiotics and 54% for placebo [relative risk: 0.64 (95%CI: 0.34–1.22)]. Compared to placebo, patients treated with probiotics showed similar rates of ICU death [hazard ratio: 1.37 (95%CI: 0.56–3.35)]. The 14-days illness severity status did not differ between groups. **Conclusion:** In this small trial of patients with severe COVID-19, the use of oral probiotics *Streptococcus salivarius* K12 and *Lactobacillus brevis* CD2 did not prevent secondary bacterial pneumonia. NCT identifier: 05175833.

**Keywords:** COVID-19; intensive care unit; oral probiotics; secondary bacterial pneumonia.

## INTRODUCTION

Since December 2019 the world have faced the pandemic of COVID-19, a systemic viral disease provoked by the SARS-CoV2 [1, 2]. According to WHO, more than 6.3 million people died from COVID-19 until June 2022. Severe cases are managed in intensive care unit (ICU), receiving support for organ failure, such as viral pneumonia with respiratory insufficiency [3]. These patients are usually intubated for mechanical ventilation, with additional risks such as secondary bacterial pneumonia [4].

The oral cavity can be a gateway for bacterial diseases with systemic involvement [5]. It harbors a diverse microbiota, composed by commensal and pathogenic microorganisms [6], able to provoke respiratory infections. Additional risk factors such as poor oral hygiene, salivary changes and periodontal disease can facilitate the colonization of respiratory pathogens in the oropharynx, particularly in ICU patients [7]. Interventions that improve oral hygiene can reduce the incidence of pneumonia in high-risk individuals [8, 9]. The use of probiotics is currently a hot topic in oral Medicine [10]. *Streptococcus salivarius* is a prominent member of the upper respiratory tract microbiota and some members of this species exert a bacterial interference against pathogens including *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* and *Haemophilus influenzae*, involved in recurrent pharyngitis, tonsillitis and acute otitis media [10]. During mechanical ventilation, dental plaque can be a source of pathogens that can lead to secondary pneumonia [11]. A probiotic containing *S. salivarius* is commercially available and produces bacteriocin-like substances with inhibitory activities against several airway pathogens *in vitro* and *in vivo*, in addition to immunomodulatory properties *in vitro*. Studies suggest that *S. salivarius* K12 inhibits pneumococcal adherence by blocking bacterial binding sites, although other mechanisms, such as direct interference by the action of secreted molecules, may also contribute [12, 13].

The oral probiotic *Lactobacillus brevis* CD2 has been shown to inhibit oral mucositis in humans [14]. It produces high levels of arginine deiminase, which inhibits the production of nitric oxide, explaining its anti-inflammatory properties [15]. A therapeutical strategy for improving the quality of the oral microbiota with reposition of probiotics could be useful to prevent lung colonization with pathogenic bacteria.

Ventilator-associated pneumonia is a common complication in patients with severe COVID-19 [16]. The most common bacteria identified in sputum culture are *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* species, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Stenotrophomonas maltophilia* [17]. ICU protocols include monitoring for signs of secondary infection in patients with severe COVID-19, mostly from 48 hours onwards of admission [18]. Both the long course of the disease and the immunosuppressed state put critically ill patients with COVID-19 at high risk for secondary infection, including bacteria and fungi [19].

We hypothesized that the use of oral probiotics containing *S. salivarius* K12 and *L. brevis* CD2 could reduce the occurrence of secondary bacterial pneumonia in ICU patients with severe COVID-19. This phase 2 clinical trial aimed to assess the effect of the referred probiotics on the prevention of secondary bacterial pneumonia in this population.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Design, Setting and Participants**

This was a randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group, phase 2 clinical trial. All participants included were admitted on ICU at the Clinics Hospital of Passo Fundo (HCPF). This institution is a regional reference for the treatment of COVID-19, with ICU specialized for this condition, serving an estimated population over 2.000.000 inhabitants. The study occurred between September 2020 and February 2021, before the start of the vaccination program against COVID-19 in Brazil. At that time, the predominant lineages of SARS-Cov-2 were B.1.1.33, B.1.1.28, and P.2.

Adult patients with suspected or confirmed diagnosis of COVID-19 who presented to the HCPF with severe acute respiratory syndrome, requiring ICU admission, were invited to participate. The inclusion criteria were i. Patients hospitalized in the ICU with severe acute respiratory syndrome, with deterioration of the ventilatory status in the first 48 hours, with risk of progression to mechanical ventilation; ii. Confirmed diagnosis of COVID-19 within 3 days of ICU admission; iii. Acceptance to participate. The exclusion criteria were i. relevant immunodeficiency such as chemotherapy, decompensated HIV, and aggressive cancer; ii. Decompensated systemic disease before the onset of COVID-19.

Laboratory diagnosis of COVID-19 was performed with analysis of nasopharyngeal secretions, collected by health-care professionals. The specimens were assessed with acid nucleic amplification test (RT-PCR) and/or antigen detection with immune-based technology [20].

This study followed the rules of the Helsinki Declaration and was carried out after approval by the Ethics Committee of the HCPF and the Research Ethics Committee of the UPF/CONEP (number 4.240.135). Patients were included after signing an informed consent, by the patient or his/her guardian.

### **ICU management**

The patients followed the clinical routine practiced in the HCPF ICU. They received ventilatory support (either non-invasive or invasive), hemodynamic, nutritional, among others, in addition to directed treatment for COVID-19 in severe cases, using drugs at the discretion of the hospital protocol. Patients with suspected superimposed bacterial infection received broad-spectrum antibiotic

therapy. Monitoring of the pulmonary status was performed with routine tests including laboratory, imaging, and microbiology, as well as frequent bedside evaluation by the ICU staff.

### **Probiotic and placebo**

Patients were treated with a gel containing *Streptococcus salivarius* K12 (2 billion live bacilli) and *Lactobacillus brevis* CD2 (4 billion live bacilli) or a placebo. The probiotics and placebo were prepared in a sachet containing one gram of gel, by the compounding pharmacy Natupharma (probiotics marketed by Fragon, Netherlands). These probiotics are exempt from registration with Brazilian Health Regulatory Agency. Each patient received 1 gram of oral gel every 8 hours for 7 days, applied by a researcher (JL).

### **Outcomes**

The main outcome was the occurrence of secondary bacterial pneumonia, suspected by clinical, laboratory, and imaging criteria, and confirmed after bacteria identification from sputum culture. Secondary endpoints were hospital survival after ICU admission, 14-days illness severity status, and adverse effects related to oral probiotics administration.

Secondary bacterial pneumonia was identified according to current parameters in the literature [21]: new or recrudescence fever; start or change in the character of sputum; new leukocytosis and/or new neutrophilia; new and relevant imaging findings; new or increasing need for oxygen support. Other sources of nosocomial infections, such as the permanence of central venous catheters or urinary tract catheters, were also considered. In intubated patients, ventilator-associated pneumonia (VAP) was defined as pneumonia starting 48 hours or more after endotracheal intubation with no evidence of bacterial pneumonia at the time of intubation [22, 23].

Survival was defined as the time in days since ICU admission until patient death or discharge from the hospital, using Kaplan-Meier estimates. The illness severity status at 14-days was adapted from the study by Somers and colleagues [24]. Starting from an ordinal score with six-scale calculated on the 28th day of ICU admission, we simplified the score to a four-scale illness severity status, defined on the 14<sup>th</sup> day, as follows: 1. Discharged alive from ICU; 2. At ICU/off mechanical ventilation; 3. At ICU/on mechanical ventilation; 4. Deceased.

Potential adverse effects related to the use of probiotics were registered, considering oral or systemic effects. When a serious adverse effect was suspected, the National Research Ethics Commission (CONEP) was informed immediately.

### **Sample size**

The number of patients was estimated considering 65% probability of occurrence of the secondary bacterial pneumonia without treatment (placebo) [25]. To detect a reduction to 30% after the use of an experimental treatment (probiotics) with power 0.8, using a bilateral test for alpha 0.05, the number of participants in each group was 30, totaling 60 patients for the study.

### **Study protocol**

All research activities were conducted in the ICU. After fulfilling the eligibility criteria and signing the informed consent, each patient was drawn to receive probiotics or placebo. The two treatments were coded using computer-generated random numbers in a 1:1 proportion. The list of codes was under the responsibility of the research pharmacist, for disclosure after data analysis. The codes were packaged in a manila envelope to be removed by the patient or his/her family member. The gels were identical, such that neither the researchers nor the patients/relatives knew what treatment was offered. At each visit by the researcher to the ICU, the patient was examined for verification of oral and dental status. After oral hygiene, gel with probiotics or placebo was applied. This procedure was repeated 3 times a day (every 8 hours) for 7 days, always by the same researcher (JL). Any reactions at the application site (mouth) were monitored and recorded daily by the researcher who applied the treatments. The occurrence of unusual pulmonary events in quality (symptoms and laboratory/imaging findings) and/or quantity (intensity of manifestations), potentially related to the use of probiotics, was monitored by the responsible pulmonologist. The responsible researchers undertook to notify the National Research Ethics Commission within 24 hours if they found serious adverse events. The potential occurrence of serious adverse events was also observed by an independent data monitoring and safety committee, composed by two physicians with experience in the field (a pulmonologist and an intensivist).

### **Statistical analysis**

Baseline characteristics were described using mean and standard deviation or absolute and percentage frequencies. Student's t, Mann Whitney and Fisher's exact tests were employed to compare treatment arms for baseline variables. The association between treatment and secondary bacterial pneumonia was evaluated by the relative risk (RR) estimated using Poisson regression with robust variance. Illness severity was compared between treatments using Fisher's exact test, and Poisson regression model was used to estimate RR of the worst categories for patients treated with probiotics. Survival was analyzed using Kaplan-Meier estimates, log-rank tests, and Fine-Gray subdistribution hazard model to estimate adjusted hazard ratios (HR) for competing outcomes. All patients and researchers including data analysts were kept blind to treatments allocation. Data were analyzed with the SPSS® v.18, and R package *cmprsk* [26]. We considered  $P < 0.05$  as indicative of statistical significance.

## RESULTS

### Patients

Seventy patients were invited to participate (Figure 1). Ten were initially excluded due to non-confirmed COVID-19 ( $n = 6$ ) or withdrawal from participating ( $n = 4$ ). Among 60 patients with COVID-19, 32 were treated with probiotics (72% men, 56.6 years old) and 28 received placebo (68% men, 60.4 years old). Out of 60 patients who started the experiment, 10 were excluded before trial termination: 6 treated with probiotics (5 early ICU discharge and 1 death) and 4 treated with placebo (3 early discharge and 1 death). A total of 50 patients who completed the 7-day interventions were analyzed (Table 1). Men were approximately three-quarters of participants in both treatment arms, aging close to 60 years, mostly with arterial hypertension. Diabetes and obesity were observed in about 35% of the individuals, in frequencies equally distributed between the treatment arms. Nearly three-quarters of participants needed mechanical ventilation during ICU stay, regardless the use of probiotics or placebo. COVID-19 was confirmed by RT-PCR (78% of cases) or antigen detection (22% of cases), without difference between treatment groups.

### Secondary bacterial pneumonia

Among 50 patients who completed the 7-day protocol trial, the incidence of bacterial pneumonia was 35% ( $n = 9$ ) in patients treated with probiotic and 54% ( $n = 13$ ) in those treated with placebo [relative risk for those treated with probiotic: 0.64 (95%CI: 0.34 – 1.22);  $P = 0.173$ ]. All patients that developed bacterial pneumonia needed mechanical ventilation during ICU stay. Ten bacterial species were isolated from the sputum culture as causative of pneumonia in 22 patients (Table 2). The commonest species in both treatment arms were gram negative strains, mainly *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*.

### Survival

Kaplan-Meier survival curves did not differ between patients treated with probiotics and placebo (log rank test,  $P = 0.198$ ). The cumulative survival probability at day 14 was 0.835 for patients who received probiotics and 0.807 for those treated with placebo. Median survival time estimated by the survival analysis was 19 days for patients treated with probiotics and 31 days for patients

treated with placebo. ICU hazard of death was similar between patients treated with probiotics and placebo: adjusting for age, arterial hypertension, and diabetes mellitus, the hazard ratio was 1.37 (95% confidence interval 0.56 – 3.35) for patients treated with probiotics compared to those that received placebo. The same analytical model did not reveal differences for the hazard of ICU discharge between probiotics and placebo [hazard ratio 0.79 (95% confidence interval 0.38 – 1.65)]. All 15 patients who did not progress to mechanical ventilation survived (probiotics 7:8 placebo) and were discharged from the ICU.

### **Illness severity status at day 14**

The day 14 illness severity status did not differ between patients treated with probiotics and placebo ( $P = 0.714$ ; Table 3). After grouping the more severe status 3 (At ICU on mechanical ventilation) and 4 (Deceased) for comparing with status 1 (Discharged) and 2 (At ICU off mechanical ventilation) as the reference group, we observed that patients treated with probiotics showed a lower but non-significant relative risk of status 3 or 4 at day 14 [RR 0.72 (IC95% 0.41-1.27);  $P = 0.263$ ].

### **Safety of probiotics and placebo**

Among 60 patients with confirmed COVID-19 who started the treatment with probiotics or placebo, 50 completed the 7-day trial. Among the 10 excluded, 8 were discharged and two died (probiotic 1:1 placebo). All treatment sessions were executed by the first author, with no report of serious adverse effect unequivocally related with the applied oral gel.

## DISCUSSION

“Potential benefits of probiotics on COVID-19” is now in the title of many published manuscripts [27-30], but original reports are still scarce [31]. This study aimed to address whether the oral probiotics *Streptococcus salivarius* K12 and *Lactobacillus brevis* CD2 can prevent secondary bacterial pneumonia in patients with severe COVID-19 managed in ICU. We hypothesized that the above-mentioned probiotics might prevent lung colonization with oral pathogens and consequent bacterial pneumonia, an important complication that may increase mortality, suffering and costs of severely ill patients with COVID-19.

The main findings of this phase 2, randomized clinical trial were 1. The incidences of secondary bacterial pneumonia in patients treated with oral probiotics and placebo were 35% versus 54%, with no statistical significance; 2. Survival and illness severity status at day 14 were similar between patients treated with probiotics and placebo; 3. No serious adverse effect was identified due to application of oral probiotics; and 4. Among the pathogens involved in secondary bacterial pneumonia, mostly were gram negative bacteria, regardless of treatment with probiotics and placebo.

Among 50 patients who completed the 7 days trial of probiotics or placebo, the incidence of secondary bacterial pneumonia was 19% lower on probiotic treatment (probiotics 35% versus 54% placebo). Illness severity status also was lower for probiotics users. These data suggest that the use of probiotics may be benefic, with the absence of statistical relevance being due to a smaller than expected effect size and consequently an insufficient sample size to confirm this effect. All patients who developed bacterial infection were on mechanical ventilation, characterizing ventilator-associated pneumonia (VAP) [18]. The probable explanation for the lack of difference between treatments is the limited number of participants, typical of a phase 2 trial. A Cochrane review involving 18 randomized clinical trials (6016 participants) concluded that oral hygiene care reduces the risk of developing ventilator-associated pneumonia in critically ill patients from 24% to about 18% [8]. Based on the preliminary data from the present study, it would be necessary a trial with 224 patients (112 receiving probiotics and 112 treated with placebo) to reach a relative risk of 0.64 with 95% confidence interval below the unit, supporting that oral probiotic would

prevent secondary bacterial pneumonia in severe COVID-19. Future studies are needed to confirm this potential effect.

At day 14 after ICU admission, survival and illness severity status were similar between patients treated with probiotics and placebo. Approximately 80% of the patients were alive at day 14, regardless of using probiotics or placebo. Hua and colleagues also did not find benefit of oral hygiene care on survival and ICU-related morbidities [8].

Probiotics usage are generally considered safe [32], although studies with ICU patients have reported sepsis, fungemia and gastrointestinal ischemia [33]. Such studies focused on probiotics that act on the intestinal lumen rather than the oral cavity. In the present study no serious adverse effect was identified due to the application of oral probiotics. Of note, all procedures of oral gel application were performed by a unique dentist, strengthening the study methodology. Probiotics containing *Streptococcus salivarius* and *Lactobacillus brevis* were recently tested in randomized clinical trials and showed benefit for several oral conditions [34, 35].

Among 22 patients who developed secondary bacterial pneumonia, the main pathogens were Gram-negative bacteria, particularly *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. All these patients were under mechanical ventilation during ICU stay, a strong risk factor for lung colonization with pathogens from the upper aerodigestive system, including oral bacteria [18]. Usual Gram-negative microorganisms involved in VAP are *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Acinetobacter species*, whereas *Staphylococcus aureus* is the main Gram-positive bacteria [36, 37]. In the present study, a seven-day course of oral probiotics starting on ICU admission tried to protect against early-onset VAP, occurring within the first four days of hospitalization [38].

This study has limitations. A limited sample size precluded the obtention of statistical significance regarding the main study outcome, whereas the lack of in vitro demonstration of the antibacterial effects against the main lung pathogens might clarify the mechanism of action of the tested probiotics. However, data point to a beneficial effect of probiotics and if further and larger studies confirm that oral probiotics prevent secondary bacterial pneumonia, this treatment could be tested not only for COVID-19 patients but also in all patients

that eventually need invasive support for lung failure, amplifying the generalizability of probiotics usage in ICU patients.

In summary, we executed a phase 2, randomized clinical trial to assess whether an oral probiotic containing *Streptococcus salivarius* K12 and *Lactobacillus brevis* CD2 can prevent secondary bacterial pneumonia in patients with severe COVID-19. The incidence of this outcome was 35% in patients treated with probiotic and 54% in those who received placebo, pointing to a beneficial effect but without statistical significance. Because of this, larger studies are needed to confirm or refute a preventive effect of oral probiotics against secondary bacterial pneumonia in severely ill patients with COVID-19.

## REFERENCES

1. Pal M, Berhanu G, Desalegn C, Kandi V (2020) Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2): An Update. *Cureus* 12:e7423.
2. Shi H, Han X, Jiang N, Cao Y, Alwalid O, Gu J, Fan Y, Zheng C (2020) Radiological findings from 81 patients with COVID-19 pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet Infect Dis* 20:425-434.
3. Chakraborty C, Sharma AR, Sharma G, Bhattacharya M, Lee SS (2020) SARS-CoV-2 causing pneumonia-associated respiratory disorder (COVID-19): diagnostic and proposed therapeutic options. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 24:4016-4026.
4. Berlin DA, Gulick RM, Martinez FJ (2020) Severe Covid-19. *N Engl J Med* 383:2451-2460.
5. Seminario-Amez M, Lopez-Lopez J, Estrugo-Devesa A, Ayuso-Montero R, Jane-Salas E (2017) Probiotics and oral health: A systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 22:e282-e288.
6. Zhang Y, Wang X, Li H, Ni C, Du Z, Yan F (2018) Human oral microbiota and its modulation for oral health. *Biomed Pharmacother* 99:883-893.
7. Terezakis E, Needleman I, Kumar N, Moles D, Agudo E (2011) The impact of hospitalization on oral health: a systematic review. *J Clin Periodontol* 38:628-636.
8. Hua F, Xie H, Worthington HV, Furness S, Zhang Q, Li C (2016) Oral hygiene care for critically ill patients to prevent ventilator-associated pneumonia. *Cochrane Database Syst Rev* 10:CD008367.
9. Scannapieco FA, Bush RB, Paju S (2003) Associations between periodontal disease and risk for nosocomial bacterial pneumonia and chronic obstructive pulmonary disease. A systematic review. *Ann Periodontol* 8:54-69.
10. Mishra S, Rath S, Mohanty N (2020) Probiotics-A complete oral healthcare package. *J Integr Med* 18:462-469.
11. Sands KM, Wilson MJ, Lewis MAO, Wise MP, Palmer N, Hayes AJ, Barnes RA, Williams DW (2017) Respiratory pathogen colonization

- of dental plaque, the lower airways, and endotracheal tube biofilms during mechanical ventilation. *J Crit Care* 37:30-37.
12. Di Pierro F (2020) A possible probiotic (*S. salivarius* K12) approach to improve oral and lung microbiotas and raise defenses against SARS-CoV-2. *Minerva Med* 111:281-283.
  13. Manning J, Dunne EM, Wescombe PA, Hale JD, Mulholland EK, Tagg JR, Robins-Browne RM, Satzke C (2016) Investigation of *Streptococcus salivarius*-mediated inhibition of pneumococcal adherence to pharyngeal epithelial cells. *BMC Microbiol* 16:225.
  14. Sharma A, Tilak T, Bakhshi S, Raina V, Kumar L, Chaudhary S, Sahoo R, Gupta R, Thulkar S (2016) *Lactobacillus brevis* CD2 lozenges prevent oral mucositis in patients undergoing high dose chemotherapy followed by haematopoietic stem cell transplantation. *ESMO Open* 1:e000138.
  15. Maekawa T, Hajishengallis G (2014) Topical treatment with probiotic *Lactobacillus brevis* CD2 inhibits experimental periodontal inflammation and bone loss. *J Periodontal Res* 49:785-791.
  16. Meawed TE, Ahmed SM, Mowafy SMS, Samir GM, Anis RH (2021) Bacterial and fungal ventilator associated pneumonia in critically ill COVID-19 patients during the second wave. *J Infect Public Health* 14:1375-1380.
  17. Chong WH, Saha BK, Ananthakrishnan R, Chopra A (2021) State-of-the-art review of secondary pulmonary infections in patients with COVID-19 pneumonia. *Infection* 49:591-605.
  18. Papazian L, Klompas M, Luyt CE (2020) Ventilator-associated pneumonia in adults: a narrative review. *Intensive Care Med* 46:888-906.
  19. Shang Y, Pan C, Yang X, Zhong M, Shang X, Wu Z, Yu Z, Zhang W, Zhong Q, Zheng X et al (2020) Management of critically ill patients with COVID-19 in ICU: statement from front-line intensive care experts in Wuhan, China. *Ann Intensive Care* 10:73.
  20. Lai CKC, Lam W (2021) Laboratory testing for the diagnosis of COVID-19. *Biochem Biophys Res Commun* 538:226-230.

21. Wu CP, Adhi F, Highland K (2020) Recognition and management of respiratory co-infection and secondary bacterial pneumonia in patients with COVID-19. *Cleve Clin J Med* 87:659-663.
22. American Thoracic S, Infectious Diseases Society of A (2005) Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 171:388-416.
23. Koulenti D, Tsigou E, Rello J (2017) Nosocomial pneumonia in 27 ICUs in Europe: perspectives from the EU-VAP/CAP study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 36:1999-2006.
24. Somers EC, Eschenauer GA, Troost JP, Golob JL, Gandhi TN, Wang L, Zhou N, Petty LA, Baang JH, Dillman NO et al (2021) Tocilizumab for Treatment of Mechanically Ventilated Patients With COVID-19. *Clin Infect Dis* 73:e445-e454.
25. Marjanovic N, Frasca D, Asehnoune K, Paugam C, Lasocki S, Ichai C, Lefrant JY, Leone M, Dahyot-Fizelier C, Pottecher J et al (2017) Multicentre randomised controlled trial to investigate the usefulness of continuous pneumatic regulation of tracheal cuff pressure for reducing ventilator-associated pneumonia in mechanically ventilated severe trauma patients: the AGATE study protocol. *BMJ Open* 7:e017003.
26. Gray B (2022) *cmprsk: Subdistribution Analysis of Competing Risks*. R package version 22-11.
27. Baud D, Dimopoulou Agri V, Gibson GR, Reid G, Giannoni E (2020) Using Probiotics to Flatten the Curve of Coronavirus Disease COVID-2019 Pandemic. *Front Public Health* 8:186.
28. Giannoni E, Baud D, Agri VD, Gibson GR, Reid G (2020) Probiotics and COVID-19. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 5:720-721.
29. Mak JWY, Chan FKL, Ng SC (2020) Probiotics and COVID-19: one size does not fit all. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 5:644-645.
30. Baindara P, Chakraborty R, Holliday ZM, Mandal SM, Schrum AG (2021) Oral probiotics in coronavirus disease 2019: connecting the gut-lung axis to viral pathogenesis, inflammation, secondary infection and clinical trials. *New Microbes New Infect* 40:100837.

31. Pawar KS, Mastud RN, Pawar SK, Pawar SS, Bhoite RR, Bhoite RR, Kulkarni MV, Deshpande AR (2021) Oral Curcumin With Piperine as Adjuvant Therapy for the Treatment of COVID-19: A Randomized Clinical Trial. *Front Pharmacol* 12:669362.
32. Didari T, Solki S, Mozaffari S, Nikfar S, Abdollahi M (2014) A systematic review of the safety of probiotics. *Expert Opin Drug Saf* 13:227-239.
33. Marteau P, Shanahan F (2003) Basic aspects and pharmacology of probiotics: an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 17:725-740.
34. Mousquer CR, Della Bona A, Milani DC, Callegari-Jacques SM, Ishikawa K, Mayer MPA, Rosing CK, Fornari F (2020) Are *Lactobacillus salivarius* G60 and inulin more efficacious to treat patients with oral halitosis and tongue coating than the probiotic alone and placebo? A randomized clinical trial. *J Periodontol* 91:775-783.
35. Silva N, Della Bona A, Cardoso M, Callegari-Jacques SM, Fornari F (2021) *Lactobacillus brevis* CD2 attenuates traumatic oral lesions induced by fixed orthodontic appliance: A randomized phase 2 trial. *Orthod Craniofac Res* 24:379-385.
36. Luyt CE, Hekimian G, Koulenti D, Chastre J (2018) Microbial cause of ICU-acquired pneumonia: hospital-acquired pneumonia versus ventilator-associated pneumonia. *Curr Opin Crit Care* 24:332-338.
37. Di Pasquale M, Ferrer M, Esperatti M, Crisafulli E, Giunta V, Li Bassi G, Rinaudo M, Blasi F, Niederman M, Torres A (2014) Assessment of severity of ICU-acquired pneumonia and association with etiology. *Crit Care Med* 42:303-312.
38. Kalil AC, Metersky ML, Klompas M, Muscedere J, Sweeney DA, Palmer LB, Napolitano LM, O'Grady NP, Bartlett JG, Carratala J et al (2016) Management of Adults With Hospital-acquired and Ventilator-associated Pneumonia: 2016 Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. *Clin Infect Dis* 63:e61-e111.

## TABLES

**Table 1.** Baseline characteristics of patients who completed the 7-day course of probiotics and placebo (N = 50)

|                                                     | Probiotics<br>N = 26 | Placebo<br>N = 24 | P-value |
|-----------------------------------------------------|----------------------|-------------------|---------|
| Men, n (%)                                          | 21 (81)              | 17 (71)           | 0.514*  |
| Age in years, mean $\pm$ SD                         | 58.7 $\pm$ 15.8      | 60.5 $\pm$ 13.2   | 0.677** |
| Positive RT-PCR/antigen§                            | 18/8                 | 21/3              | 0.175   |
| Comorbidities, n (%)                                |                      |                   |         |
| Hypertension                                        | 14 (54)              | 17 (71)           | 0.295*  |
| Diabetes                                            | 6 (23)               | 11 (46)           | 0.136*  |
| Obesity                                             | 9 (35)               | 9 (38)            | 0.999*  |
| COPD/asthma§§                                       | 3 (12)               | 2 (8)             | 0.999*  |
| Mechanical ventilation, n (%)                       | 19 (73)              | 16 (67)           | 0.760*  |
| Days of mechanical ventilation, Median (IQR25%-75%) | 11 (7-15)            | 17 (8.3-23.3)     | 0.130†  |

\*Fisher exact test; \*\*Student *t*-test; §Laboratory tests used to confirm COVID-19; §§Chronic obstructive pulmonary disease and/or asthma; †Mann Whitney test.

**Table 2.** Bacterial species isolated from sputum analysis from patients with severe COVID-19 and secondary bacterial pneumonia (n = 22 patients)

|                                     | Probiotics<br>N (%) in 9 patients | Placebo<br>N (%) in 13 patients* |
|-------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>        | 5 (55)                            | 4 (31)                           |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>       | 3 (33)                            | 5 (38)                           |
| <i>Klebsiella aerogenes</i>         | -                                 | 1 (8)                            |
| <i>Escherichia coli</i>             | -                                 | 1 (8)                            |
| <i>Acinetobacter baumannii</i>      | -                                 | 2 (16)                           |
| <i>Enterococcus spp</i>             | 1 (11)                            | -                                |
| <i>Serratia marcescens</i>          | 1 (11)                            | 1 (8)                            |
| <i>Staphylococcus aureus</i>        | 1 (11)                            | -                                |
| <i>Enterobacter cloacae</i>         | -                                 | 1 (8)                            |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | 1 (11)                            | -                                |
| <i>Burkholderia cepacia</i>         | -                                 | 1 (8)                            |

\**Candida albicans* was identified in the sputum of one patient.

**Table 3.** Association between treatments and illness severity status at day 14: relative risk of a more severe condition for patients treated with probiotics.

| Illness severity status at day 14    | Probiotics<br>N (%) in 26 patients | Placebo<br>N (%) in 24 patients |
|--------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|
| 1. Discharged alive                  | 11 (42)                            | 8 (33)                          |
| 2. at ICU/off mechanical ventilation | 4 (15)                             | 2 (8)                           |
| 3. at ICU/on mechanical ventilation  | 7 (27)                             | 9 (42)                          |
| 4. Deceased                          | 4 (15)                             | 4 (17)                          |

Comparison between treatments: (1) all categories,  $P = 0.714$ ; (2) categories 3+4 versus 1+2,  $P = 0.263$ .