Don/Doña MARÍA CASANI FERNÁNDEZ DE NAVARRETE, Traductor/a-Intérprete Jurado/a de inglés, nombrado/a por el Ministerio de Asuntos Exteriores y de Cooperación

Traducción Jurada

Gut Microbes

ISSN: (Impreso) (Online) Página de inicio de la revista:

https://www.tandfonline.com/loi/kgmi20

Los probióticos mejoran la eliminación del virus y la desaparición de los síntomas en pacientes ambulatorios con Covid19: Ensayo aleatorizado, cuádruple enmascaramiento y controlado con placebo

Pedro Gutiérrez-Castrellón, Tania Gandara-Martí, Ana T. Abreu Y Abreu, Cesar D. Nieto-Rufino, Eduardo López-Orduña, Irma Jiménez-Escobar, Carlos Jiménez-Gutiérrez, Gabriel López-Velazquez y Jordi Espadaler-Mazo

Para citar este artículo: Pedro Gutiérrez-Castrellón, Tania Gandara-Martí, Ana T. Abreu Y Ab reu, Cesar D. Nieto-Rufino, Eduardo López-Orduña, Irma Jiménez-Escobar, Carlos Jiménez-Gutié rrez, Gabriel López-Velazquez y Jordi Espadaler-Mazo (2022) Probiotic improves sympto matic and viral clearance in Covid19 outpatients: a randomized, quadruple-blinded, placebo-contr olled trial, Gut Microbes, 14:1, 2018899, DOI: 10.1080/19490976.2021.2018899

Enlace de este artículo: https://doi.org/10.1080/19490976.2021.2018899

© 2022 Los autores. Publicado con licencia por Taylor & Francis Group, LLC.

Ver material complementario

Publicado en línea: 11 de enero de 2022.

Envíe su artículo a esta revista

Ver artículos relacionados

Ver datos de Crossmark

Las condiciones completas de acceso y uso se encuentran en

https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=kgmi20

GUT MICROBES

2022, VOL. 14, NO. 1, e2018899 (16 páginas)

https://doi.org/10.1080/19490976.2021.2018899

MARÍA CASANI FERNÁNDEZ DE NAVARRETE
Traductora Intérprete Jurada de INGLÉS
Nº 3692

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN ACCESO ABIERTO

Los probióticos mejoran la eliminación del virus y la desaparición de los síntomas en pacientes ambulatorios con Covid19: Ensayo aleatorizado, cuádruple enmascaramiento y controlado con placebo

Pedro Gutiérrez-Castrellón[a,b], Tania Gandara-Martí[a], Ana T. Abreu Y Abreu[c], Cesar D. Nieto-Rufino[a], Eduardo López-Orduña[d], Irma Jiménez-Escobar[a], Carlos Jiménez-Gutiérrez[a], Gabriel López-Velazquez[b], and Jordi Espadaler-Mazo[e]

[a]Centro de Investigación Translacional en Ciencias de la Salud, Hospital General Dr. Manuel Gea Gonzalez, Ciudad de México, (CDMX), México; [b]International Scientific Council for Probiotics, Ciudad de México, (CDMX), México; [c]Digestive Unit, Hospital Angeles Pedregal, Ciudad de México, (CDMX), México; [d]DiagnoMol SA de CV, Ciudad de México (CDMX), México; [e]R&D Department, AB-Biotics SA (KANEKA Group) Sant Cugat, (Barcelona) España

RESUMEN

Las bacterias intestinales influyen en la homeostasis pulmonar a través del eje intestino-pulmón. Llevamos a cabo un estudio monocéntrico, aleatorizado y con cuádruple enmascaramiento, en pacientes ambulatorios adultos sintomáticos con enfermedad por coronavirus 2019 (Covid19). Los pacientes se asignaron en una proporción 1:1 para recibir una fórmula probiótica (cepas de *Lactiplantibacillus plantarum* KABP022, KABP023 y KAPB033, más la cepa *Pediococcus acidilactici* KABP021, con un total de 2×10^9 unidades formadoras de colonias [UFC]) o un placebo durante 30 días. Los criterios de valoración principales fueron: i) la proporción de pacientes en remisión sintomática y vírica completa; ii) la proporción que progresa a una enfermedad moderada o grave con hospitalización, o muerte; y iii) los días en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI). Se asignaron al azar 300 pacientes (media de edad de 37,0 años [intervalo de 18 a 60], 161 [53,7%] mujeres, 126 [42,0%] con factores de riesgo metabólico conocidos); 293 completaron el estudio (97,7%). Entre ellos, 78 de 147 (53,1%) alcanzaron la remisión completa en el grupo de probióticos, frente a 41 de 146 (28,1%) en el de placebo (RR: 1,89 [IC 95%: 1,40-2,55]; $p < 0,001$), significativo tras la corrección por multiplicidad. No se produjeron hospitalizaciones ni muertes durante el estudio, lo que impidió evaluar los restantes resultados principales. La suplementación con probióticos fue bien tolerada y redujo la carga viral nasofaríngea, los infiltrados pulmonares y la duración de los síntomas digestivos y no digestivos, en comparación con el placebo. No se

MARÍA CASANI FERNÁNDEZ DE NAVARRETE
Traductor/a Intérprete Jurado/a de INGLÉS
Nº 3692

detectaron cambios significativos en la composición de la microbiota fecal entre el probiótico y el placebo, pero la suplementación con probióticos aumentó significativamente las IgM e IgG específicas contra el coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave (de tipo) 2 (SARS-CoV2) en comparación con el placebo. Por lo tanto, se plantea la hipótesis de que este probiótico actúa principalmente interactuando con el sistema inmunitario del huésped en lugar de cambiar la composición de la microbiota colónica. Estos hallazgos deberán reproducirse en estudios futuros para dilucidar su mecanismo de acción (Registro: NCT04517422).

Abreviaturas: AA: acontecimiento adverso; IMC: índice de masa corporal; CONSORT: CONsolidated Standards of Reporting Trials; UFC: unidades formadoras de colonias; CDRe: cuaderno electrónico de informes diarios; EIP: eje intestino-pulmón; GSRS: Gastrointestinal Symptoms Rating Scale; PCR-as: proteína C reactiva de alta sensibilidad; CR: cociente de riesgos; UCI: unidad de cuidados intensivos; RP: razón de posibilidades; PCoA: análisis de coordenadas principales; RR: riesgo relativo; RT-qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real; SARS-CoV2: coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave (de tipo) 2; SpO_2: saturación periférica de oxígeno; OMS: Organización Mundial de la Salud.

HISTORIA DEL ARTÍCULO

Recibido el 15 de julio de 2021

Revisado el 3 de noviembre de 2021

Aceptado el 22 de noviembre de 2021

PALABRAS CLAVE

Covid19; SARS-CoV2; probiótico; carga viral; radiografía de tórax; inmunidad adquirida; eje intestino-pulmón

PERSONA DE CONTACTO Jordi Espadaler-Mazo, espadaler@ab-biotics.com; R&D Department, AB-Biotics SA (KANEKA Group), R&D Department, Av. Torre Blanca 57, Sant Cugat, (Barcelona) 08172, España

Los datos complementarios de este artículo pueden consultarse en el sitio web del editor.

© 2022 Los autores Publicado con licencia por Taylor & Francis Group, LLC.

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia de Atribución no comercial de Creative Commons (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/), que permite el

MARÍA CRISTINA FERNÁNDEZ DE NAVARRETE
Traductora Intérprete Jurada de INGLÉS
Nº 3583

uso, distribución y reproducción no comerciales sin restricciones en cualquier medio, siempre que se cite adecuadamente el trabajo original.

MARÍA CASANI FERNÁNDEZ DE NAVARRETE
Traductora Intérprete Jurada/o de INGLÉS
Nº 3892

Introducción

El coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave (de tipo) 2 (SARS-CoV2) es el agente causante de la pandemia mundial de la enfermedad por coronavirus 2019 (Covid19).[1] La infección por SARS-CoV2 puede ser desde asintomática hasta mortal, pero la mayoría de los pacientes sintomáticos suelen presentar síntomas leves o moderados, incluso a pesar de una carga viral importante[2] y su afección puede tratarse de forma ambulatoria. Los síntomas pueden consistir en tos seca, fiebre, dificultad para respirar, dolores corporales, dolor de cabeza, cansancio, diarrea y anosmia, entre otros.[3] Sin embargo, hasta la fecha no se ha aprobado ningún tratamiento para los pacientes ambulatorios con Covid19.

Los probióticos se definen como «microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, aportan un beneficio para la salud del huésped», y esta definición conlleva el requisito de realizar estudios de diseño correcto en seres humanos en la indicación de salud especificada.[4] Hay resultados recientes que indican una interacción entre el tubo digestivo y el sistema respiratorio, junto a sus respectivos microbiomas, lo que se conoce como el eje intestino-pulmón (EIP).[5,6] En metaanálisis se ha propuesto que los probióticos orales pueden tener un papel en las infecciones respiratorias como el resfriado y la gripe, pero también se han observado limitaciones significativas, como la excesiva dependencia de los resultados subjetivos, el pequeño tamaño de las muestras y la heterogeneidad entre los distintos estudios.[7,8] En particular, la heterogeneidad entre los estudios no es inesperada, ya que varios efectos de los probióticos son específicos de la cepa, en particular los efectos relacionados con el sistema inmunitario.[4,9-12] Basándose en dichos resultados, se ha propuesto el uso de probióticos para la Covid19.[13-15] En el momento de redactar este artículo se han publicado algunos resultados observacionales y retrospectivos[16] pero ningún estudio aleatorizado controlado con placebo.

El objetivo de este estudio era probar la eficacia y la seguridad de la fórmula probiótica AB21© *(Lactiplantibacillus plantarum* cepas KABP022, KABP023 y KABP033 más la cepa KABP021 de *Pediococcus acidilactici)*, en pacientes sintomáticos con Covid19, mediante la evaluación de criterios de valoración clínicos, biomarcadores nasofaríngeos y séricos, y su impacto en el microbioma fecal.

Resultados

Participantes

De los 300 pacientes aleatorizados, 293 completaron el estudio entre el 26 de agosto y el 10 de diciembre de 2020 y estuvieron disponibles para el análisis principal, mientras que 7 se perdieron durante el seguimiento (3 en el grupo de probiótico y 4 en el de placebo, diagrama de flujo

MARÍA CASANI FERNÁNDEZ DE NAVARRETE
Traductor/a Intérprete Jurado/a de INGLÉS
Nº 3692

CONSORT en la figura 1). La edad oscilaba entre los 18 y los 60 años, 126 (42,0%) tenían factores de riesgo metabólico conocidos para la Covid19 grave (IMC ≥ 30, diabetes y/o hipertensión) y la mediana de tiempo desde el primer síntoma hasta la inclusión en el estudio fue de 4 días (RIC 3-5). Todos los pacientes fueron seropositivos para la IgM específica del SARS-CoV2, lo que supuso una confirmación adicional del diagnóstico de Covid19 mediante RT-qPCR. En general, las características iniciales estaban bien equilibradas entre los grupos (tabla 1). Las quejas digestivas más frecuentes fueron la diarrea y las náuseas, seguidas de la sensación de heces sueltas o de evacuación incompleta y de dolor abdominal. El resto de los síntomas digestivos (p. ej., estreñimiento, flato, meteorismo o reflujo) fueron referidos por menos del 10% de los pacientes en ambos grupos de estudio (tabla S1), y no se tuvieron en cuenta para el análisis posterior. Se detectaron algunos posibles desequilibrios iniciales: i) mayor incidencia de infiltrados pulmonares, de obesidad de tipo II y menor SpO_2 en el grupo probiótico; ii) mayor incidencia de obesidad de tipo I y de dificultad respiratoria en el grupo placebo. Por lo tanto, dichas variables se tuvieron en cuenta para los análisis de sensibilidad *post-hoc*.

	810 adultos con Covid19 examinados para determinar su elegibilidad	
		510 excluidos: • **415** no cumplían los criterios de admisión • **95** se negaron a participar
	300 inscritos	
150 aleatorizados al **producto activo:** • **150** recibieron la intervención asignada		**150** aleatorizados a **placebo**: • **150** recibieron la intervención asignada
Se perdieron **3** pacientes durante el seguimiento: • **2** se retiraron antes del día 15, declarando razones		Se perdieron **4** pacientes durante el seguimiento: • **1** se retiró antes del día 15, declarando razones

MARÍA CASANI FERNÁNDEZ DE NAVARRETE
Traductor/a Intérprete Jurado/a de INGLÉS
Nº 3692

personales/familiares • **1** se retiró antes del día 30, declarando razones personales/familiares **0** interrumpieron la intervención		personales/familiares • **3** se retiraron antes del día 30, declarando razones personales/familiares **0** interrumpieron la intervención
147 completaron el estudio • **0** excluidos del análisis		**146** completaron el estudio • **0** excluidos del análisis

Figura 1. Inscripción de pacientes y asignación del tratamiento a probiótico activo ($\geq 2\times10^9$ UFC) o placebo entre los pacientes ambulatorios sintomáticos con Covid19 (diagrama de flujo CONSORT 2010).

Resultados clínicos principales

El resultado principal de remisión completa (es decir, la eliminación del virus y la desaparición de los síntomas completas) en el día 30 fue alcanzado por 78 (53,1%) casos en el grupo de probióticos en comparación con 41 (28,1%) en el de placebo (tabla 2 y S2), siendo la diferencia significativa en el umbral de multiplicidad corregida de $p = 0{,}01$ (RR: 1,89 [IC al 95% 1,40–2,55], $p < 0{,}001$). Durante el estudio no se produjeron hospitalizaciones, ingresos en la UCI ni fallecimientos, lo que impidió evaluar los restantes resultados principales (tabla 2).

Resultados clínicos secundarios

Los pacientes del grupo probiótico informaron de un número significativamente menor de días de fiebre, tos, dolor de cabeza, dolores corporales (mialgias), falta de aire (disnea), náuseas, diarrea y dolor abdominal (tabla 3). También se observó un efecto significativo en los días con heces blandas, aunque el tamaño del efecto fue mínimo. Es importante destacar que solo los efectos sobre la fiebre fueron independientes de su estado al inicio, mientras que la incidencia de otros síntomas durante la intervención fue prácticamente nula en los pacientes que no los presentaban ya a su entrada en el estudio. El cumplimiento por parte de los pacientes del cuaderno electrónico de informes diarios (CDRe) fue alto, ya que solo 11 pacientes en el caso del probiótico y 6 en el del placebo no aportaron el 100% de los diarios completos.

El tratamiento con probióticos se asoció a una menor carga viral nasofaríngea en los días 15 y 30

MARÍA CASAN
Traductor/a Intérprete Jurado/a de INGLÉS
Nº 3692

en comparación con el placebo ($p < 0,001$ en ambos casos; figura 2(a)). Entre los pacientes con infiltrados pulmonares al inicio (n = 116), el tratamiento con probióticos se asoció a una menor puntuación radiográfica tanto en el día 15 como en el día 30 ($p < 0,001$ en ambos casos; figura 2(b)). Ninguno de los pacientes con infiltrados pulmonares negativos al inicio (n = 184) tuvo infiltrados positivos en los días 15 o 30. En comparación con el placebo, el tratamiento con probióticos también se asoció a títulos séricos más elevados de IgG e IgM de unión al SRAS-CoV2 en los días 15 y 30 ($p < 0,001$ en todos los casos; figura 2(c,d)) y a concentraciones séricas más bajas de proteína C reactiva de alta sensibilidad (PCR-as) y de dímero D en el día 15 ($p < 0,001$ en ambos casos), pero no en el día 30 (figura 2(e,f)).

Tabla 1. Características demográficas e iniciales de los participantes aleatorizados.

Características	Probiótico (n = 150)	Placebo (n = 150)
Edad (años) [mediana, RIC]	34 (26-45)	39 (27-49)
Sexo (femenino) [n, %]	82 (54,7%)	79 (52,7%)
IMC (kg/m^2)[Median, RIC]	27,5 (23,3-31,8)	29,4 (27,1-32,9)
• Obesidad de clase I (IMC 30 a <35) [n, %]	31 (20,7%)	72 (48,0%)
• Obesidad de clase II (IMC 35 a <40) [n, %]	16 (10,7%)	0 (0,0%)
Fumador (sí) [n, %]	22 (14,7%)	20 (13,3%)
Diabetes (sí) [n, %]	15 (10,0%)	16 (10,7%)
Hipertensión arterial (sí) [n, %]	28 (18,7%)	31 (20,7%)
Toma ≥2 medicamentos a diario (sí) [n, %]	24 (16,0%)	18 (12,0%)
Uso de paracetamol (sí) [n, %]	83 (55,3%)	70 (46,7%)
Días desde el inicio de los síntomas [mediana, RIC]	4 (3-5)	4 (3-5)
Fiebre (sí) [n, %]	100 (66,7%)	115 (76,7%)
Tos (sí) [n, %]	138 (92,0%)	133 (88,7%)

MARÍA CASANI FERNÁNDEZ DE NAVARRETE
Traductor/a Intérprete Jurado/a de INGLÉS
Nº 3892

Dolor de cabeza (sí) [n, %]	134 (89,3%)	127 (84,7%)
Dificultad para respirar (sí) [n, %]	42 (28,0%)	64 (42,7%)
Dolores corporales (sí) [n, %]	94 (62,7%)	97 (64,7%)
Diarrea (sí) [n, %]	41 (27,3%)	54 (36,0%)
Heces blandas (sí) [n, %]	27 (18,9%)	25 (16,7%)
Náuseas (sí) [n, %]	46 (30,7%)	47 (31,3%)
Evacuación incompleta (sí) [n, %]	27 (18,0%)	30 (20,0%)
Dolor abdominal (sí) [n, %]	22 (14,7%)	16 (10,7%)
Infiltrados pulmonares (sí) [n, %]	72 (48,0%)	48 (32,0%)
SpO_2 (%) [mediana, RIC]	90 (90-91)	91 (90-91)
SARS-CoV2 (log10 copias/ml) [mediana, RIC][a]	6,8 (6,7-6,9)	6,8 (6,6-6,9)
IgM espicular del SARS-CoV2 (seropositivo) [n, %][b]	150 (100%)	150 (100%)
IgG espicular del SARS-CoV2 (seropositivo) [n, %][b]	36 (24,0%)	31 (20,7%)
PCR-as (mg/l) [mediana, RIC]	3,2 (2,2-4,0)	3,4 (2,8-3,9)
Dímero D (mg/l) [mediana, RIC]	2,0 (1,5-2,4)	2,0 (1,3-2,8)

IMC: índice de masa corporal. PCR-as: proteína C-reactiva de alta sensibilidad. RIC: intervalo intercuartílico. SpO_2: saturación periférica de oxígeno.

a) Medido mediante hisopos nasofaríngeos.

b) Según las instrucciones del fabricante del kit de la prueba.

Tabla 2. Resultados principales y de seguridad al final de la intervención de 30 días.

	Probiótico	Placebo	RR (IC 95%)	Valor de p[c]
Resultados principales				
Remisión completa[a] [n, %]	78/147 (53,1%)	41/146 (28,1%)	1,89 (1,40-2,55)	<0,001

MARÍA CASANI FERNÁNDEZ DE NAVARRETE
Traductor/a Intérprete Jurado/a de INGLÉS
Nº 3692

Hospitalizado, moderado[b] [n, %]	0/150	0/150	-	1,000
Hospitalizado, grave[b] [n, %]	0/150	0/150	-	1,000
Días de estancia en la UCI [media, DE]	0 ± 0	0 ± 0	-	1,000
Muerte [n, %]	0/150	0/150	-	1,000
Resultados de seguridad				
Pacientes con ≥ 1 AA [n, %]	41/150 (27,3%)	63/150 (42,0%)	0,65 (0,47-0,90)	0,008
• Toma de medicamentos ≥2 diariamente [n, %]	7/24 (29,2%)	8/18 (44,4%)	0,66 (0,29-1,48)	0,312
Pacientes con ≥ 1 AAG [n, %]	0/150	0/150	-	1,000

AA: acontecimiento adverso. IC: intervalo de confianza. UCI: unidad de cuidados intensivos. AAG: acontecimiento adverso grave. DE: desviación estándar. a) Requiere RT-qPCR negativa (eliminación del virus) más resolución completa de los cinco síntomas de Covid19 considerados al inicio del estudio (desaparición de los síntomas). b) Según la escala de progresión clínica de la OMS.[17] c) Calculado mediante la prueba de la Chi-cuadrado de Pearson; el umbral de significación corregido por Bonferroni es $p = 0,01$.

Tabla 3. Días de cada síntoma después de la aleatorización, descritos como mediana de días (intervalo intercuartílico), según el estado inicial de cada síntoma (presencia o ausencia al inicio del estudio). El número de pacientes en cada subgrupo se indica a continuación entre paréntesis. Los valores de p se han calculado mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. El número de pacientes que presentaba cada síntoma en el momento inicial en cada grupo de tratamiento se puede consultar en la tabla 1.

Características y situación inicial	Probiótico	Placebo	Valor de p
Fiebre (temperatura >37,5 °C)			
• Presente al inicio del estudio (n = 215)	2 (1-5)	5 (4-8)	<0,001
• Ausente al inicio del estudio (n = 85)	2 (0-5)	4 (4-5)	<0,001
Tos			
• Presente al inicio del estudio (n = 271)	10,5 (8-13)	14 (12-17)	<0,001

MARÍA CASANI FERNÁNDEZ DE NAVARRETE
Traductora Intérprete Jur... INGLÉS
Nº 3692

• Ausente al inicio del estudio (n = 29)	0 (0-3,3)	0 (0-0)	0,238
Cefalea			
• Presente al inicio del estudio (n = 261)	7 (5-9)	12 (9-14)	<0,001
• Ausente al inicio del estudio (n = 39)	0 (0-0)	0 (0-0)	0,404
Dificultad para respirar			
• Presente al inicio del estudio (n = 106)	2,5 (1-4)	5 (2-6,3)	<0,001
• Ausente al inicio del estudio (n = 194)	0 (0-0)	0 (0-0)	1,000
Dolores corporales			
• Presente al inicio del estudio (n = 191)	3 (2-6)	7 (5-9)	<0,001
• Ausente al inicio del estudio (n = 109)	0 (0-0)	0 (0-0)	0,594
Náuseas			
• Presente al inicio del estudio (n = 93)	2 (0-6)	9 (0-14)	<0,001
• Ausente al inicio del estudio (n = 207)	0 (0-0)	0 (0-0)	0,479
Diarrea			
• Presente al inicio del estudio (n = 95)	4 (0-6)	8,5 (0-13,8)	0,004
• Ausente al inicio del estudio (n = 205)	0 (0-0)	0 (0-0)	0,555
Heces blandas			
• Presente al inicio del estudio (n = 52)	0 (0-0)	0 (0-2)	0,026
• Ausente al inicio del estudio (n = 248)	0 (0-0)	0 (0-0)	0,270
Sensación de evacuación incompleta			
• Presente al inicio del estudio (n = 57)	2 (0-3)	0 (0-3,5)	0,367
• Ausente al inicio del estudio (n = 243)	0 (0-0)	0 (0-0)	0,304
Dolor abdominal			
• Presente al inicio del estudio (n = 38)	4 (0-6,5)	10 (0-14)	0,031
• Ausente al inicio del estudio (n = 262)	0 (0-0)	0 (0-0)	0,221
Uso de paracetamol (post-hoc)			

MARÍA CASANI FERNÁNDEZ DE NAVARRETE
Traductor/a Intérprete Jurado/a de INGLÉS
Nº 3892

• Presente al inicio del estudio (n = 153)	1 (0-3)	3 (3-6)	<0,001
• Ausente al inicio del estudio (n = 147)	1 (0-4)	3 (3-7)	<0,001

a	Carga viral (log10 copias/ml) Placebo Probiótico Tiempo desde la inscripción (días)	b	Puntuación de la radiografía de tórax Tiempo desde la inscripción (días)
c	IgM frente al SARS-CoV2 (U/ml) Tiempo desde la inscripción (días)	d	IgG frente al SARS-CoV2 (U/ml) Tiempo desde la inscripción (días)
e	PCR-as (mg/l) Tiempo desde la inscripción (días)	f	Dímero D (mg/l) Tiempo desde la inscripción (días)

Número en riesgo (radiografía de tórax)	Día 0	Día 15	Día 30	**Número en riesgo (otros análisis)**	Día 0	Día 15	Día 30
Probiótico (n):	72	72	72	Probiótico (n):	150	148	147
Placebo (n):	48	48	48	Placebo (n):	150	149	146

Figura 2. (a) Carga viral media (como logaritmo de base 10 de copias víricas/ml), medida por RT-qPCR específica del SARS-CoV2. (b) Diagrama de cajas (mediana, cuartiles, bigotes de Tukey y valores atípicos individuales) de la puntuación de anomalías de la radiografía de tórax, en pacientes que mostraban infiltrados pulmonares al inicio (n = 116). (c) Media geométrica de los títulos séricos de IgM de unión a espículas del SARS-CoV2. (d) Media geométrica de los títulos séricos de IgG de unión a espículas del SARS-CoV2. (e) Medias geométricas de las concentraciones séricas de PCR de alta sensibilidad. (f) Medias geométricas de las concentraciones séricas de dímero-D. Las barras de error indican el IC al 95% de las medias. El grupo de tratamiento con probióticos está

MARÍA CASANI FERNÁNDEZ DE NAVARRA
Traductor/a Intérprete Jurado/a de INGLÉS
Nº 3892

representado en azul, mientras que el placebo está representado en gris. Los efectos principales de grupo, visita y grupo por visita fueron significativos en todos los análisis ((a) a (f), $p < 0,001$). (*) Significación de grupo por visita en un punto de tiempo específico ($p < 0,001$); (#) Tendencia estadística de grupo por visita en un punto de tiempo específico ($p < 0,10$).

Cambios en la composición de la microbiota intestinal

La composición del microbioma fecal se describió en un subconjunto de pacientes tratados con probióticos y con placebo (n = 100 cada uno, figura S2). Se observó un aumento pequeño, pero estadísticamente significativo, de la diversidad alfa (índice de Shannon) en ambos grupos de estudio el día 30 en comparación con el día 0 (efecto temporal $p < 0,001$; figura 3 (a)), pero no se observaron diferencias significativas entre los grupos. Sin embargo, este aumento dependiente del tiempo en la diversidad alfa no se observó en el estimador de abundancia Chao1 (figura 3(a)). Del mismo modo, no se observaron diferencias de composición significativas entre los grupos del estudio, ni en el momento inicial ni en el día 30, según la diversidad beta (índice de Bray-Curtis) (figura 3(b)). En este sentido, la agrupación del análisis de coordenadas principales (PCoA) fue dominada principalmente por si la microbiota estaba dominada por el género *Bacteroides*, el género *Prevotella* o el filo Firmicutes ($p < 0,0001$, figura 3 (b)). La primera coordenada (eje x) separa *Prevotella* de *Bacteroides* y Firmicutes, mientras que la segunda coordenada (eje y) separa *Bacteroides* de Firmicutes. Cabe destacar que no se observaron diferencias en la distribución del enterotipo entre los grupos de estudio (figura S2).

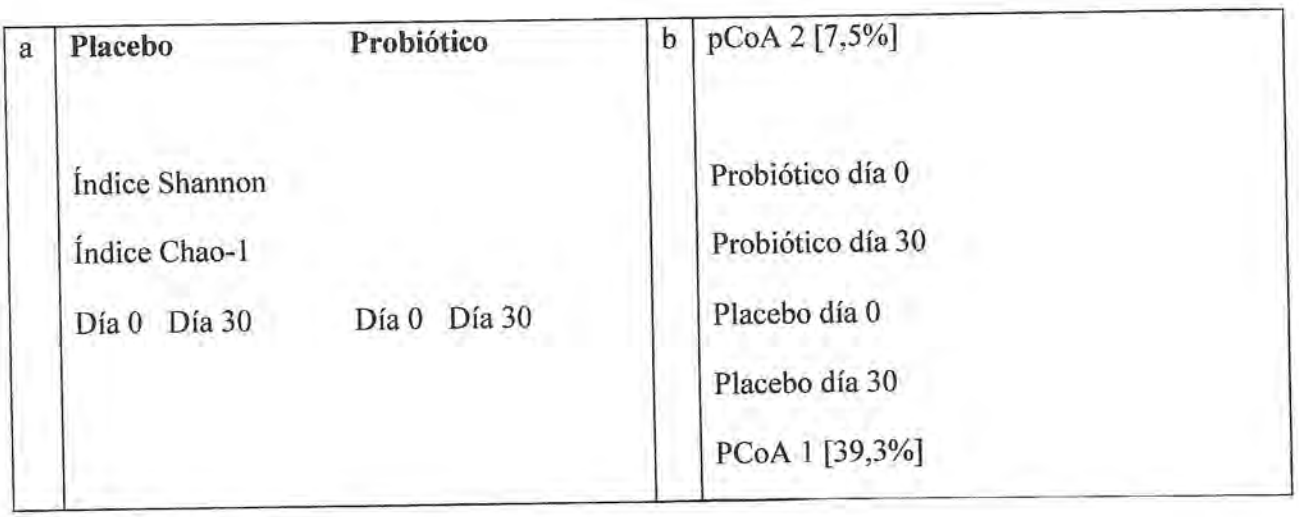
Análisis post-hoc

Se realizaron varios análisis exploratorios sobre el criterio de valoración principal. La significación de la remisión completa se mantuvo en todas las subpoblaciones del estudio evaluadas, definidas por la edad, el sexo, la presencia de enfermedad asociada metabólica, la carga viral inicial y los días desde el inicio de los síntomas hasta la aleatorización (tabla S3). Se realizaron análisis de sensibilidad para evaluar la solidez del criterio de valoración principal frente a los desequilibrios iniciales, y las probabilidades de asociación entre el tratamiento probiótico y la remisión completa siguieron siendo estadísticamente significativas (RP sin ajustar: 2,90 [IC al 95% 1,78-4,70], RP ajustado en el análisis multivariante: 2,98 [IC al 95% 1,77-5,03]; ambos $p \leq 0,001$; tabla S4). El efecto del enterotipo inicial sobre la remisión completa también se evaluó en la subpoblación analizada para el microbioma fecal (n = 200) y se encontró que la remisión era independiente del enterotipo (tabla S5).

La mediana del tiempo hasta la resolución general de los síntomas (desaparición de los síntomas)

MARÍA CASANI FERNÁNDEZ DE NAVARRETE
Traductora Intérprete Jurada/a de INGLÉS
Nº 3692

fue 5 días más corta en el grupo de probióticos que en el de placebo ($p < 0,001$), siendo la significación robusta ante los desequilibrios del momento inicial según se determinó mediante el ajuste multivariante (figura S1). Cabe destacar que un mayor IMC también produjo un pequeño pero significativo aumento del tiempo hasta la resolución de los síntomas. Los días hasta la resolución de los síntomas estaban inversamente correlacionados con los títulos de IgM tanto en el día 15 (rho = –0,25; $p < 0,001$) como en el día 30 (rho = –0,35; $p < 0,001$). También se observó una débil correlación con los títulos de IgG en el día 30 (rho = –0,14; $p = 0,017$), pero no en el día 15. Además, los días de uso de paracetamol también se redujeron significativamente en el grupo probiótico (tabla 3). Por último, la edad se ha descrito como un factor de riesgo clave en la patología del Covid19, y se exploró el efecto de la edad como covariable continua sobre las IgM e IgG específicas del SARS-CoV2, la carga viral y la puntuación de la radiografía pulmonar de Brixia. No se encontraron efectos significativos para la edad, ni como factor independiente ni en su interacción con el grupo de estudio o el tiempo, para dichas variables (tabla S6).



Número analizado (A,B)	Día 0	Día 30
Probiótico (n):	100	100
Placebo (n):	100	100

Figura 3. (a) Diversidad alfa (índice de diversidad de Shannon y estimador de abundancia Chao1). (b) Diversidad beta (índice de Bray-Curtiss). Los análisis del microbioma fecal se realizaron mediante la secuenciación del ARNr 16S en un subconjunto aleatorizado de pacientes del estudio (n = 100 en cada grupo); las secuencias obtenidas se agruparon en unidades taxonómicas operativas (UTO) con una similitud del 97%.

MARÍA CASANI FERNÁNDEZ DE NAVARRETE
Traductor/a Intérprete Jurado/a de [illegible]
Nº 3692

Seguridad

No se notificaron acontecimientos adversos graves (AAG) en ninguno de los 300 pacientes del estudio, mientras que se notificaron acontecimientos adversos (AA) durante el tratamiento en 41 (27,3%) y 63 (42,0%) pacientes de los grupos de probióticos y placebo, respectivamente (tabla 2). Los AA más frecuentes fueron la fiebre, la tos, los dolores corporales, el dolor al tragar y la conjuntivitis durante el tratamiento (tabla S7), y no se produjo ninguna elevación de la PCR-as durante el tratamiento del estudio. La incidencia de AA fue mayor en el grupo de placebo que en el de probióticos en general, manteniéndose esta tendencia en los pacientes que tomaban 2 o más medicamentos diariamente. Por lo tanto, muchos AA observados podrían ser brotes naturales de síntomas de la Covid19.

Discusión

Hasta ahora, son pocos los estudios aleatorizados y controlados en los que se han encontrado tratamientos eficaces para reducir la duración de los síntomas y la carga viral en pacientes ambulatorios con Covid19.[18-25] En el momento de escribir este artículo, la FDA y la EMA solo han recomendado algunos anticuerpos monoclonales como tratamiento para los pacientes ambulatorios de Covid19. Aunque son eficaces, los anticuerpos monoclonales son caros, no se pueden tomar por vía oral y la aparición de nuevas variantes de SRAS-CoV2 podría poner en peligro su eficacia.[26] Por lo tanto, un tratamiento oral que ayude a reducir la carga viral, los infiltrados pulmonares y la duración de los síntomas podría ser una buena adición al arsenal terapéutico para los pacientes ambulatorios con Covid19.

En este estudio enmascarado y aleatorizado en pacientes ambulatorios con Covid19, la fórmula probiótica mejoró significativamente la tasa de remisión frente al placebo ($p < 0,001$). Ningún paciente fue hospitalizado o murió durante la intervención, lo que impidió la evaluación de los restantes resultados de eficacia principales (frecuencia de progresión a la hospitalización, proporción de mortalidad o duración de la estancia en la UCI). En otros estudios aleatorizados recientes en pacientes ambulatorios con Covid19 también se encontró una incidencia combinada de hospitalización más visita al servicio de urgencias de solo el 6% en los grupos de placebo.[18,19,23] Nuestros criterios de inclusión (p. ej., edad máxima de 60 años, $SpO_2 \geq 90\%$) pueden haber dado lugar a un riesgo aún menor de empeoramiento de la Covid19. Sin embargo, la significación de la mejoría de la remisión sobrevivió a la corrección de Bonferroni para multiplicidad de los resultados principales y fue robusta ante el ajuste multivariante para los posibles desequilibrios del momento inicial, así como al enterotipo del paciente. Además, los análisis *post-hoc* demostraron que el efecto era constante en todas las subpoblaciones del estudio definidas por la edad, el sexo, las

MARÍA CASANI FERNÁNDEZ
Traductora e Intérprete Jurada
Nº 3692

enfermedades metabólicas asociadas, la carga viral al inicio y los días desde el inicio de los síntomas hasta la aleatorización ($p < 0,05$ en todos los casos). El efecto positivo en los pacientes con enfermedad metabólica asociada (es decir, obesidad, diabetes y/o hipertensión) podría ser de particular relevancia, debido a su mayor riesgo tanto de Covid19 grave como de Covid19 prolongada.[27]

Dado que la mayoría de los pacientes del estudio habían quedado libre de síntomas al final del estudio, la remisión completa reflejaba sobre todo si los pacientes lograban eliminar el virus. Sin embargo, en comparación con el placebo, la intervención con probióticos también se asoció a una menor duración de los síntomas intestinales y no intestinales de la Covid19, a un menor tiempo de resolución de todos los síntomas y a una menor carga viral en los días 15 y 30. En las radiografías de tórax de los pacientes hospitalizados son frecuentes los infiltrados pulmonares de moderados a graves y se relacionan con peores resultados,[28] pero como era de esperar, no existían o eran de leves a moderados en nuestra población de estudio ambulatoria. No obstante, la intervención con probióticos se asoció a una reducción significativa de la gravedad de los infiltrados pulmonares en aquellos pacientes que los presentaban, en comparación con el placebo. Es llamativo que los efectos sobre la carga viral en el día 15 fueron significativos, pero notablemente menos pronunciados que en el día 30, mientras que los beneficios sobre los síntomas y los infiltrados pulmonares parecían producirse antes durante la intervención. En este sentido, en publicaciones recientes se sugiere que las partículas víricas activas se correlacionan con la RT-qPCR solo durante el inicio temprano de los síntomas, títulos víricos altos (~7 log y más) y valores bajos de anticuerpos.[29]

Las IgM de unión a espículas del SARS-CoV2 fueron más altas que las IgG al inicio, como se describió anteriormente,[30] pero esta tendencia se invirtió con la intervención. La ingesta de probióticos se asoció a títulos más altos de IgM e IgG de unión a espículas, en comparación con el placebo. Este efecto fue aparentemente homogéneo en función de la edad, pero hay que señalar que nuestra población de estudio tenía un límite de 60 años, por lo que está justificado realizar estudios en pacientes de mayor edad. En nuestro estudio, los títulos más altos de inmunoglobulinas de unión a espículas se correlacionaron con un tiempo más corto hasta la resolución general de los síntomas, especialmente la IgM. Cabe destacar que no se midieron los anticuerpos neutralizantes pero, según investigaciones recientes, las inmunoglobulinas contra los antígenos de la espícula proporcionan una buena correlación tanto con la neutralización[31,32] como con la eficacia,[33] y se ha descubierto que los linfocitos B memoria específicos de la espícula persisten durante meses después de la infección.[34,35] Nuestros hallazgos, junto con la reducción de los infiltrados pulmonares y de la carga viral nasofaríngea, indican que las cepas probióticas específicas utilizadas en este estudio pueden potenciar la inmunidad humoral adquirida contra un patógeno respiratorio, actuando a lo largo de la

MARÍA CASANI FERNÁNDEZ DE NAVARRETE
Traductor/a Intérprete Jurado/a de INGLÉS
Nº 3692

EIP.

Se ha descrito que la microbiota intestinal comensal influye en la inmunidad contra la infección pulmonar vírica en modelos de animales.[36,37] En un estudio aleatorizado previo realizado con más de 4.000 lactantes se describió que la cepa de *L. plantarum* ATCC202195 redujo significativamente la infección de vías respiratorias bajas o sepsis en los lactantes (RR 0,66 [IC al 95%: 0,51-0,88], p = 0,002).[38] *L. plantarum* y las especies de *Lactobacillaceae* relacionadas, como *Pediococci*, son endófitos frecuentes: bacterias que viven en los vegetales silvestres y que son ingeridas con frecuencia por herbívoros y omnívoros.[39] En consecuencia, los sistemas inmunitarios de estos últimos evolucionaron bajo la exposición intestinal repetida a los endófitos, independientemente de que estas bacterias colonicen con éxito el intestino (es decir, se convierten en autóctonos) o son comensales nómadas frecuentes. Inspirados en el éxito del citado estudio aleatorizado,[38] pero bajo la hipótesis de que un cóctel de cepas podría representar mejor una ingesta natural de bacterias de tipo endofítico que una sola cepa, elegimos una fórmula que contenía tres cepas diferentes de *L. plantarum* y una de *P. acidilactici* (todas ellas aisladas originalmente en seres humanos con una dieta rica en verdura y que no consumían probióticos). Sin embargo, hay que destacar que las pruebas existentes indican que los efectos inmunitarios de los probióticos son específicos de cada cepa[4,12] y el efecto de una cepa no puede extrapolarse directamente a otras cepas, aunque sean de la misma especie (p. ej., *L. plantarum*), hasta que se realicen estudios clínicos con criterios de valoración relevantes.

A pesar de que los síntomas desaparecieron en la mayoría de los pacientes, solo se observó un pequeño aumento de la diversidad alfa en la microbiota fecal (una medición indirecta de la microbiota del colon distal) durante el periodo de estudio de 30 días. Además, no se observaron cambios en la diversidad beta a lo largo de la intervención, ni entre grupos ni entre el momento inicial y el día 30. El análisis de coordenadas principales (PCoA) reveló que el enterotipo, y no el tratamiento o el tiempo, fue el principal impulsor de la composición de la microbiota en todo el estudio. Hasta ahora, los cambios en el microbioma fecal asociados a la Covid19 se han estudiado en pacientes hospitalizados y parecen estar asociados a la gravedad de la enfermedad.[40] En este sentido, nuestros resultados indican que los cambios en el microbioma podrían ser mínimos en los pacientes ambulatorios con Covid19, pero esta observación justifica la realización de más estudios.

En nuestra opinión, el hecho de que la intervención probiótica haya conseguido aumentar la respuesta inmunitaria humoral adquirida contra el SARS-CoV2 sin inducir cambios detectables en la microbiota fecal es digno de mención. La microbiota intestinal es un claro ejemplo de sucesión ecológica, en la que los diferentes grupos bacterianos florecen y disminuyen según la disponibilidad y el agotamiento de los nutrientes de la dieta, los metabolitos bacterianos y el oxígeno, todo ello

MARÍA CASANI FERNÁNDEZ DE NAVARRETE
Traductor/a Intérprete Jurado/a de INGLÉS
Nº 3692

bajo la modulación del tiempo de tránsito.[41,42] Esta sucesión ecológica se ve influida, además, por la gran disparidad de densidades bacterianas entre el intestino delgado (que aumenta de 10^4 a 10^8 UFC/ml) y el colon (10^{11}–10^{12} UFC/ml).[43,44] Por lo tanto, la microbiota fecal es un indicador de la microbiota del colon distal pero cada vez es menos representativa de la composición microbiana al retroceder hacia el intestino delgado. Así, el requisito de que un probiótico cambie la microbiota fecal para ser eficaz es un malentendido frecuente.[45] Por ejemplo, una dosis de probiótico de ~10^9 UFC podría emitir una señal microbiana relevante a los cientos de placas de Peyer y folículos linfoides aislados en el íleon, independientemente de los cambios de composición en el colon.[46] Cabe destacar que esta detección de las bacterias lácticas por las células inmunitarias puede requerir su captura por endocitosis.[47,48] Un probiótico también podría desencadenar una reacción adaptativa de la microbiota del huésped que intenta mantener su *statu quo (*es decir, la resiliencia ecológica),[49] lo cual daría lugar a cambios en el proteoma y el metaboloma microbianos, que podrían influir a su vez en la inmunidad del huésped. Si tiene éxito, esta respuesta adaptativa podría evitar que los grandes cambios de composición se extiendan por el colon. En esta situación, los efectos podrían ser detectables solo con la secuenciación de alta resolución (p. ej., variantes de un solo nucleótido)[50] o mediante procedimientos multiómicos. Por último, un probiótico podría superar la respuesta adaptativa de la microbiota del huésped y la sucesión ecológica en cantidades significativas, produciendo claros cambios de composición en todo el colon que podrían modular la inmunidad del huésped. En nuestro estudio, nuestras observaciones parecen descartar esta última opción, ya que no se observaron cambios de composición significativos durante la intervención y el enterotipo inicial no pareció influir en el criterio de valoración principal. En la figura S3 puede verse una representación gráfica de estos posibles mecanismos de acción.

La aparente ausencia de cambios en el microbioma fecal nos lleva a plantear la hipótesis de que los efectos clínicos observados están mediados por moléculas bacterianas producidas por las cepas probióticas o por la adaptación del microbioma del huésped a la ingesta de probióticos. Las señales bacterianas específicas para el sistema inmunitario del huésped pueden ser moléculas pequeñas (p. ej., ácidos grasos de cadena corta, metabolitos del triptófano o ligandos específicos de los receptores de la proteína G), que pueden actuar sobre las células inmunitarias de la mucosa pero que también penetrar en la circulación para sintonizar las células inmunitarias de los tejidos periféricos.[51-53] Las células presentadoras de antígenos también pueden reconocer algunas proteínas de la superficie bacteriana de los *lactobacilos*,[10,11] lo cual podría dar lugar a efectos sistémicos a través de la migración de linfocitos sensibilizados. En el futuro, los estudios deberán dilucidar el mecanismo de acción de este probiótico sobre la inmunidad sistémica. El muestreo de la microbiota ileal y los análisis multiómicos podrían aportar información útil.

MARÍA CASANI FERRER
Traductora-Intérprete Jurada/o de INGLÉS
Nº 3982

Las concentraciones séricas de PCR-as muy elevados son un marcador de mal pronóstico en la Covid19,[3,54] si bien PCR-as solo estaba ligeramente elevada en nuestra población de estudio, ya que ningún paciente mostraba niveles por encima del intervalo normal (es decir, >10 mg/l), y siguió disminuyendo durante la intervención. Por el contrario, la mayoría de los pacientes del estudio mostraron concentraciones séricas anormales de dímero-D (es decir, >0,5 mg/l o µg/ml) al inicio del estudio. Las concentraciones séricas de dímero D disminuyeron tanto en el grupo de probióticos como en el de placebo a medida que avanzaba el estudio, pero el probiótico logró una disminución más rápida en comparación con el placebo. Los niveles elevados de dímero D se asocian a un mayor riesgo de episodios trombóticos, como la embolia pulmonar, y se han asociado a la gravedad y mortalidad de la Covid19 en metaanálisis.[3,55] Por lo tanto, la utilidad de esta fórmula probiótica para ayudar a prevenir las complicaciones trombóticas de la Covid19 requiere más investigaciones.

Los acontecimientos adversos aparecidos durante el tratamiento se definieron como en otros estudios recientes sobre la Covid19[19] y los resultados de este estudio destacan la seguridad de esta formulación probiótica en pacientes ambulatorios con esta enfermedad. Además, no se observaron aumentos en las mediciones de PCR-as. La suplementación humana con probióticos se considera segura en general al observar la historia de su uso en los alimentos, y las autoridades reguladoras la reconocen como tal para la mayoría de las cepas probióticas.[56,57] Por el contrario, el uso de probióticos en pacientes con enfermedades graves sigue siendo controvertido debido a que se plantean dudas sobre la bacteriemia por bacterias lácticas o contaminantes microbianos, especialmente en pacientes inmunodeprimidos o en unidades de cuidados intensivos (UCI).[57-59] Además, la linfopenia es frecuente en los pacientes graves con Covid19[3] y podría interferir con la actividad estimulante de anticuerpos de este probiótico, reduciendo su eficacia. Por lo tanto, se deben realizar más estudios antes de recomendar el uso de este probiótico a los pacientes con Covid19 grave.

Este estudio tiene algunas limitaciones que hay que señalar. En primer lugar, todos los pacientes del estudio eran de etnia hispana y se reclutaron en un único centro. La etnia hispana se ha asociado a una mayor mortalidad por Covid19.[60] En nuestro estudio, la eliminación del virus y la desaparición de los síntomas en el grupo de placebo fueron notablemente más lentas que en estudios similares en los que los pacientes hispanos representaban el 50% o menos de la población del estudio.[18,19] En consecuencia, aunque nuestra población del estudio podría considerarse particularmente difícil, es muy deseable la replicación multicéntrica en otras etnias. En segundo lugar, no se incluyeron en el estudio pacientes mayores de 60 años. La coherencia del efecto en todas las subpoblaciones de edad sugiere que los efectos de este probiótico no se limitan a los adultos jóvenes y está justificado realizar más estudios en poblaciones de mayor edad. En tercer

MARÍA CASANI FERNÁNDEZ DE NAVARRETE
Traductor/a Intérprete Jurado de INGLÉS
Nº 3892

lugar, en nuestro estudio no se produjeron agravamientos de la Covid19 que requirieran hospitalización o ingreso en la UCI o que provocaran la muerte, probablemente debido a que los criterios de entrada impedían la inscripción de pacientes de mayor edad o con una SpO_2 más baja. Por lo tanto, no se ha podido evaluar directamente la utilidad de este probiótico para prevenir el agravamiento o la muerte por Covid19. En cuarto lugar, se utilizaron criterios de entrada poco estrictos en cuanto al uso reciente de probióticos y antibióticos para facilitar el reclutamiento de pacientes, y no se registraron los hábitos dietéticos. Estos factores podrían haber influido en la composición de la microbiota. Sin embargo, el análisis de diversidad beta indicó que los enterotipos explicaban una gran fracción de la variabilidad entre pacientes en la composición de la microbiota en nuestro estudio, siendo ésta notablemente mayor que el efecto combinado observado para los factores antropométricos, dietéticos y de medicación en grandes estudios de cohortes.[61] Dado el tamaño de la muestra, la distribución equilibrada de los enterotipos y la ausencia de un efecto del enterotipo en la tasa de remisión, parece poco probable que los desequilibrios aleatorizados más pequeños de la microbiota puedan explicar los efectos altamente significativos observados en este estudio.

En conclusión, esta composición de cuatro cepas probióticas se asoció a un aumento significativo de la eliminación del virus y la desaparición de los síntomas completos en el día 30 en pacientes ambulatorios con Covid19, en comparación con el placebo. No se pudo evaluar el efecto sobre la hospitalización, la estancia en la UCI y la mortalidad debido a la falta de ocurrencia durante el estudio. También se observaron efectos significativos en la reducción de la duración de los síntomas, la carga viral y los infiltrados pulmonares, al tiempo que aumentaron las IgM e IgG específicas del SARS-CoV2, y el probiótico fue bien tolerado. No se detectaron cambios significativos en la microbiota fecal (un indicador de la microbiota del colon distal), y se confirmó que la eficacia de los probióticos en el criterio de valoración principal era independiente del enterotipo inicial. Por lo tanto, nuestra hipótesis es que este probiótico puede actuar principalmente en el eje intestino-pulmón (EIP) a través de una interacción con el sistema inmunitario del huésped. Cabe destacar que es poco probable que la estimulación observada de la inmunidad humoral dependa de una variante vírica concreta, un rasgo interesante dada la aparición de nuevas variantes del virus. En general, la coherencia de los efectos a través de varios criterios de valoración objetivos y subpoblaciones del estudio justifica que se realicen estudios de replicación en los cuales se debe garantizar que se utilicen las mismas cepas y dosis, teniendo en cuenta que los efectos inmunoestimulantes de este probiótico pueden requerir algunos días de acumulación antes de que se observen los efectos beneficiosos.

MARÍA CASANI FERNÁNDEZ DE NAVARRETE
Traductor/a Intérprete Jurado/a de INGLÉS
Nº 3692

Métodos

Diseño del estudio y participantes

Se realizó un estudio aleatorizado, paralelo, con cuádruple enmascaramiento y controlado con placebo (registrado prospectivamente como NCT04517422). Los pacientes ambulatorios sintomáticos con Covid19, de 18 a 60 años, con confirmación del SARS-CoV2 por RT-qPCR[62] en las 72 horas previas a su inscripción se reclutaron en el Hospital General Dr. Manuel Gea González, un hospital terciario de referencia de Ciudad de México (México). Los pacientes debían presentar uno o más de los siguientes síntomas de la Covid19, con aparición en los 7 días previos a la inscripción: fiebre (>37,5 °C), tos, dolor de cabeza, dolor muscular y disnea. La elección de estos síntomas fue pragmática, basada en la experiencia local con Covid19 en el momento del diseño del estudio. La lista completa de criterios de inclusión y exclusión se encuentra en Métodos suplementarios. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación del Hospital General Dr. Manuel Gea González (ref. 12-120-2020), cumplió con la Declaración de Helsinki y siguió las pautas de publicación CONSORT (Anexo 1 en Información Suplementaria). Todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito.

Aleatorización y enmascaramiento

Se aleatorizó a los pacientes 1:1 en bloques de seis sin estratificación, utilizando una lista de aleatorización generada con Sealed Envelope (https://www.sealedenvelope.com/) por un farmacéutico independiente. Los cuidadores realizaron la inscripción y la asignación. Los productos del estudio (probiótico o placebo) se entregaron en cajas codificadas y anónimas, que eran indistinguibles en forma, color y sabor. Todos los pacientes, cuidadores, investigadores y evaluadores de resultados desconocían la asignación del tratamiento.

Productos del estudio

El producto activo (fórmula probiótica AB21©) consistía en cápsulas que contenían *Lactiplantibacillus plantarum* KABP033 (CECT30292), *L. plantarum* KABP022 (CECT7484), *L. plantarum* KABP023 (CECT7485) y *Pediococcus acidilactici* KABP021 (CECT7483), en una proporción de 3:1:1:1 unidades formadoras de colonias (UFC), respectivamente, y una dosis total de 2×10^9 UFC totales, con un vehículo de maltodextrina. El placebo consistía en cápsulas que contenían únicamente el vehículo de maltodextrina. Se verificó la identidad de las cuatro cepas del producto probiótico y la calidad microbiana de los lotes de probiótico y placebo (Métodos suplementarios). Además, la empresa Silliker Ibérica (Grupo Merieux Nutrisciences), acreditada por la norma ISO17025, controló el probiótico para comprobar la conformidad con la especificación de $\geq2\times10^9$ UFC/cápsula durante todo el estudio en una cámara de estabilidad (25 ± 2 °C, 60 ± 5% de humedad relativa).

MARÍA CASANI FERNÁNDEZ DE NAVARRETE
Traductora Intérprete Jurado/a de INGLÉS
Nº 3692

Procedimientos con los pacientes

El estudio se programó en tres visitas al centro de estudio: día 0 (visita 1), día 15 (visita 2) y día 30 (visita 3). El día 0, los pacientes del estudio recibieron el producto del estudio y se les indicó que lo conservaran a temperatura ambiente y que tomaran una cápsula oral al día, desde el día 1 hasta el día 30, antes del desayuno. Los pacientes también tuvieron acceso a un cuaderno electrónico de informe diario (CDRe) basado en la web para registrar los síntomas. Se proporcionó a cada paciente un termómetro de infrarrojos (Harbin Xiande Technology Development Co, Harbin, China) para su uso en casa durante el estudio.

En todas las visitas del estudio se evaluó la gravedad de Covid19 mediante la escala de progresión clínica de la OMS[17] y se les realizó una radiografía pulmonar de tórax, que se calificó según la puntuación de Brixia[28] utilizando el programa informático IA- Rx (anexo 2 de la Información Suplementaria). Se tomaron muestras de sangre nasofaríngea y venosa en cada visita, y se recogieron muestras fecales en la primera y última visita con el kit GUT-OMR200 (DNAgenotek). Un médico también contactó por teléfono con los pacientes del estudio en los días 5, 10, 20 y 25 (todos, ± 1 día) como parte del seguimiento ambulatorio. Solo se permitía tomar paracetamol (500 mg/dosis, hasta tres veces al día) como medicamento para los síntomas de la Covid19 (cuyo uso se registraba en el CDRe del paciente), a demanda, y no se permitían otros tratamientos para la Covid19 (p. ej., corticoides). A todos los pacientes se les recomendó descansar lo máximo posible y no cambiar su dieta.

Resultados

Al final de la intervención de 30 días se consideraron cinco resultados de eficacia principales, utilizando las definiciones de la Escala de Progresión Clínica de la Organización Mundial de la Salud:[17] i) fracción de pacientes que progresaron a la remisión (puntuación de «0»); ii) fracción que progresó a la hospitalización con enfermedad moderada (puntuación de «4» o «5»); iii) fracción que progresó a la hospitalización con enfermedad grave (puntuación de «6» a «9»); iv) tasa de mortalidad (puntuación de «10»); v) duración de la estancia en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI). La remisión requería una RT-qPCR negativa (eliminación del virus) más la resolución completa de los cinco síntomas de la Covid19 considerados al inicio del estudio (desaparición de los síntomas).

Los resultados secundarios preespecificados fueron: i) carga viral de SARS-CoV2 evaluada por RT-qPCR; ii) títulos de IgG e IgM de unión a espículas de SARS-CoV2 en plasma; iii) infiltrados pulmonares medidos por radiografía de tórax y calificados según la puntuación de Brixia;[28] iv) duración desde la aleatorización de cada uno de los cinco síntomas principales de la Covid19 considerados en el momento inicial: fiebre (>37,5 °C), tos, dolor de cabeza, dolores corporales y

MARÍA CASANI FERNÁNDEZ DE NAVARRETE
Traductora/Intérprete Jurada de Inglés
Nº 3892

dificultad para respirar; v) duración desde la aleatorización de los síntomas digestivos según la GSRS (Gastrointestinal Symptom Rating Scale);[63] vi) proteína C reactiva de alta sensibilidad (PCR-as) y dímero D en suero; y vii) microbioma fecal evaluado por secuenciación del ARNr 16S. Estos resultados se analizaron en todos los pacientes, excepto el microbioma, que se analizó en un subconjunto aleatorizado de 100 pacientes (de 150) por grupo del estudio.

Los resultados exploratorios *(post-hoc)* fueron: i) solidez del criterio de valoración principal frente a los desequilibrios iniciales; ii) importancia del resultado principal en subpoblaciones divididas por edad (menos de 50 años frente a 50 años o más), sexo (hombre frente a mujer), enfermedad asociada metabólica (diabetes, hipertensión u obesidad frente a ninguna), carga viral al inicio (por debajo frente a por encima del valor medio) y tiempo desde el inicio de los síntomas hasta la aleatorización (de uno a cuatro días frente a cinco o más días); iii) tiempo hasta la resolución sintomática general, definida como la desaparición de los cinco síntomas principales de la Covid19; iv) correlación entre la duración de los síntomas y los títulos de IgM e IgG de unión a espículas; v) número de días de uso de paracetamol; y vi) dependencia de la edad de los títulos de IgM e IgG de unión a espículas, la carga viral y la puntuación de la radiografía de tórax.

Un acontecimiento adverso (AA) aparecido durante el tratamiento se definió como cualquier acontecimiento que se presentara por primera vez o cuya gravedad empeorara tras el inicio de la intervención, de forma similar a otros estudios en pacientes ambulatorios de Covid19.[19] El AA grave (AAG) se definió cuando causaba hospitalización, discapacidad o incapacidad persistente, o muerte. La notificación de acontecimientos adversos se supervisó mediante llamadas telefónicas (días 5, 10, 20 y 25) y en visitas al centro del estudio (días 0, 15 y 30). En el análisis de seguridad también se tuvieron en cuenta las concentraciones séricas de PCR-as >10 mg/l que se presentaron durante el tratamiento.

Dado que no se observaron hospitalizaciones a medida que avanzaba el estudio, se modificó el protocolo para incluir la remisión (definida como RT-qPCR negativa más remisión sintomática) entre los criterios de valoración principales, así como la duración de cinco síntomas específicos de la Covid19 (fiebre, tos, dolor de cabeza, dificultad para respirar y dolores corporales) como criterios de valoración secundarios, ya que estos síntomas ya se registraban en los CRDe de los pacientes. Todos estos cambios fueron aprobados por el Comité de Ética de la Investigación antes de que el farmacéutico independiente desenmascarara el estudio (el 3 de febrero de 2021).

Análisis de laboratorio y del microbioma

El análisis del SARS-CoV2 se realizó en muestras nasofaríngeas utilizando un protocolo validado de RT-qPCR (Métodos suplementarios).[62] Para analizar la IgG específica de la proteína de la espícula del SRAS-CoV2 (DiaSorin SpA), la IgM específica de la proteína de la espícula del SRAS-

MARÍA CASANI FERNÁNDEZ DE NAVARRETE
Traductor/a Intérprete Jurado/a de INGLÉS
Nº 3692

CoV2 (Abbot Laboratories), el dímero D (Spinreact SA) y la PCR-as (Abbot Laboratories), según las instrucciones de cada fabricante, se utilizó sangre venosa (almacenada a -70 °C hasta el final del estudio).

El ADN de las muestras fecales obtenidas en los días 0 y 30 se extrajo en un subconjunto aleatorizado de pacientes del grupo probiótico y del grupo placebo (n = 100 cada uno) con el kit de aislamiento Soil DNA de MoBio (Quiagen). Los genes 16*S* del ARNr bacteriano se amplificaron mediante PCR con cebadores de doble código de barras dirigidos a la región V4 (515 F y 806 R) y secuenciados con Miseq (Illumina), obteniendo una media de 29.400 lecturas de calidad filtradas por muestra. Los archivos Fastq se filtraron por calidad y se agruparon en unidades taxonómicas operativas (OTU) con un 97% de similitud utilizando el paquete de software Mothur[64] y se clasificaron utilizando la base de datos Silva.[65] La diversidad alfa (índices de Shannon y Chao1) y la diversidad beta (índice de Bray-Curtiss) se calcularon con el paquete Vegana R. Los cambios en la diversidad alfa se evaluaron con un modelo lineal de efectos mixtos para mediciones repetidas (MMRM) con la visita y el grupo como factores fijos, y una interacción de grupo por visita. La diversidad beta se evaluó mediante un análisis de coordenadas principales (PCoA) y un PERMANOVA de dos vías (visita, grupo e interacción de grupo por visita).

Tamaño de la muestra

No se han encontrado datos publicados sobre el riesgo de que la Covid19 leve evolucione hacia la hospitalización en México y las estimaciones basadas en la experiencia local oscilan entre el 27 y el 67%. Si se toma el valor medio (47%) y se pretende detectar una reducción relativa de al menos el 35%, con un valor alfa bilateral del 5% y una potencia del 80%, se obtienen 150 pacientes por grupo del estudio después de tener en cuenta los abandonos.

Análisis estadísticos

Todos los análisis se realizaron según el grupo de aleatorización asignado, sin exclusión de datos ni imputación de valores perdidos. Todas las pruebas estadísticas fueron bilaterales y las diferencias se consideraron significativas, con $p < 0,05$. En cuanto a los cinco resultados principales se aplicó una corrección de Bonferroni por multiplicidad *post-hoc*, lo que dio como resultado un umbral de significación de $p < 0,01$.

Los resultados principales se evaluaron mediante la prueba de la Chi al cuadrado de Pearson. En cuanto a los resultados secundarios y exploratorios, las diferencias en los días de síntomas se evaluaron con la prueba de Mann-Whitney. Las diferencias entre los grupos a lo largo de los días 0, 15 y 30 en la carga viral del SARS-CoV2, la IgM y la IgG específicas del SARS-CoV2, la PCR-as y el dímero D se evaluaron mediante modelos lineales de efectos mixtos para mediciones repetidas

MARÍA CASANI FERNÁNDEZ DE NAVARRETE
Traductor/a Intérprete Jurado/a de INGLÉS
Nº 3892

(con matriz de covarianza no estructurada), mientras que las diferencias en la puntuación de Brixia de la radiografía de tórax se evaluaron mediante regresión ordinal logit para mediciones repetidas. Estos análisis de mediciones repetidas tenían como factores fijos el grupo y la visita del estudio, y una interacción grupo por visita. Para ajustar el resultado principal a las covariables del momento inicial en el análisis de sensibilidad se utilizó la regresión logística binomial, y para calcular las razones de posibilidades (RP) no ajustados y ajustados según el análisis multivariable y su intervalo de confianza al 95%. El tiempo hasta la resolución global de los síntomas se evaluó mediante un análisis de Kaplan-Meyer, calculándose mediante el método de Cox los cocientes de riesgo (CR) no ajustados y ajustados en el análisis multivariable y sus intervalos de confianza al 95%. Por último, las correlaciones bivariantes se evaluaron mediante el método de rangos de Spearman. Todas las pruebas estadísticas descritas en esta sección se realizaron con el programa SPSS v.24 (IBS Corp.). Los análisis específicos de la microbiota se describen en la sección *Análisis de laboratorio*.

Agradecimientos

Nuestro sincero agradecimiento a Paola Juarez-Valdez, Pamela Paez-Melendez, Yarumi Espinosa-Hernandez y Nidia Gómez-Ramirez por realizar las actividades de enfermería del proyecto.

Contribuciones de los autores

PGC, JEM y ATAA diseñaron el estudio. TGM, CDNR e IJE realizaron los procedimientos de los pacientes. ELO y GLV realizaron los análisis de laboratorio. CJG y PGC recopilaron y trataron los datos. PGC realizó los análisis estadísticos. PGC y JEM redactaron el manuscrito. ATAA realizó la revisión crítica del manuscrito.

Exención de responsabilidades

ATAA informa de que recibe honorarios como ponente de AB-Biotics SA (Grupo Kaneka). JEM es un científico en plantilla sin opciones sobre acciones ni participaciones en AB-Biotics SA (Grupo Kaneka). Otros autores informan de que su centro fue patrocinado por AB-Biotics SA (Kaneka Group) para el trabajo presentado.

Financiación

Este trabajo ha sido patrocinado en su totalidad por AB-Biotics SA (Grupo Kaneka).

ORCID

Pedro Gutiérrez-Castrellón http://orcid.org/0000-0002-9885-9635

Jordi Espadaler-Mazo http://orcid.org/0000-0002-0128-8363

MARÍA CASANI FERNÁNDEZ DE NAVARRETE
Traductor/a Intérprete Jurado/a de INGLÉS
Nº 3692

Declaración de disponibilidad de datos

Los datos que respaldan los resultados de este estudio están disponibles como datos individuales de pacientes (IPD) anonimizados en el depósito público de ZENODO (http://doi.org/10.5281/zenodo.5084711).

Bibliografía

1. Boni MF, Lemey P, Jiang X, Lam TTY, Perry BW, Castoe TA, Rambaut A, Robertson DL. volutionary origins of the SARS-CoV-2 sarbecovirus lineage responsible for the COVID-19 pandemic. Nat Microbiol. 2020;5:1408–1417. doi:10.1038/s41564-020-0771-4.

2. Lavezzo E, Franchin E, Ciavarella C, Cuomo-Dannenburg G, Barzon L, Del Vecchio C, Rossi L, Manganelli R, Loregian A, Navarin N, et al. Suppression of a SARS-CoV-2 outbreak in the Italian municipality of Vo'. Nature. 2020;584:425–429. doi:10.1038/s41586-020-2488-1.

3. Wiersinga WJ, Rhodes A, Cheng AC, Peacock SJ, Prescott HC. Pathophysiology, transmission, diagnosis, and treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19): a review. JAMA. 020;324:782–793. doi:10.1001/jama.2020.12839.

4. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen SJ, et al. Expert consensus document: the international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2014;11:506–514. doi:10.1038/nrgastro.2014.66.

5. Budden KF, Gellatly SL, Wood DLA, Cooper MA, Morrison M, Hugenholtz P, Hansbro PM. Emerging pathogenic links between microbiota and the gut-lung axis. Nat Rev Microbiol. 2017;15:55–63. doi:10.1038/ nrmicro.2016.142.

6. Dang AT, Marsland BJ. Microbes, metabolites, and the gut–lung axis. Mucosal Immunol. 2019;12:843–850. doi:10.1038/s41385-019-0160-6.

7. King S, Glanville J, Sanders ME, Fitzgerald A, Varley D. Effectiveness of probiotics on the duration of illness in healthy children and adults who develop common acute respiratory infectious conditions: a systematic review and meta-analysis. Br J Nutr. 2014;112:41–54. doi:10.1017/ S0007114514000075.

8. Hao Q, Dong BR, Wu T. Probiotics for preventing acute upper respiratory tract infections. ochrane Database Syst Rev. 2015;2015:CD006895. doi:10.1002/14651858. CD006895.pub3.

9. Paineau D, Carcano D, Leyer G, Darquy S, Alyanakian MA, Simoneau G, Bergmann JF, Brassart D, Bornet F, Ouwehand AC. Effects of seven potential probiotic strains on specific immune responses in healthy adults: a double-blind, randomized, controlled trial. FEMS Immunol Med Microbiol. 2008;53:107–113. doi:10.1111/j.1574-695X.2008.00413.x.

10. van Hemert S, Meijerink M, Molenaar D, Bron PA, de Vos P, Kleerebezem M, Wells JM,

MARÍA CASANI FERNÁNDEZ DE NAVARRETE
Traductor/a Intérprete Jurado/a de INGLÉS
Nº 3892

Marco ML. Identification of Lactobacillus plantarum genes modulating the cytokine response of human peripheral blood mononuclear cells. BMC Microbiol. 2010;10:293. doi:10.1186/1471-2180-10-293.

11. Meijerink M, van Hemert S, Taverne N, Wels M, de Vos P, Bron PA, Savelkoul HF, van Bilsen J, Kleerebezem M, Wells JM. Identification of genetic loci in Lactobacillus plantarum that modulate the immune response of dendritic cells using comparative genome hybridization. PLoS One. 2010;5: e10632. doi:10.1371/journal.pone.0010632.

12. Zhao W, Peng C, Sakandar HA, Kwok L-Y, Zhang W. Meta-analysis: randomized trials of Lactobacillus plantarum on immune regulation over the last decades. Front Immunol. 2021;12:728.

13. Baud D, Dimopoulou Agri V, Gibson GR, Reid G, Giannoni E. Using probiotics to flatten the curve of coronavirus disease COVID-2019 pandemic. Front Public Heal. 2020;8:186. doi:10.3389/-fpu h.2020.00186.

14. Mullish BH, Marchesi JR, McDonald JAK, Pass DA, Masetti G, Michael DR, Plummer S, Jack AA, Davies TS, Hughes TR, et al. Probiotics reduce self-reported symptoms of upper respiratory tract infection in overweight and obese adults: should we be considering probiotics during viral pandemics? Gut Microbes. 2021;13:1–9. doi:10.1080/19490976.2021.1900997.

15. Peng J, Zhang M, Yao G, Kwok L-Y, Zhang W. Probiotics as adjunctive treatment for patients contracted COVID-19: current understanding and future needs. Front Nutr. 2021;8:669808. doi:10.3389/ fnut.2021.669808.

16. Ceccarelli G, Borrazzo C, Pinacchio C, Santinelli L, Pietro IG, Cavallari EN, Celani L, Marazzato M, Alessandri F, Ruberto F, et al. Oral bacteriotherapy in patients with COVID-19: a retrospective cohort study. Front Nutr. 2021;7:613928. doi:10.3389/fnut.2020.613928.

17. Marshall JC, Murthy S, Diaz J, Adhikari N, Angus DC, Arabi YM, Baillie K, Bauer M, Berry S, Blackwood B, et al. A minimal common outcome measure set for COVID-19 clinical research. Lancet Infect Dis. 2020;20:e192–7. doi:10.1016/S1473-3099(20)30483-7.

18. Weinreich DM, Sivapalasingam S, Norton T, Ali S, Gao H, Bhore R, Musser BJ, Soo Y, Rofail D, Im J, et al. REGN-COV2, a neutralizing antibody cocktail, in outpatients with Covid-19. N Engl J Med.2021;384:238–251. doi:10.1056/NEJMoa2035002.

19. Gottlieb RL, Nirula A, Chen P, Boscia J, Heller B, Morris J, Huhn G, Cardona J, Mocherla B, Stosor V, et al. Effect of Bamlanivimab as monotherapy or in combination with Etesevimab on viral load in patients with mild to moderate COVID-19: a randomized clinical trial. JAMA. 2021;325:632–644. doi:10.1001/jama.2021.0202.

20. López-Medina E, López P, Hurtado IC, Dávalos DM, Ramirez O, Martínez E, Díazgranados JA, Oñate JM, Chavarriaga H, Herrera S, et al. Effect of Ivermectin on time to resolution of symp-

MARÍA CASANI FERNÁNDEZ DE NAVARRETE
Traductor/a Intérprete Jurado/a de INGLÉS
Nº 3892

toms among adults with mild COVID-19: a randomized clinical trial. JAMA. 2021;325:1426. doi:10.1001/jama.2021.3071.

21. Feld JJ, Kandel C, Biondi MJ, Kozak RA, Zahoor MA, Lemieux C, Borgia SM, Boggild AK, Powis J, McCready J, et al. Peginterferon lambda for the treatment of outpatients with COVID-19: a phase 2, placebo-controlled randomised trial. Lancet Respir Med. 2021;9:498–510. doi:10.1016/S2213-2600(20)30566-X.

22. Jagannathan P, Andrews JR, Bonilla H, Hedlin H, Jacobson KB, Balasubramanian V, Purington N, Kamble S, de Vries CR, Quintero O, et al. Peginterferon Lambda-1a for treatment of outpatients with uncomplicated COVID-19: a randomized placebo-controlled trial. Nat Commun. 2021;12:12. doi:10.1038/s41467-020-20168-2.

23. Reis G, Moreira Silva EADS, Medeiros Silva DC, Thabane L, Singh G, Park JJH, Forrest JI, arari O, Quirino Dos Santos CV, Guimarães de Almeida APF, et al. Effect of early treatment with hydroxychloroquine or Lopinavir and Ritonavir on risk of hospitalization among patients with COVID-19: the TOGETHER randomized clinical trial. JAMA Netw open. 2021;4:e216468. doi:10.1001/jamanetworkopen.2021.6468.

24. Thomas S, Patel D, Bittel B, Wolski K, Wang Q, Kumar A, Il'Giovine ZJ, Mehra R, McWilliams C, Nissen SE, et al. Effect of high-dose Zinc and Ascorbic acid supplementation vs usual care on symptom length and reduction among ambulatory patients with SARS-CoV-2 infection. JAMA Netw Open. 2021;4:e210369. doi:10.1001/jamanetworkopen.2021.0369.

25. Ledford H. COVID antibody treatments show promise for preventing severe disease. Nature. 2021;591:513–514. doi:10.1038/d41586-021-00650-7.

26. Wang P, Nair MS, Liu L, Iketani S, Luo Y, Guo Y, Wang M, Yu J, Zhang B, Kwong PD, et al. Antibody resistance of SARS-CoV-2 variants B.1.351 and B.1.1.7.Nat. 2021 5937857 021;593:130–135. doi:10.1038/ s41586-021-03398-2.

27. Khunti K, Davies MJ, Kosiborod MN, Nauck MA. Long COVID — metabolic risk factors and novel therapeutic management. Nat. Rev. Endocrinol. 2021;17:379–380. oi:10.1038/s41574-021-00495-0.

28. Borghesi A, Zigliani A, Golemi S, Carapella N, Maculotti P, Farina D, Maroldi R. Chest X-ray severity index as a predictor of in-hospital mortality in coronavirus disease 2019: a study of 302 patients from Italy. Int J Infect Dis. 2020;96:291–293. doi:10.1016/j.ijid.2020.05.021.

29. Singh A, Stellrecht K, Arunachalam T, Barman T, Robek M, Waxman M, Elmendorf S, Metzger D. Lack of active SARS-CoV-2 virus in a subset of PCR-positive COVID-19 congregate care patients. J Clin Virol. 2021;141:104879. doi:10.1016/j.jcv.2021.104879.

30. Seow J, Graham C, Merrick B, Acors S, Pickering S, Steel KJA, Hemmings O, O'Byrne A,

MARÍA CASANI FERNÁNDEZ DE NAVARRETE
Traductor/a Intérprete Jurado/a de INGLÉS
Nº 3692

Kouphou N, Galao RP, et al. Longitudinal observation and decline of neutralizing antibody responses in the three months following SARS-CoV-2 infection in humans. Nat Microbiol. 2020;5:1598–1607. doi:10.1038/s41564-020-00813-8.

31. Dispinseri S, Secchi M, Pirillo MF, Tolazzi M, Borghi M, Brigatti C, De Angelis ML, Baratella M, Bazzigaluppi E, Venturi G, et al. Neutralizing antibody responses to SARS-CoV-2 in symptomatic COVID-19 is persistent

and critical for survival. Nat Commun. 2021;12:2670. doi:10.1038/s41467-021-22958-8.

32. Rockstroh A, Wolf J, Fertey J, Kalbitz S, Schroth S, Lübbert C, Ulbert S, Borte S. Correlation of humoral immune responses to different SARS-CoV-2 antigens with virus neutralizing antibodies and symptomatic severity in a German COVID-19 cohort Emerg Microbes Infect. 2021;10:774–781. doi:10.1080/22221751202119139 73.

33. Earle K, Ambrosino D, Fiore-Gartland A, Goldblatt D, Gilbert P, Siber G, Dull P, Plotkin S. Evidence for antibody as a protective correlate for COVID-19 vaccines. Vaccine. 2021;39:4423–4428. doi:10.1016/j.vaccine.2021.05.063.

34. Anand SP, Prévost J, Nayrac M, Beaudoin-Bussières G, Benlarbi M, Gasser R, Brassard N, Laumaea A, Gong SY, Bourassa C, et al. Longitudinal analysis of humoral immunity against ARS-CoV-2 spike in convalescent individuals up to 8 months post-symptom onset. Cell Reports Med. 2021;2:100290. doi:10.1016/j.xcrm.2021.100290.

35. Dan JM, Mateus J, Kato Y, Hastie KM, Yu ED, Faliti CE, Grifoni A, Ramirez SI, Haupt S, Frazier A, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. Science . 2021;371: eabf4063.

36. Abt M, Osborne L, Monticelli L, Doering T, Alenghat T, Sonnenberg G, Paley M, Antenus M, Williams K, Erikson J, et al. Commensal bacteria calibrate the activation threshold of innate antiviral immunity. Immunity. 2012;37:158–170. doi:10.1016/j.immuni.2012.04.011.

37. Bradley KC, Finsterbusch K, Schnepf D, Crotta S, Llorian M, Davidson S, Fuchs SY, Staeheli P, Wack A. Microbiota-driven tonic interferon signals in lung stromal cells protect from influenza virus infection. Cell Rep.

2019;28:245–256.e4. doi:10.1016/j.celrep.2019.05.105.

38. Panigrahi P, Parida S, Nanda NC, Satpathy R, Pradhan L, Chandel D, Baccaglini L, Mohapatra A, Mohapatra SS, Misra PR, et al. A randomized synbiotic trial to prevent sepsis among infants in rural India. Nature. 17;548:407–412. doi:10.1038/nature23480.

39. Martínez-Romero E, Aguirre-Noyola JL, Bustamante-Brito R, González-Román P, Hernández-Oaxaca D, Higareda-Alvear V, Montes-Carreto LM, Martínez-Romero JC, Rosenblueth M, Servín-Garcidueñas LE. We and herbivores eat endophytes. Microb Biotechnol. 2020;1–18.

MARÍA CASANI FERNÁNDEZ DE NAVARRETE
Traductor/a Intérprete Jurado/a de INGLÉS
Nº 3692

40. Yeoh YK, Zuo T, Lui GC-Y-Y, Zhang F, Liu Q, Ayly L, Chung ACCK, Cheung CP, Tso EYYK, Fung KSCS, et al. Gut microbiota composition reflects disease severity and dysfunctional immune responses in patients with COVID-19. Gut. 2021;70:698–706. doi:10.1136/gutjnl-2020-323020.

41. Falony G, Vieira-Silva S, Raes J. Richness and ecosystem development across faecal snapshots of the gut microbiota. Nat. Microbiol. 2018;3:526–528. doi:10.1038/s41564-018-0143-5.

42. Roager HM, Hansen LBS, Bahl MI, Frandsen HL, Carvalho V, Gøbel RJ, Dalgaard MD, Plichta DR, Sparholt MH, Vestergaard H, et al. Colonic transit time is related to bacterial metabolism and mucosal turnover in the gut. Nat Microbiol . 2016;1:16093.

43. Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK. Gut biogeography of the bacterial microbiota. Nat. Rev. Microbiol. 2015;14:20–32. doi:10.1038/nrmicro3552.

44. Kastl AJ, Terry NA, Wu GD, Albenberg LG. The structure and function of the human small intestinal microbiota. Curr Understanding Future Directions. 2020;9:33–45.

45. Wieërs G, Belkhir L, Enaud R, Leclercq S, de Foy J-MP, Dequenne I, de Timary P, Cani PD, Feld JJ, Kandel C, et al. How probiotics affect the microbiota. Front Cell Infect Microbiol. 2019;9:454. doi:10.3389/fcimb.2019.00454.

46. Mörbe UM, Jørgensen PB, Fenton TM, Von Burg N, Riis LB, Spencer J, Agace WW. Human gut-associated lymphoid tissues (GALT); diversity, structure, and function. Mucosal Immunol. 021;14:793–802. doi:10.1038/s41385-021-00389-4.

47. Gutierrez-Merino J, Isla B, Combes T, Martinez-Estrada F, De Motes CM. Beneficial bacteria activate type-I interferon roduction via the intracellular cytosolic sensors STING and MAVS. Gut Microbes. 2020;11:771–788. doi:10.1080/ 19490976.2019.1707015.

48. Weiss G, Rasmussen S, Zeuthen L, Nielsen B, Jarmer H, Jespersen L, Frøkiaer H. Lactobacillus acidophilus induces virus immune defence genes in murine dendritic cells by a Toll-like receptor-2-dependent mechanism. Immunology. 2010;131:268–281. doi:10.1111/j.1365-2567.2010.03301.x.

49. Lozupone C, Stombaugh J, Gordon J, Jansson J, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. Nature. 2012;489:220–230. doi:10.1038/nature11550.

50. Ma C, Zhang C, Chen D, Jiang S, Shen S, Huo D, Huang S, Zhai Q, Zhang J. Probiotic consumption influences universal adaptive mutations in indigenous human and mouse gut microbiota. Commun Biol. 2021;4:1–12. 2021 41. doi:10.1038/s42003-021-02724-8.

51. Colosimo DA, Kohn JA, Luo PM, Piscotta FJ, Han SM, Pickard AJ, Rao A, Cross JR, Cohen LJ, Brady SF. Mapping interactions of microbial metabolites with Human G-protein-coupled receptors. Cell Host Microbe. 2019;26:273–282.e7. doi:10.1016/j.chom.2019.07.002.

MARÍA CASANI FERNÁNDEZ DE NAVARRETE
Traductor/a Intérprete Jurado/a de INGLÉS
Nº 3892

52. Belkaid Y, Harrison OJ. Homeostatic immunity and the microbiota. Immunity. 2017;46:562–576. doi:10.1016/j.immuni.2017.04.008.

53. Lynn DJ, Benson SC, Lynn MA, Pulendran B. Modulation of immune responses to vaccination by the microbiota: implications and potential mechanisms. Nat Rev Immunol. 2021;21:1–14. doi:10.1038/s41577-020-00486-8.

54. Smilowitz NR, Kunichoff D, Garshick M, Shah B, Pillinger M, Hochman JS, Berger JS. C-reactive protein and clinical outcomes in patients with COVID-19. Eur Heart J. 2021;42:2270–2279. doi:10.1093/eurheartj/ehaa1103.

55. Nugroho J, Wardhana A, Maghfirah I, Mulia EPB, Rachmi DA, A'yun MQ, Septianda I. Relationship of D-dimer with severity and mortality in SARS-CoV-2 patients : a meta-analysis. Int J Lab Hematol. 2021;43:110–115. doi:10.1111/ijlh.13336.

56. Koutsoumanis K, Allende A, Alvarez-Ordóñez A, Bolton D, Bover-Cid S, Chemaly M, Davies R, De Cesare A, Hilbert F, Lindqvist R, et al. Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 12: suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2020. EFSA J. 2020;18:e06174. doi:10.2903/j. efsa.2020.6174.

57. Suez J, Zmora N, Segal E, Elinav E. The pros, cons, and many unknowns of probiotics. Nat. Med. 2019;25:716–729. doi:10.1038/s41591-019-0439-x.

58. Yelin I, Flett KB, Merakou C, Mehrotra P, Stam J, Snesrud E, Hinkle M, Lesho E, McGann P, McAdam AJ, et al. Genomic and epidemiological evidence of bacterial transmission from probiotic capsule to blood in ICU patients. Nat Med. 2019;25:1728–1732. doi:10.1038/s41591-019-0626-9.

59. Didari T, Solki S, Mozaffari S, Nikfar S, Abdollahi M. A systematic review of the safety of probiotics. Expert Opin. Drug Saf. 2014;13:227–239. doi:10.1517/14740338. 2014.872627.

60. Gold JAW, Rossen LM, Ahmad FB, Sutton P, Li Z, Salvatore PP, Coyle JP, DeCuir J, Baack BN, Durant TM, et al. Race, ethnicity, and age trends in persons who died from COVID-19 — United States, May–August 2020. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2020;69:1517–1521. doi:10.15585/mmwr. mm6942e1.

61. Falony G, Joossens M, Vieira-Silva S, Wang J, Darzi Y, Faust K, Kurilshikov A, Bonder MJ, Valles-Colomer M, Vandeputte D, et al. Population-level analysis of gut microbiome variation. Science (80-). 2016;352:560–564. doi:10.1126/science.aad3503.

62. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, Bleicker T, Brünink S, Schneider J, Schmidt ML, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Eurosurveillance. 2020;25:2000045. doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.

63. Svedlund J, Sjödin I, Dotevall G. GSRS-A clinical rating scale for gastrointestinal symptoms in patients with irritable bowel syndrome and peptic ulcer disease. Dig Dis Sci. 1988;33:129–134.

MARÍA CASANI FERNÁNDEZ DE NAVARRETE
Traductor/a Intérprete Jurado/a de INGLÉS
Nº 3692

doi:10.1007/BF01535722.

64. Schloss PD. Reintroducing mothur: 10 years later. Appl Environ Microbiol. 2020;86:e02343-19.

65. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. Nucleic Acids Res. 2013;41:D590-6.

Don/Doña MARÍA CASANI FERNÁNDEZ DE NAVARRETE, Traductor/a-Intérprete Jurado/a de inglés, nombrado/a por el Ministerio de Asuntos Exteriores y de Cooperación, CERTIFICA que lo que antecede es traducción fiel y completa al español de un documento redactado en inglés.

En Madrid a diecisiete de enero de dos mil veintidós

MARÍA CASANI FERNÁNDEZ DE NAVARRETE
Traductor/a Intérprete Jurado/a de INGLÉS
Nº 3692

Gut Microbes

ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: https://www.tandfonline.com/loi/kgmi20

Probiotic improves symptomatic and viral clearance in Covid19 outpatients: a randomized, quadruple-blinded, placebo-controlled trial

Pedro Gutiérrez-Castrellón, Tania Gandara-Martí, Ana T. Abreu Y Abreu, Cesar D. Nieto-Rufino, Eduardo López-Orduña, Irma Jiménez-Escobar, Carlos Jiménez-Gutiérrez, Gabriel López-Velazquez & Jordi Espadaler-Mazo

To cite this article: Pedro Gutiérrez-Castrellón, Tania Gandara-Martí, Ana T. Abreu Y Abreu, Cesar D. Nieto-Rufino, Eduardo López-Orduña, Irma Jiménez-Escobar, Carlos Jiménez-Gutiérrez, Gabriel López-Velazquez & Jordi Espadaler-Mazo (2022) Probiotic improves symptomatic and viral clearance in Covid19 outpatients: a randomized, quadruple-blinded, placebo-controlled trial, Gut Microbes, 14:1, 2018899, DOI: 10.1080/19490976.2021.2018899

To link to this article: https://doi.org/10.1080/19490976.2021.2018899

© 2022 The Author(s). Published with license by Taylor & Francis Group, LLC.

View supplementary material

Published online: 11 Jan 2022.

Submit your article to this journal

View related articles

View Crossmark data

MARÍA CASANI FERNÁNDEZ DE NAVARRETE
Traductor/a Intérprete Jurado/a de INGLÉS
Nº 3692

17/1/2022

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=kgmi20

GUT MICROBES
2022, VOL. 14, NO. 1, e2018899 (16 pages)
https://doi.org/10.1080/19490976.2021.2018899

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

RESEARCH PAPER

OPEN ACCESS Check for updates

Probiotic improves symptomatic and viral clearance in Covid19 outpatients: a randomized, quadruple-blinded, placebo-controlled trial

Pedro Gutiérrez-Castrellón[a,b], Tania Gandara-Martí[a], Ana T. Abreu Y Abreu[c], Cesar D. Nieto-Rufino[a], Eduardo López-Orduña[d], Irma Jiménez-Escobar[a], Carlos Jiménez-Gutiérrez[a], Gabriel López-Velazquez[b], and Jordi Espadaler-Mazo[e]

[a]Centro de Investigación Translacional en Ciencias de la Salud, Hospital General Dr. Manuel Gea Gonzalez, Ciudad de México, (CDMX), México; [b]International Scientific Council for Probiotics, Ciudad de México, (CDMX), México; [c]Digestive Unit, Hospital Angeles Pedregal, Ciudad de México, (CDMX), México; [d]DiagnoMol SA de CV, Ciudad de México (CDMX), México; [e]R&D Department, AB-Biotics SA (KANEKA Group) Sant Cugat, (Barcelona) Spain

ABSTRACT

Intestinal bacteria may influence lung homeostasis via the gut-lung axis. We conducted a single-center, quadruple-blinded, randomized trial in adult symptomatic Coronavirus Disease 2019 (Covid19) outpatients. Subjects were allocated 1:1 to probiotic formula (strains *Lactiplantibacillus plantarum* KABP022, KABP023, and KAPB033, plus strain *Pediococcus acidilactici* KABP021, totaling 2×10^9 colony-forming units (CFU)) or placebo, for 30 days. Co-primary endpoints included: i) proportion of patients in complete symptomatic and viral remission; ii) proportion progressing to moderate or severe disease with hospitalization, or death; and iii) days on Intensive Care Unit (ICU). Three hundred subjects were randomized (median age 37.0 years [range 18 to 60], 161 [53.7%] women, 126 [42.0%] having known metabolic risk factors), and 293 completed the study (97.7%). Complete remission was achieved by 78 of 147 (53.1%) in probiotic group compared to 41 of 146 (28.1%) in placebo (RR: 1.89 [95 CI 1.40–2.55]; $P < .001$), significant after multiplicity correction. No hospitalizations or deaths occurred during the study, precluding the assessment of remaining co-primary outcomes. Probiotic supplementation was well-tolerated and reduced nasopharyngeal viral load, lung infiltrates and duration of both digestive and non-digestive symptoms, compared to placebo. No significant compositional changes were detected in fecal microbiota between probiotic and placebo, but probiotic supplementation significantly increased specific IgM and IgG against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV2) compared to placebo. It is thus hypothesized this probiotic primarily acts by interacting with the host's immune system rather than changing colonic microbiota composition. Future studies should replicate these findings and elucidate its mechanism of action (Registration: NCT04517422).

ARTICLE HISTORY
Received 15 July 2021
Revised 3 November 2021
Accepted 22 November 2021

KEYWORDS
Covid19; SARS-CoV2; probiotic; viral load; chest x-ray; acquired immunity; gut-lung axis

Abbreviations: AE: Adverse Event; BMI: Body Mass Index; CONSORT: CONsolidated Standards of Reporting Trials; CFU: Colony-Forming Units; eDRF: Electronic Daily Report Form; GLA: Gut-Lung Axis; GSRS: Gastrointestinal Symptoms Rating Scale; hsCRP: High-sensitivity C-Reactive Protein; HR: Hazard Ratio; ICU: Intensive Care Unit; OR: Odds Ratio; PCoA: Principal Coordinate Analysis; RR: Relative Risk; RT-qPCR: Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction; SARS-CoV2: Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; SpO_2: Peripheral Oxygen Saturation; WHO: World Health Organization

Introduction

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV2) is the causative agent of Coronavirus Disease 2019 (Covid19) global pandemic.[1] SARS-CoV2 infection can range from asymptomatic to death, but most symptomatic patients typically display mild to moderate symptoms, even despite significant viral loads,[2] and their condition can be managed on an outpatient basis. Symptoms can include dry cough, fever, shortness of breath, body aches, headache, fatigue, diarrhea and anosmia among others.[3] However, no therapies have been approved for Covid19 outpatients to date.

Probiotics are defined as "live microorganisms that when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host", and this definition

CONTACT Jordi Espadaler-Mazo espadaler@ab-biotics.com R&D Department, AB-Biotics SA (KANEKA Group), R&D Department, Av. Torre Blanca 57, Sant Cugat, (Barcelona) 08172, Spain

Suppelemental data for this article can be accessed on the publisher's website.

© 2022 The Author(s). Published with license by Taylor & Francis Group, LLC.
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

MARIA CASANI FERNANDEZ DE NAVARRETE
Traductor/a Intérprete Jurado/a de INGLÉS
Nº 3692
17/11/2022

entails the requirement of well-conducted studies in humans in the specified health indication.[4] Recent evidence indicates a crosstalk between the gastro-intestinal tract and respiratory system, along with their respective microbiomes, referred to as the gut-lung axis (GLA).[5,6] Meta-analyses have suggested oral probiotics may have a role in respiratory infections such as cold and influenza, but have also noted significant limitations, such as overreliance on subjective outcomes, small sample sizes and heterogeneity between individual trials.[7,8] Particularly, heterogeneity between trials is not unexpected, as several probiotic effects are strain-specific, particularly immune-related effects.[4,9–12] Based on said evidence, probiotics have been proposed for Covid19.[13–15] At the time of writing, some observational, retrospective evidence has been reported,[16] but no randomized, placebo-controlled trials.

The objective of this study was to test the efficacy and safety of the AB21© probiotic formula (*Lactiplantibacillus plantarum* stains KABP022, KABP023 and KABP033 plus *Pediococcus acidilactici* strain KABP021), in symptomatic Covid19 outpatients, by assessing clinical endpoints, nasopharyngeal and serum biomarkers, and its impact on the fecal microbiome.

Results

Participants

Of the 300 patients randomized, 293 completed the study between August 26th and December 10th 2020 and were available for primary analysis, while 7 were lost to follow-up (3 in probiotic and 4 in placebo, CONSORT Flowchart in Figure 1). Age ranged 18–60 years old, 126 (42.0%) had known metabolic risk factors for severe Covid19 (BMI ≥ 30, diabetes and/or hypertension) and median time from first symptom to study inclusion was 4 days (IQR 3–5). All patients were seropositive for SARS-CoV2-specific IgM, providing further confirmation of Covid19

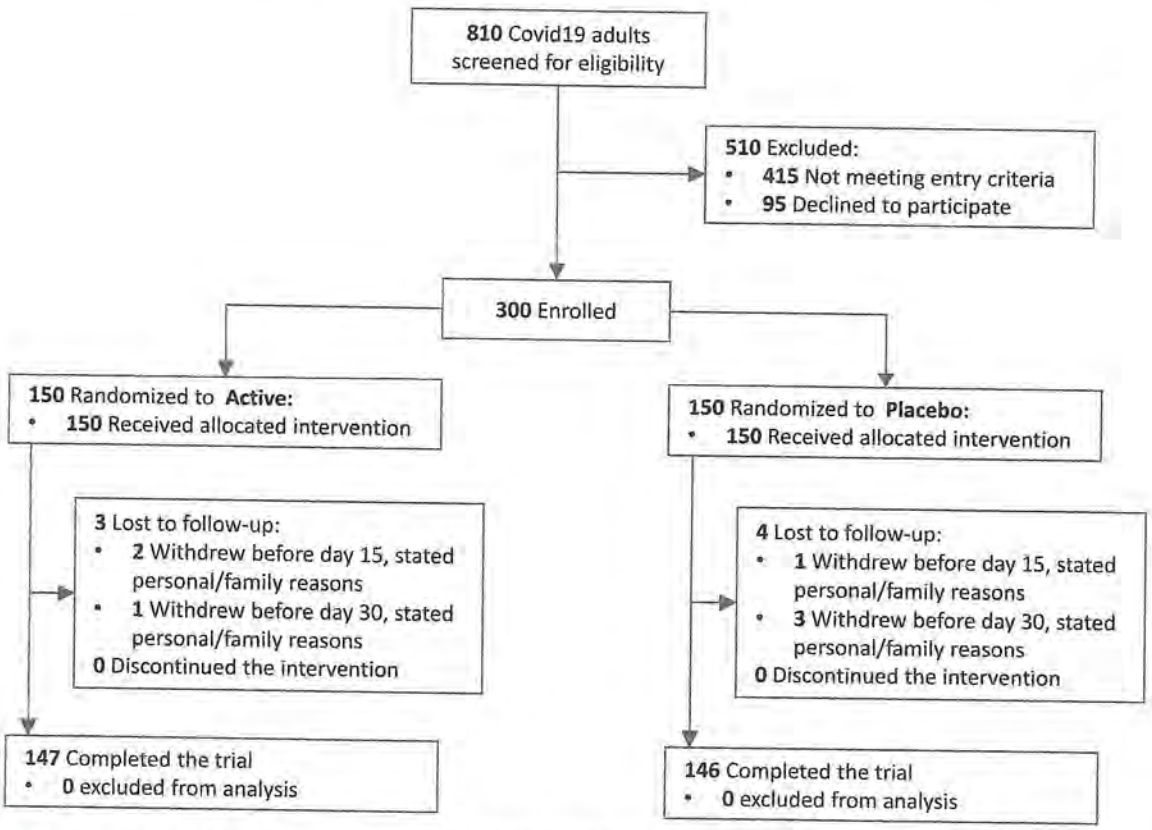


Figure 1. Patient enrollment and treatment assignment to active (≥2×10^9 CFU probiotic) or placebo among symptomatic Covid19 outpatients (CONSORT 2010 Flowchart).

MARÍA CASANI FERNÁNDEZ DE NAVARRETE
Traductor/a Intérprete Jurado/a de INGLÉS
Nº 3892
17/11/2022

diagnosis to RT-qPCR. In general, baseline characteristics were well balanced between groups (Table 1). Most common digestive complaints were diarrhea and nausea, followed by feeling of loose stools or incomplete evacuation and of abdominal pain. All remaining digestive symptoms (*e.g.* constipation, flatus, bloating, reflux) were reported by less than 10% of subjects in both study groups (Table S1), and not considered for further analysis. A few potential baseline imbalances were detected: i) higher incidence of lung infiltrates, of type II obesity, and lower SpO_2 in probiotic group; ii) higher incidence of type I obesity and of shortness of breath in placebo group. Thus, said variables were considered for post-hoc sensitivity analyses.

Primary clinical outcomes

Primary outcome of complete remission (*i.e.* complete symptomatic and viral clearance) on day 30 was achieved by 78 (53.1%) in the probiotic group compared to 41 (28.1%) in placebo (Table 2 and S2), the difference being significant at the multiplicity-corrected threshold of $P = .01$ (RR: 1.89 [95 CI 1.40–2.55], $P < .001$). No hospitalizations, ICU admissions or deaths occurred during the study, preventing the assessment of remaining primary outcomes (Table 2).

Secondary clinical outcomes

Patients in probiotic group reported significantly less days of fever, cough, headache, body aches (myalgia), shortness of breath (dyspnea), nausea, diarrhea and abdominal pain (Table 3). A significant effect was also observed on days with loose stools, although effect size was minimal. Importantly, only effects on fever were independent of their status at baseline, while incidence of other symptoms during the intervention was practically null in subjects who did not display them at study entry already. Patient compliance of electronic daily report form (eDRF) was high, with only 11 subjects in probiotic and 6 in placebo failing to report 100% complete diaries.

Probiotic treatment was associated to lower nasopharyngeal viral load on days 15 and 30 compared to placebo (both $P < .001$; Figure 2(a)). Among subjects with lung infiltrates at baseline

Table 1. Demographic and baseline characteristics of the randomized participants.

Characteristics	Probiotic (n = 150)	Placebo (n = 150)
Age (years) [median, IQR]	34 (26–45)	39 (27–49)
Sex (female) [n, %]	82 (54.7%)	79 (52.7%)
BMI (kg/m^2) [median, IQR]	27.5 (23.3–31.8)	29.4 (27.1–32.9)
• Class I obesity (BMI 30 to <35) [n, %]	31 (20.7%)	72 (48.0%)
• Class II obesity (BMI 35 to <40) [n, %]	16 (10.7%)	0 (0.0%)
Smoker (yes) [n, %]	22 (14.7%)	20 (13.3%)
Diabetes (yes) [n, %]	15 (10.0%)	16 (10.7%)
Arterial hypertension (yes) [n, %]	28 (18.7%)	31 (20.7%)
Taking ≥2 medications daily (yes) [n, %]	24 (16.0%)	18 (12.0%)
Use of acetaminophen (yes) [n, %]	83 (55.3%)	70 (46.7%)
Days from symptom onset [median, IQR]	4 (3–5)	4 (3–5)
Fever (yes) [n, %]	100 (66.7%)	115 (76.7%)
Cough (yes) [n, %]	138 (92.0%)	133 (88.7%)
Headache (yes) [n, %]	134 (89.3%)	127 (84.7%)
Shortness of breath (yes) [n, %]	42 (28.0%)	64 (42.7%)
Body aches (yes) [n, %]	94 (62.7%)	97 (64.7%)
Diarrhea (yes) [n, %]	41 (27.3%)	54 (36.0%)
Loose stools (yes) [n, %]	27 (18.9%)	25 (16.7%)
Nausea (yes) [n, %]	46 (30.7%)	47 (31.3%)
Incomplete evacuation (yes) [n, %]	27 (18.0%)	30 (20.0%)
Abdominal pain (yes) [n, %]	22 (14.7%)	16 (10.7%)
Lung infiltrates (yes) [n, %]	72 (48.0%)	48 (32.0%)
SpO_2 (%) [median, IQR]	90 (90–91)	91 (90–91)
SARS-CoV2 (log10 copies/mL) [median, IQR][a]	6.8 (6.7–6.9)	6.8 (6.6–6.9)
SARS-CoV2 spike IgM (seropositive) [n, %][b]	150 (100%)	150 (100%)
SARS-CoV2 spike IgG (seropositive) [n, %][b]	36 (24.0%)	31 (20.7%)
hsCRP (mg/L) [median, IQR]	3.2 (2.2–4.0)	3.4 (2.8–3.9)
D-Dimer (mg/L) [median, IQR]	2.0 (1.5–2.4)	2.0 (1.3–2.8)

BMI: Body Mass Index. hsCRP: High Sensitivity C-Reactive Protein. IQR: Interquartile range. SpO_2: Peripheral Oxygen Saturation.
a) As measured in nasopharyngeal swabs.
b) As per test kit manufacturer instructions.

MARÍA CASANI FERNÁNDEZ DE NAVARRETE
Traductor/a Intérprete Jurado/a de INGLÉS
Nº 3892
17/11/2022

Table 2. Primary outcomes and safety outcomes at the end of the 30-day intervention.

	Probiotic	Placebo	RR (95 CI)	P-value[c]
Primary outcomes				
Complete remission[a] [n, %]	78/147 (53.1%)	41/146 (28.1%)	1.89 (1.40–2.55)	<0.001
Hospitalized, moderate[b] [n, %]	0/150	0/150	-	1.000
Hospitalized, severe[b] [n, %]	0/150	0/150	-	1.000
Days of ICU stay [mean, SD]	0 ± 0	0 ± 0	-	1.000
Death [n, %]	0/150	0/150	-	1.000
Safety outcomes				
Patients with ≥ 1 AE [n, %]	41/150 (27.3%)	63/150 (42.0%)	0.65 (0.47–0.90)	0.008
• Taking ≥2 medications daily [n, %]	7/24 (29.2%)	8/18 (44.4%)	0.66 (0.29–1.48)	0.312
Patients with ≥ 1 SAE [n, %]	0/150	0/150	-	1.000

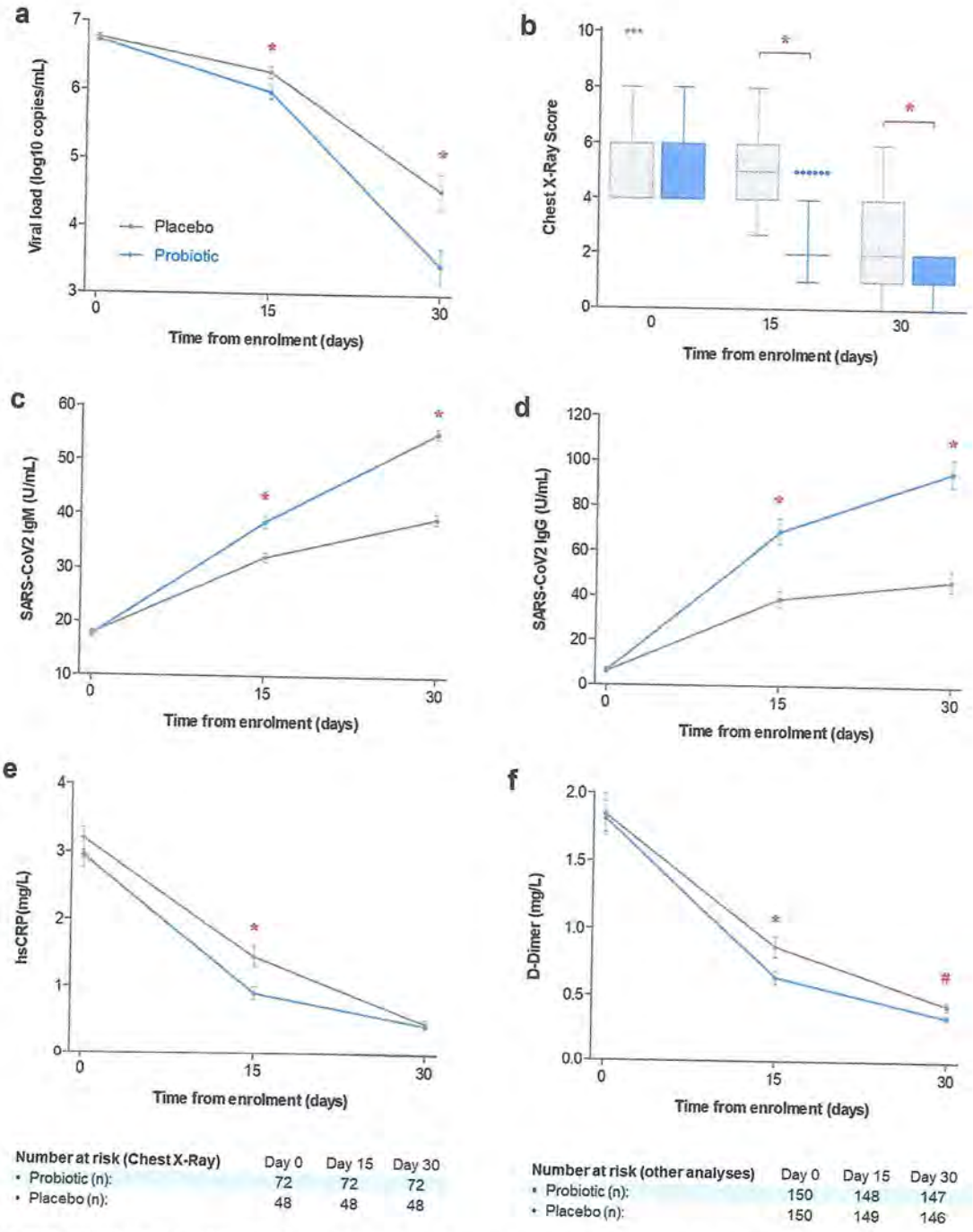
AE: Adverse Event. CI: Confidence Interval. ICU: Intensive Care Unit. SAE: Severe Adverse Event. SD: Standard Deviation. a) Requires negative RT-qPCR (viral clearance) plus complete resolution of all five Covid19 symptoms considered at study entry (symptomatic clearance). b) As per WHO Clinical Progression Scale.[17] c) Calculated by Pearson Chi-squared test, Bonferroni-corrected threshold for significance is $P = 0.01$.

Table 3. Days of each symptom after randomization, reported as median days (interquartile range), according to baseline status for each symptom (presence or absence at study entry). Number of subjects in each subgroup are indicated within parentheses below. *P*-values as calculated by Mann–Whitney non-parametric test. Number of subjects displaying each symptom at baseline within each treatment group can be found in Table 1.

Characteristic and baseline status	Probiotic	Placebo	P-value
Fever (temperature >37.5°C)			
• Present at study entry (n = 215)	2 (1–5)	5 (4–8)	<0.001
• Absent at study entry (n = 85)	2 (0–5)	4 (4–5)	<0.001
Cough			
• Present at study entry (n = 271)	10.5 (8–13)	14 (12–17)	<0.001
• Absent at study entry (n = 29)	0 (0–3.3)	0 (0–0)	0.238
Headache			
• Present at study entry (n = 261)	7 (5–9)	12 (9–14)	<0.001
• Absent at study entry (n = 39)	0 (0–0)	0 (0–0)	0.404
Shortness of breath			
• Present at study entry (n = 106)	2.5 (1–4)	5 (2–6.3)	<0.001
• Absent at study entry (n = 194)	0 (0–0)	0 (0–0)	1.000
Body aches			
• Present at study entry (n = 191)	3 (2–6)	7 (5–9)	<0.001
• Absent at study entry (n = 109)	0 (0–0)	0 (0–0)	0.594
Nausea			
• Present at study entry (n = 93)	2 (0–6)	9 (0–14)	<0.001
• Absent at study entry (n = 207)	0 (0–0)	0 (0–0)	0.479
Diarrhea			
• Present at study entry (n = 95)	4 (0–6)	8.5 (0–13.8)	0.004
• Absent at study entry (n = 205)	0 (0–0)	0 (0–0)	0.555
Loose stools			
• Present at study entry (n = 52)	0 (0–0)	0 (0–2)	0.026
• Absent at study entry (n = 248)	0 (0–0)	0 (0–0)	0.270
Feeling of incomplete evacuation			
• Present at study entry (n = 57)	2 (0–3)	0 (0–3.5)	0.367
• Absent at study entry (n = 243)	0 (0–0)	0 (0–0)	0.304
Abdominal pain			
• Present at study entry (n = 38)	4 (0–6.5)	10 (0–14)	0.031
• Absent at study entry (n = 262)	0 (0–0)	0 (0–0)	0.221
Use of acetaminophen (post-hoc)			
• Present at study entry (n = 153)	1 (0–3)	3 (3–6)	<0.001
• Absent at study entry (n = 147)	1 (0–4)	3 (3–7)	<0.001

(n = 116), probiotic treatment was associated to lower radiographic scoring both on days 15 and 30 (both $P < .001$; Figure 2(b)). None of the subjects negative for lung infiltrates at baseline (n = 184) became positive for infiltrates on days 15 or 30. Compared to placebo, probiotic treatment was also associated to higher serum titers of SARS-CoV2-binding IgG and IgM on days 15 and 30 (all $P < .001$; Figure 2(c,d)) and lower serum levels of high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) and D-Dimer on day 15 (both $P < .001$), but not on day 30 (Figure 2(e,f)).

MARÍA CASANI FERNÁNDEZ DE NAVARRETE
Traductor/a Intérprete Jurado/a de INGLÉS
Nº 3692
17/11/2022



Number at risk (Chest X-Ray)	Day 0	Day 15	Day 30
• Probiotic (n):	72	72	72
• Placebo (n):	48	48	48

Number at risk (other analyses)	Day 0	Day 15	Day 30
• Probiotic (n):	150	148	147
• Placebo (n):	150	149	146

Figure 2. (a) Mean viral load (as base 10 logarithm of viral copies/mL), as measured by SARS-CoV2-specific RT-qPCR. (b) Box plot (median, quartiles, Tukey whiskers and individual outliers) of chest X-ray lug abnormality score, in subjects displaying lung infiltrates at baseline (n = 116). (c) Geometric mean serum titers of SARS-CoV2 spike-binding IgM. (d) Geometric mean serum titers of SARS-CoV2 spike-binding IgG. (e) Geometric means of serum levels of high-sensitivity hs-CRP. (f) Geometric means of serum levels of D-Dimer. Error bars denote 95%CI of the means. Probiotic treatment group is depicted in blue, while placebo is depicted in gray. Main effects of group, visit and group by visit were significant in all analyses ((a) to (f), $P < .001$). (*) Group by visit significance at specific timepoint ($P < .001$); (#) Group by visit statistical trend at specific timepoint ($P < .10$).

MARÍA CASANI FERNÁNDEZ DE NAVARRETE
Traductor/a Intérprete Jurado/a de INGLÉS
Nº 3692

17/1/2022

Compositional changes in gut microbiota

Fecal microbiome composition was characterized in a subset of probiotic and placebo patients (n = 100 each, Figure S2). A small but statistically significant increase in alpha diversity (Shannon index) was observed in both study groups on day 30 compared to day 0 (time effect $P < .001$; Figure 3 (a)), but no significant differences were observed between groups. However, this time-dependent increase in alpha-diversity was not observed in the Chao1 abundance estimator (Figure 3(a)). Similarly, no significant compositional differences were observed between study groups, neither at baseline nor on day 30, based on beta diversity (Bray-Curtis index) (Figure 3(b)). In this regard, Principal Coordinate Analysis (PCoA) clustering was mostly driven by whether the microbiota was dominated by the *Bacteroides* genus, the *Prevotella* genus or the Firmicutes phylum ($P < .0001$, Figure 3 (b)). The first coordinate (x-axis) separated *Prevotella* from *Bacteroides* and Firmicutes, while the second coordinate (y-axis) separated *Bacteroides* from Firmicutes. Noteworthy, no differences were observed in enterotype distribution between study groups (Figure S2).

Post-hoc analyses

Several exploratory analyses were performed on the primary endpoint. Significance for complete remission was retained across all trial subpopulations assessed, defined by age, sex, presence of metabolic comorbidity, baseline viral load and days from symptom onset to randomization (Table S3). Sensitivity analyses were performed to assess the robustness of the primary endpoint to baseline imbalances, and the odds of association between probiotic treatment and complete remission remained statistically significant (unadjusted OR: 2.90 [95 CI 1.78–4.70], multivariate-adjusted OR: 2.98 [95 CI 1.77–5.03]; both P ≤ .001; Table S4). The effect of baseline enterotype on complete remission was also assessed in the subpopulation analyzed for fecal microbiome (n = 200) and remission was found to be independent of enterotype (Table S5).

Median time to overall symptom resolution (symptomatic clearance) was 5 days shorter in probiotic than placebo group ($p < .001$), the significance being robust to baseline imbalances as found by multivariate adjustment (Figure S1). Of note, higher BMI also produced a small but significant

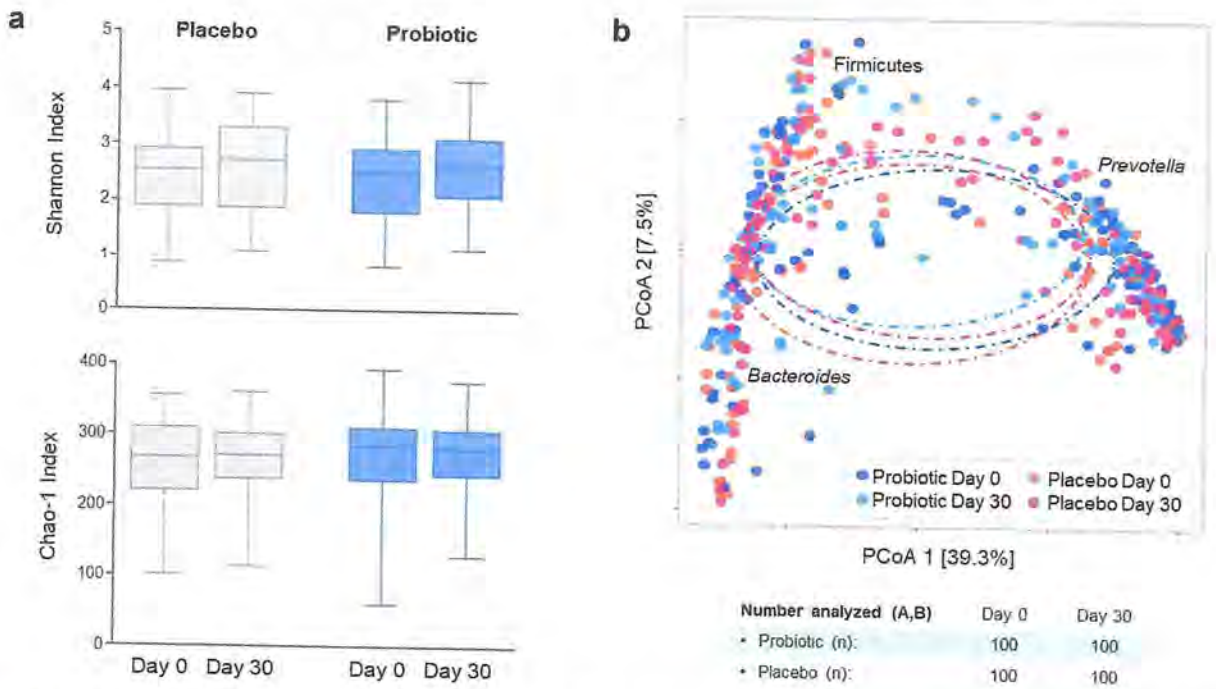


Figure 3. (a) Alpha diversity (Shannon diversity index and Chao1 abundance estimator). (b) Beta diversity (Bray-Curtiss index). Fecal microbiome analyses were performed by 16S rRNA sequencing in a random subset of study subjects (n = 100 from each group); obtained sequences were clustered into 97% similarity operational taxonomic unit (OTUs).

MARÍA CASANI FERNANDEZ DE NAVARRETE
Traductor/a Intérprete Jurado/a de INGLÉS
Nº 3692
17/1/2022

increase in time to symptom resolution. Days to symptom resolution were inversely correlated to IgM titers both on day 15 (rho = −0.25; $P < .001$) and day 30 (rho = −0.35; $P < .001$). A weak correlation was also observed with IgG titers on day 30 (rho = −0.14; $P = .017$), but not on day 15. Besides, days of use of acetaminophen were also significantly reduced in probiotic group (Table 3). Finally, age has been described as a key risk factor in Covid19 pathology, and the effect of age as a continuous covariate was further explored on SARS-CoV2-specific IgM and IgG, viral load and Brixia lung X-ray score. No significant effects were found for age, neither as independent factor nor its interaction with study group or time, for said variables (Table S6).

Safety

Serious adverse events (SAEs) were not reported for any of the 300 study subjects, while treatment-emergent adverse events (AEs) were reported in 41 (27.3%) and 63 (42.0%) subjects of probiotic and placebo groups, respectively (Table 2). The most frequent AEs were emergent fever, cough, body aches, pain when swallowing and conjunctivitis (Table S7), and no treatment-emergent hsCRP elevations occurred during the study. Incidence of AEs was generally higher in placebo than probiotic group, this trend being maintained in patients taking 2 or more medications daily. Therefore, many observed AEs could likely be natural symptom flares in Covid19.

Discussion

Few randomized, controlled trials have found effective therapies at reducing symptom duration and viral load in Covid19 outpatients so far.[18–25] At the time of writing, only a few monoclonal antibodies have been recommended as treatments for Covid19 outpatients by FDA or EMA. Although effective, monoclonal antibodies are expensive, cannot be taken orally and the emergence of new SARS-CoV2 variants could jeopardize their efficacy.[26] Therefore, an oral treatment helping reduce viral load, lung infiltrates and symptom duration could be a good addition to the therapeutic arsenal for Covid19 outpatients.

In this blinded, randomized study in Covid19 outpatients, the probiotic formula achieved a significant effect on improving remission rate against placebo ($p < .001$). No patients were hospitalized or died during the intervention, preventing assessment of remaining co-primary efficacy outcomes (frequency of progression to hospitalization, mortality ration, duration of ICU stay). Recent randomized trials in Covid19 outpatients also found a combined incidence of hospitalization plus emergency department visit of just 6% in placebo groups.[18,19,23] Our entry criteria (*e.g.* maximum age limit of 60 years, $SpO_2 \geq 90\%$) may have resulted in even lower risk of Covid19 worsening. However, the significance of the improvement in remission survived the Bonferroni correction for multiplicity of co-primary outcomes and was robust to multivariate adjustment for potential baseline imbalances, as well as to subject's enterotype. Moreover, post-hoc analyses showed the effect was consistent across study subpopulations defined by age, sex, metabolic comorbidities, viral load at baseline and days from symptom initiation to randomization (all with $p < .05$). The positive effect in patients with metabolic comorbidities (*i.e.* obesity, diabetes and/or hypertension) could be of particular relevance, because of their higher risk of both severe Covid19 and long Covid19.[27]

Because most patients in the study had become symptom-free at the end of the study, complete remission mostly reflected whether patients achieved viral clearance. However, compared to placebo, probiotic intervention was also associated to shorter duration of both intestinal and non-intestinal Covid19 symptoms, shorter time to overall symptom resolution, and lower viral loads on day 15 and 30. Moderate-to-severe lung infiltrates in chest X-ray scans are frequent in hospitalized patients and related to worse outcomes,[28] but as expected, they were absent or mild-to-moderate in our ambulatory study population. Nevertheless, probiotic intervention was associated to a significant reduction in severity of lung infiltrates in those patients displaying them, compared to placebo. Strikingly, effects on viral load on day 15 were significant but markedly less pronounced than on day 30, while benefits on symptoms and lung infiltrates seemed to occur earlier during the intervention. In this regard, recent reports suggest active

MARÍA CASANI FERNÁNDEZ DE NAVARRETE
Traductor/a Intérprete Jurado/a de INGLÉS
Nº 3692
17/11/2022

viral particles correlate with RT-qPCR only during early symptom onset, high viral titers (~7 log and above) and low antibody levels.[29]

SARS-CoV2 spike-binding IgM were higher than IgG at baseline, as previously described,[30] but this trend was reversed across the intervention. Probiotic intake was associated to higher titers of spike-binding IgM and IgG, compared to placebo. This effect was seemingly homogenous across age, but it must be pointed out that our study population was capped at 60 years old, thus studies in older subjects are warranted. In our study, higher spike-binding immunoglobulins correlated to shorter time to overall symptom resolution, especially IgM. Of note, neutralizing antibodies were not measured, but recent research indicates immunoglobulins to spike antigens provide a good correlate to both neutralization[31,32] and efficacy,[33] and spike-specific memory B-cells have been found to persist for months after infection.[34,35] Our findings, together with the reduction of lung infiltrates and of nasopharyngeal viral load, suggest the specific probiotic strains used in this study can potentiate acquired humoral immunity against a respiratory pathogen, acting along the GLA.

Commensal gut microbiota has been found to influence immunity against viral lung infection in animal models.[36,37] A previous randomized trial in more than 4,000 infants reported *L. plantarum* strain ATCC202195 significantly reduced lower respiratory tract infection – sepsis in infants (RR 0.66 [95 CI 0.51–0.88], $P = .002$).[38] *L. plantarum* and related Lactobacillaceae species such as *Pediococci*, are common endophytes: bacteria living in wild vegetables and frequently ingested by herbivores and omnivores.[39] Accordingly, the immune systems of the later evolved under repeated intestinal exposure to endophytes, regardless of whether these bacteria successfully colonize the intestine (*i.e.* become autochthonous) or are frequent nomadic commensals. Inspired by the success of the cited randomized trial[38] but under the hypothesis that a cocktail of strains could better represent a natural ingestion of endophytic-type bacteria than a single strain, we chose a formula containing three different *L. plantarum* strains and one *P. acidilactici* (all of them originally isolated from humans on a vegetable-rich diet and not consuming probiotics). However, it must be stressed that existing evidence indicates probiotic immune effects are strain-specific,[4,12] and effect from one strain cannot be directly extrapolated to other strains, even if from the same species (e.g. *L. plantarum*), until clinical trials with relevant endpoints are conducted.

Despite symptomatic clearance in the majority of patients, only a small increase in the alpha diversity in fecal microbiota (a proxy for distal colon microbiota) was noted across the 30-day study period. Furthermore, no changes in beta diversity were noted across the intervention, neither between groups nor between baseline and day 30. Principal coordinates analysis (PCoA) revealed that enterotype, not treatment or time, was the main driver in microbiota composition across the study. So far, Covid19-associated changes in fecal microbiome have been studied in hospitalized subjects and seem to be associated to the severity of the condition.[40] In this regard, our results suggest microbiome changes could be minimal in Covid19 outpatients, but this observation warrant further studies.

In our view, the fact probiotic intervention succeeded at increasing acquired humoral immune response against SARS-CoV2 while not inducing detectable changes in fecal microbiota is noteworthy. The intestinal microbiota is a clear example of an ecological succession, where different bacterial groups bloom and dwindle following the availability and exhaustion of dietary nutrients, bacterial metabolites and oxygen, all under the modulation of transit time.[41,42] This ecological succession is further influenced by the high disparity in bacterial densities between the small intestine (increasing from 10^4 to 10^8 cfu/mL) and the colon (10^{11}–10^{12} cfu/mL).[43,44] Accordingly, fecal microbiota is a proxy for the microbiota of the distal colon, but it becomes less and less representative of the microbial composition moving backwards toward the small intestine. Thus, the requirement for a probiotic to change fecal microbiota to be efficacious is a frequent misunderstanding.[45] For instance, a probiotic dose of ~10^9 cfu could deliver a relevant microbial signal to the hundreds of Peyer patches and isolated lymphoid follicles in the ileum, regardless of compositional changes in the colon.[46] Of note, this sensing of lactic acid bacteria by immune cells can require their capture by

MARÍA CASANI FERNÁNDEZ DE NAVARRETE
Traductor/a Intérprete Jurado/a de INGLÉS
Nº 3692
17/1/2022

endocytosis.[47,48] A probiotic could also trigger an adaptive reaction by the host's microbiota trying to maintain its *stato quo* (*i.e.* ecological resilience),[49] resulting in microbial proteome and metabolome changes which could in turn influence the host's immunity. If successful, such adaptive response could prevent large compositional changes from extending across the colon. In this scenario, effects could be detectable only with high-resolution sequencing (*e.g.* single-nucleotide variants)[50] or multi-omic approaches. Finally, a probiotic could overcome host's microbiota adaptive response and ecological succession in significant numbers, producing clear compositional changes across the colon which could modulate the host's immunity. In our study, our observations seem to rule out this last option, as no significant compositional changes were observed during the intervention, and baseline enterotype did not seem to influence the primary outcome. A graphical depiction of these possible mechanisms of action can be seen in Fig S3.

The apparent lack of changes in fecal microbiome leads us to hypothesize that observed clinical effects are mediated either by bacterial molecules produced by the probiotic strains or the host microbiome's adaptation to probiotic intake. Specific bacterial signals to the host's immune system might involve small molecules (*e.g.* short chain fatty acids, tryptophan metabolites, specific G-protein receptor ligands), which can act on mucosal immune cells but also permeate into circulation to tune immune cells in peripheral tissues.[51–53] Some bacterial surface proteins in *Lactobacilli* are also recognized by antigen-presenting cells,[10,11] which could result in systemic effects via migration of primed lymphocytes. Future studies should elucidate the mechanism of action of this probiotic on systemic immunity. Ileal microbiota sampling and multi-omic analyses could provide useful information.

Highly elevated serum hsCRP levels are a marker of poor prognosis in Covid19,[3,54] yet hsCRP was only mildly elevated in our study population, as no subject displayed levels above normal range (*i.e.* >10 mg/L), and further declined during the intervention. Conversely, the majority of subjects in the study displayed abnormal serum levels of D-Dimer (*i.e.* >0.5 mg/L or μg/mL) at baseline. D-dimer serum levels declined in both probiotic and placebo groups as the study progressed, but probiotic achieved a faster decrease compared to placebo. Elevated D-Dimer levels are associated to higher risk of thrombotic events such as pulmonary embolism, and have been associated to Covid19 severity and mortality in meta-analyses.[3,55] Therefore, the usefulness of this probiotic formula in helping prevent thrombotic complications in Covid19 warrants further investigations.

Treatment-emergent adverse events were characterized as in recent Covid19 trials[19] and the results of this study highlight the safety of this probiotic formulation in Covid19 outpatients. Besides, no increases in hsCRP measurements were observed. Human supplementation with probiotics is generally considered as safe, based on the history of their use in foods, and is recognized as such for most probiotic strains by regulatory authorities.[56,57] Conversely, probiotic use in patients with severe disease remains controversial due to concerns of bacteremia by lactic acid bacteria or microbial contaminants, especially immunosuppressed patients or those in intensive care units (ICU).[57–59] Moreover, lymphopenia is frequent in severe Covid19 patients[3] and could potentially interfere with the antibody-stimulating activity of this probiotic, reducing its efficacy. Therefore, additional studies must be conducted before the use of this probiotic can be recommended to patients with severe Covid19.

This study has some limitations that must be pointed out. First, all subjects in the study were of Hispanic ethnicity and were recruited in a single center. Hispanic ethnicity has been associated to higher mortality in Covid19.[60] In our study, viral and symptomatic clearance in placebo group were markedly slower than in similar trials where Hispanic subjects accounted for 50% or less of the study population.[18,19] Accordingly, although our study population could be regarded as particularly challenging, yet multicentric replication in other ethnicities is highly desirable. Second, no patients older than 60 years old were included in the study. The consistency of the effect across age subpopulations suggests the effects of this probiotic are not limited to young adults, yet additional studies in older populations are warranted. Third, no Covid19 aggravations requiring of hospitalization

MARÍA CASANI FERNÁNDEZ DE N...
Traductor/a Intérprete Jurado/a de l...
Nº 3692
17/11/2022

or ICU admission or resulting in death occurred in our study, probably owing to entry criteria preventing the entry of older patients or of those with lower SpO_2. Thus, the usefulness of this probiotic on preventing Covid19 aggravation or death could not be directly assessed. Fourth, lenient entry criteria regarding the recent used of probiotics and antibiotics were used to facilitate patient recruitment, and dietary habits were not recorded in this study. These factors could have influenced microbiota composition. However, beta-diversity analysis indicated enterotypes explained a large fraction of the between-subject variability in microbiota composition in our study, these being markedly larger than the observed combined effect for anthropometric, dietary and medication factors in large cohort studies.[61] Given the sample size, balanced distribution of enterotypes and lack of effect of enterotype on remission rate, it would seem unlikely that smaller random microbiota imbalances could explain the highly significant effects observed in this study.

In conclusion, this four-strain probiotic composition was associated with a significant increase in complete viral and symptomatic remission by day 30 in Covid19 outpatients, compared to placebo. Effect on hospitalization, ICU stay, and mortality could not be assessed because of lack of occurrences during the study. Significant effects were also observed in reducing symptom duration, viral load and lung infiltrates while increasing SARS-CoV2-specific IgM and IgG, and probiotic was well tolerated. No significant changes were detected in fecal microbiota (a proxy for distal colon microbiota), and probiotic efficacy on the primary endpoint was confirmed to be independent of the baseline enterotype. We thus hypothesize this probiotic may primarily act on the gut-lung axis (GLA) via crosstalk with the host's immune system. Noteworthy, the observed stimulation of humoral immunity is unlikely to be dependent on a particular viral variant, an interesting trait given the emergence of new viral variants. Overall, consistency of effects across several objective endpoints and study subpopulations warrants replication studies. These studies should ensure the same strains and dose are used, while considering the immune-stimulating effects of this probiotic may require some days of buildup before beneficial effects can be observed.

Methods

Study design and participants

We conducted a randomized, parallel, quadruple-blinded, placebo-controlled study (prospectively registered as NCT04517422). Symptomatic Covid19 outpatients, 18–60 years old, with SARS-CoV2 confirmation by RT-qPCR[62] within 72 h of enrollment were recruited at Hospital General Dr. Manuel Gea Gonzalez, a tertiary referral hospital in Mexico City (Mexico). Patients had to display one or more of the following Covid19 symptoms, with onset within 7 days of enrollment: fever (>37.5°C), cough, headache, muscle pain and shortness of breath. The choice of these symptoms was pragmatic, based on local experience with Covid19 at the time of study design. Full list of inclusion and exclusion criteria can be found in Supplementary Methods. The protocol was approved by the Research Ethics Committee of Hospital General Dr. Manuel Gea Conzalez (ref. 12–120-2020), complied with the Helsinki Declaration and followed the CONSORT reporting guideline (Annex 1 in Supplementary Information). All participants provided written, informed consent.

Randomization and blinding

Subjects were randomized 1:1 in blocks of six without stratification, using a randomization list generated with Sealed Envelope (https://www.sealedenvelope.com/) by an independent pharmacist. Enrollment and allocation were conducted by caregivers. Study products (probiotic or placebo) were given in coded, anonymous boxes, and were indistinguishable in form, color, and taste. All subjects, caregivers, investigators, and outcome assessors were unaware of the treatment allocation.

Study products

The active product (AB21© probiotic formula) consisted of capsules containing *Lactiplantibacillus plantarum* KABP033 (CECT30292), *L. plantarum* KABP022 (CECT7484), *L. plantarum* KABP023 (CECT7485) and *Pediococcus acidilactici* KABP021 (CECT7483), in a ratio of 3:1:1:1 colony-forming units (CFU), respectively, and a total dose of $\geq 2\times10^9$ total CFU, with a maltodextrin carrier.

MARÍA CASANI FERNÁNDEZ DE [illegible]
Traductor/a Intérprete Jurado/a de [illegible]
Nº 3892
17/11/2022

Placebo product consisted of capsules containing the maltodextrin carrier only. Identity of the four strains in the probiotic product and microbial quality of probiotic and placebo batches were verified (Supplementary Methods). Probiotic was also monitored for conformance to the specification of $\geq 2\times10^9$ CFU/capsule throughout the study in stability chamber (25 ± 2°C, 60 ± 5% relative humidity) by ISO17025-accredited company Silliker Iberica (Merieux Nutrisciences Group).

Patient procedures

The study was scheduled across three study site visits: day 0 (visit 1), day 15 (visit 2) and day 30 (visit 3). On day 0, study subjects were given the study product and were instructed to store it at room temperature and take one oral capsule daily, from day 1 to day 30, before breakfast. Subjects were also given access to a web-based electronic daily report form (eDRF) for symptoms recording. An infrared thermometer (Harbin Xiande Technology Development Co, Harbin, China) was provided to each subject for at home use during the study.

On all study visits, subjects were assessed for Covid19 severity using WHO Clinical Progression Scale[17] and received chest pulmonary X-ray, which was rated according to Brixia score[28] using the IA-Rx software (Annex 2 in Supplementary Information). Nasopharyngeal and venous blood samples were taken on each visit, and fecal samples were collected on the first and last visit with the GUT-OMR200 kit (DNAgenotek). Study subjects were also contacted by phone on days 5, 10, 20 and 25 (all ± 1 day) by a physician, as part of outpatient follow-up. Only acetaminophen (500 mg/dose, up to three times a day) was allowed as comedication for Covid19 symptoms (use was recorded in patient's eDRF), to be used on-demand, and no other Covid19 therapies (*e.g.* corticosteroids) were allowed. All patients were recommended to rest as much as possible and not to change their diet.

Outcomes

Five co-primary efficacy outcomes were considered at the end of the 30 days intervention, using definitions from World Health Organization Clinical Progression Scale:[17] i) fraction of subjects who progressed to remission (score of "0"); ii) fraction who progressed to hospitalization with moderate disease (scores of "4" or "5"); iii) fraction who progressed to hospitalization with severe disease (scores of "6" to "9"); iv) mortality rate (score of "10"); v) length of stay in Intensive Care Unit (ICU). Remission required a negative RT-qPCR (viral clearance) plus complete resolution of all five Covid19 symptoms considered at study entry (symptomatic clearance).

Prespecified secondary outcomes included: i) SARS-CoV2 viral load evaluated by RT-qPCR; ii) Plasma SARS-CoV2 spike-binding IgG and IgM titers; iii) lung infiltrates measured by chest X-ray and rated according to Brixia score;[28] iv) duration from randomization of each of the five core Covid19 symptoms considered at baseline: fever (>37.5°C), cough, headache, body aches and shortness of breath; v) duration from randomization of gastrointestinal symptoms according to GSRS (Gastrointestinal Symptom Rating Scale);[63] vi) serum high sensitivity C-reactive protein (hsCRP) and D-Dimer; and vii) fecal microbiome evaluated by 16S rRNA sequencing. These outcomes were analyzed in all subjects, except for microbiome which was analyzed in a random subset of 100 subjects (out of 150) per study arm.

Exploratory (*post-hoc*) outcomes included: i) robustness of the primary endpoint to baseline imbalances; ii) significance of the primary outcome in subpopulations split by age (less than 50 years old vs 50 years and older), sex (male vs female), metabolic comorbidity (diabetes, hypertension or obesity vs none), viral load at baseline (below vs above median value) and time from symptom onset to randomization (one to four days vs five or more days); iii) time to overall symptomatic resolution, defined as the disappearance of all five core Covid19 symptoms; iv) correlation between symptom duration and spike-binding IgM and IgG titers; v) number of days of use of acetaminophen; and vi) age-dependence of spike-binding IgM and IgG titers, viral load and chest X-ray score.

A treatment-emergent adverse event (AE) was defined as any event that first occurred or worsened in severity after the initiation of the intervention,

17/11/2022

MARIA CASANI FERNÁNDEZ DE NAVARRETE
Traductor/a Intérprete Jurado/a de INGLÉS
Nº 3692

akin to other trials in Covid19 outpatients.[19] A serious AE (SAE) was defined when causing hospitalization, persistent disability or incapacitation, or death. Reporting of adverse events was monitored in phone calls (days 5, 10, 20, and 25) and study site visits (days 0, 15, and 30). Treatment-emergent serum levels of hsCRP >10 mg/L were also considered in safety analysis.

Because no hospitalizations were observed as the study progressed, the protocol was amended to include remission (defined as negative RT-qPCR plus symptomatic remission) to primary outcomes, as well as the duration of five specific Covid19 symptoms (fever, cough, headache, shortness of breath and body aches) as secondary outcomes, since these symptoms were already being recorded in patients eDRFs. All these changes were granted approval by the Research Ethics Committee before study unblinding by the independent pharmacist (on February 3, 2021).

Laboratory and microbiome analyses

SARS-CoV2 analysis was performed on nasopharyngeal samples using a validated RT-qPCR protocol (Supplementary Methods).[62] Venous blood (stored at −70°C until the end of the study) was used to assay for SARS-CoV2 spike protein-specific IgG (DiaSorin SpA), SARS-CoV2 spike protein-specific IgM (Abbot Laboratories), D-dimer (Spinreact SA) and hsCRP (Abbot Laboratories), according to manufacturer's instructions.

DNA was extracted from fecal samples obtained on days 0 and 30 from a random subset of patients from probiotic and placebo group (n = 100 each) with MoBio's Soil DNA Isolation kit (Quiagen). Bacterial 16*S* rRNA genes were PCR-amplified with dual-barcoded primers targeting the V4 region (515 F and 806 R) and sequenced with Miseq (Illumina), obtaining an average of 29,400 quality-filtered reads per sample. Fastq files were quality-filtered and clustered into 97% similarity operational taxonomic unit (OTUs) using the Mothur software package[64] and classified using the Silva database.[65] Alpha-diversity (Shannon and Chao1 indexes) and beta-diversity (Bray-Curtiss index) were computed using the vegan R package. Changes in alpha diversity were assessed with a linear mixed-effect model for repeated measures (MMRMs) with visit and group as fixed factors, and a group by visit interaction. Beta diversity was assessed by Principal Coordinate Analysis (PCoA) and 2-way PERMANOVA (visit, group and group by visit interaction).

Sample size

No published data could be found regarding the risk of mild Covid19 progressing to hospitalization in Mexico, estimates based on local experience ranging 27% to 67%. Taking the average value (47%) and aiming at detecting a relative reduction of at least 35% with a two-sided alpha = 5% and power = 80% resulted in 150 subjects per study arm after accounting for dropouts.

Statistical analyses

All analyses were performed according to allocated randomization group, without any data exclusion or imputation for missing values. All statistical tests were two-tailed, and differences were considered significant at $P < .05$. For the five co-primary outcomes, a Bonferroni-type correction for multiplicity was applied *post-hoc*, resulting in a significance threshold of $P < .01$.

Co-primary outcomes were assessed by Pearson's Chi-squared test. For secondary and exploratory outcomes, differences in days of symptoms were assessed with Mann–Whitney test. Differences between groups across days 0,15 and 30 in SARS-CoV2 viral load, SARS-CoV2-specific IgM and IgG, hsCRP and D-Dimer were assessed by linear mixed-effects models for repeated measures (with unstructured covariance matrix), while differences in Chest-X ray Brixia score were assessed by logit ordinal regression for repeated measures. These repeated measures analyses had study group and visit as fixed factors, and a group-by-visit interaction. Binomial logistic regression was used when adjusting primary outcome for baseline covariates in sensitivity analysis, and to calculate unadjusted and multivariate-adjusted odd-ratios (OR) and their 95% confidence interval. Time to overall symptom resolution was assessed by Kaplan-Meyer analysis, unadjusted and multivariate-adjusted hazard ratios (HR) and their 95% confidence intervals being calculated by Cox method. Finally, bivariate correlations were assessed by Spearman's rank method. All statistical tests described in this section were performed

MARÍA CASANI FERNÁNDEZ DE NAVARRETE
Traductor/a Intérprete Jurado/a de INGLÉS
Nº 3692
17/11/2022

with the SPSS program v.24 (IBS Corp.). Microbiota-specific analyses are described in the *Laboratory analyses* section.

Acknowledgments

Our sincere thanks to thank Paola Juarez-Valdez, Pamela Paez-Melendez, Yarumi Espinosa-Hernandez and Nidia Gómez-Ramirez for the nursing activities of the project.

Author contributions

PGC, JEM, and ATAA designed the study. TGM, CDNR, and IJE performed patient procedures. ELO and GLV performed laboratory analyses. CJG and PGC collected and curate the data. PGC conducted the statistical analyses. PGC and JEM drafted the manuscript. ATAA critically revised the manuscript.

Disclosure statement

ATAA reports receiving speaker fees from AB-Biotics SA (Kaneka Group). JEM is a staff scientist with no stock options or shares at AB-Biotics SA (Kaneka Group). Other authors report their institution was sponsored by AB-Biotics SA (Kaneka Group) for the submitted work.

Funding

This work was fully sponsored by AB-Biotics SA (Kaneka Group).

ORCID

Pedro Gutiérrez-Castrellón http://orcid.org/0000-0002-9885-9635

Jordi Espadaler-Mazo http://orcid.org/0000-0002-0128-8363

Data availability statement

The data that support the findings of this study are available as deidentified individual patient data (IPD) in the ZENODO public repository (http://doi.org/10.5281/zenodo.5084711).

References

1. Boni MF, Lemey P, Jiang X, Lam TTY, Perry BW, Castoe TA, Rambaut A, Robertson DL. Evolutionary origins of the SARS-CoV-2 sarbecovirus lineage responsible for the COVID-19 pandemic. Nat Microbiol. 2020;5:1408–1417. doi:10.1038/s41564-020-0771-4.
2. Lavezzo E, Franchin E, Ciavarella C, Cuomo-Dannenburg G, Barzon L, Del Vecchio C, Rossi L, Manganelli R, Loregian A, Navarin N, et al. Suppression of a SARS-CoV-2 outbreak in the Italian municipality of Vo'. Nature. 2020;584:425–429. doi:10.1038/s41586-020-2488-1.
3. Wiersinga WJ, Rhodes A, Cheng AC, Peacock SJ, Prescott HC. Pathophysiology, transmission, diagnosis, and treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19): a review. JAMA. 2020;324:782–793. doi:10.1001/jama.2020.12839.
4. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen SJ, et al. Expert consensus document: the international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2014;11:506–514. doi:10.1038/nrgastro.2014.66.
5. Budden KF, Gellatly SL, Wood DLA, Cooper MA, Morrison M, Hugenholtz P, Hansbro PM. Emerging pathogenic links between microbiota and the gut-lung axis. Nat Rev Microbiol. 2017;15:55–63. doi:10.1038/nrmicro.2016.142.
6. Dang AT, Marsland BJ. Microbes, metabolites, and the gut–lung axis. Mucosal Immunol. 2019;12:843–850. doi:10.1038/s41385-019-0160-6.
7. King S, Glanville J, Sanders ME, Fitzgerald A, Varley D. Effectiveness of probiotics on the duration of illness in healthy children and adults who develop common acute respiratory infectious conditions: a systematic review and meta-analysis. Br J Nutr. 2014;112:41–54. doi:10.1017/S0007114514000075.
8. Hao Q, Dong BR, Wu T. Probiotics for preventing acute upper respiratory tract infections. Cochrane Database Syst Rev. 2015;2015:CD006895. doi:10.1002/14651858.CD006895.pub3.
9. Paineau D, Carcano D, Leyer G, Darquy S, Alyanakian MA, Simoneau G, Bergmann JF, Brassart D, Bornet F, Ouwehand AC. Effects of seven potential probiotic strains on specific immune responses in healthy adults: a double-blind, randomized, controlled trial. FEMS Immunol Med Microbiol. 2008;53:107–113. doi:10.1111/j.1574-695X.2008.00413.x.
10. van Hemert S, Meijerink M, Molenaar D, Bron PA, de Vos P, Kleerebezem M, Wells JM, Marco ML. Identification of Lactobacillus plantarum genes modulating the cytokine response of human peripheral blood mononuclear cells. BMC Microbiol. 2010;10:293. doi:10.1186/1471-2180-10-293.
11. Meijerink M, van Hemert S, Taverne N, Wels M, de Vos P, Bron PA, Savelkoul HF, van Bilsen J, Kleerebezem M, Wells JM. Identification of genetic loci in Lactobacillus plantarum that modulate the immune response of dendritic cells using comparative genome hybridization. PLoS One. 2010;5:e10632. doi:10.1371/journal.pone.0010632.

MARÍA CASANI FERNÁNDEZ
Traductor/a Intérprete Jurado/a de INGLÉS
Nº 3892
17/1/2022

12. Zhao W, Peng C, Sakandar HA, Kwok L-Y, Zhang W. Meta-analysis: randomized trials of Lactobacillus plantarum on immune regulation over the last decades. Front Immunol. 2021;12:728.
13. Baud D, Dimopoulou Agri V, Gibson GR, Reid G, Giannoni E. Using probiotics to flatten the curve of coronavirus disease COVID-2019 pandemic. Front Public Heal. 2020;8:186. doi:10.3389/fpubh.2020.00186.
14. Mullish BH, Marchesi JR, McDonald JAK, Pass DA, Masetti G, Michael DR, Plummer S, Jack AA, Davies TS, Hughes TR, et al. Probiotics reduce self-reported symptoms of upper respiratory tract infection in overweight and obese adults: should we be considering probiotics during viral pandemics? Gut Microbes. 2021;13:1–9. doi:10.1080/19490976.2021.1900997.
15. Peng J, Zhang M, Yao G, Kwok L-Y, Zhang W. Probiotics as adjunctive treatment for patients contracted COVID-19: current understanding and future needs. Front Nutr. 2021;8:669808. doi:10.3389/fnut.2021.669808.
16. Ceccarelli G, Borrazzo C, Pinacchio C, Santinelli L, Pietro IG, Cavallari EN, Celani L, Marazzato M, Alessandri F, Ruberto F, et al. Oral bacteriotherapy in patients with COVID-19: a retrospective cohort study. Front Nutr. 2021;7:613928. doi:10.3389/fnut.2020.613928.
17. Marshall JC, Murthy S, Diaz J, Adhikari N, Angus DC, Arabi YM, Baillie K, Bauer M, Berry S, Blackwood B, et al. A minimal common outcome measure set for COVID-19 clinical research. Lancet Infect Dis. 2020;20:e192–7. doi:10.1016/S1473-3099(20)30483-7.
18. Weinreich DM, Sivapalasingam S, Norton T, Ali S, Gao H, Bhore R, Musser BJ, Soo Y, Rofail D, Im J, et al. REGN-COV2, a neutralizing antibody cocktail, in outpatients with Covid-19. N Engl J Med. 2021;384:238–251. doi:10.1056/NEJMoa2035002.
19. Gottlieb RL, Nirula A, Chen P, Boscia J, Heller B, Morris J, Huhn G, Cardona J, Mocherla B, Stosor V, et al. Effect of Bamlanivimab as monotherapy or in combination with Etesevimab on viral load in patients with mild to moderate COVID-19: a randomized clinical trial. JAMA. 2021;325:632–644. doi:10.1001/jama.2021.0202.
20. López-Medina E, López P, Hurtado IC, Dávalos DM, Ramirez O, Martínez E, Díazgranados JA, Oñate JM, Chavarriaga H, Herrera S, et al. Effect of Ivermectin on time to resolution of symptoms among adults with mild COVID-19: a randomized clinical trial. JAMA. 2021;325:1426. doi:10.1001/jama.2021.3071.
21. Feld JJ, Kandel C, Biondi MJ, Kozak RA, Zahoor MA, Lemieux C, Borgia SM, Boggild AK, Powis J, McCready J, et al. Peginterferon lambda for the treatment of outpatients with COVID-19: a phase 2, placebo-controlled randomised trial. Lancet Respir Med. 2021;9:498–510. doi:10.1016/S2213-2600(20)30566-X.
22. Jagannathan P, Andrews JR, Bonilla H, Hedlin H, Jacobson KB, Balasubramanian V, Purington N, Kamble S, de Vries CR, Quintero O, et al. Peginterferon Lambda-1a for treatment of outpatients with uncomplicated COVID-19: a randomized placebo-controlled trial. Nat Commun. 2021;12:12. doi:10.1038/s41467-020-20168-2.
23. Reis G, Moreira Silva EADS, Medeiros Silva DC, Thabane L, Singh G, Park JJH, Forrest JI, Harari O, Quirino Dos Santos CV, Guimarães de Almeida APF, et al. Effect of early treatment with hydroxychloroquine or Lopinavir and Ritonavir on risk of hospitalization among patients with COVID-19: the TOGETHER randomized clinical trial. JAMA Netw open. 2021;4:e216468. doi:10.1001/jamanetworkopen.2021.6468.
24. Thomas S, Patel D, Bittel B, Wolski K, Wang Q, Kumar A, Il'Giovine ZJ, Mehra R, McWilliams C, Nissen SE, et al. Effect of high-dose Zinc and Ascorbic acid supplementation vs usual care on symptom length and reduction among ambulatory patients with SARS-CoV-2 infection. JAMA Netw Open. 2021;4:e210369. doi:10.1001/jamanetworkopen.2021.0369.
25. Ledford H. COVID antibody treatments show promise for preventing severe disease. Nature. 2021;591:513–514. doi:10.1038/d41586-021-00650-7.
26. Wang P, Nair MS, Liu L, Iketani S, Luo Y, Guo Y, Wang M, Yu J, Zhang B, Kwong PD, et al. Antibody resistance of SARS-CoV-2 variants B.1.351 and B.1.1.7. Nat. 2021 5937857 2021;593:130–135. doi:10.1038/s41586-021-03398-2.
27. Khunti K, Davies MJ, Kosiborod MN, Nauck MA. Long COVID — metabolic risk factors and novel therapeutic management. Nat. Rev. Endocrinol. 2021;17:379–380. doi:10.1038/s41574-021-00495-0.
28. Borghesi A, Zigliani A, Golemi S, Carapella N, Maculotti P, Farina D, Maroldi R. Chest X-ray severity index as a predictor of in-hospital mortality in coronavirus disease 2019: a study of 302 patients from Italy. Int J Infect Dis. 2020;96:291–293. doi:10.1016/j.ijid.2020.05.021.
29. Singh A, Stellrecht K, Arunachalam T, Barman T, Robek M, Waxman M, Elmendorf S, Metzger D. Lack of active SARS-CoV-2 virus in a subset of PCR-positive COVID-19 congregate care patients. J Clin Virol. 2021;141:104879. doi:10.1016/j.jcv.2021.104879.
30. Seow J, Graham C, Merrick B, Acors S, Pickering S, Steel KJA, Hemmings O, O'Byrne A, Kouphou N, Galao RP, et al. Longitudinal observation and decline of neutralizing antibody responses in the three months following SARS-CoV-2 infection in humans. Nat Microbiol. 2020;5:1598–1607. doi:10.1038/s41564-020-00813-8.
31. Dispinseri S, Secchi M, Pirillo MF, Tolazzi M, Borghi M, Brigatti C, De Angelis ML, Baratella M, Bazzigaluppi E, Venturi G, et al. Neutralizing antibody responses to SARS-CoV-2 in symptomatic COVID-19 is persistent and critical for survival. Nat Commun. 2021;12:2670. doi:10.1038/s41467-021-22958-8.
32. Rockstroh A, Wolf J, Fertey J, Kalbitz S, Schroth S, Lübbert C, Ulbert S, Borte S. Correlation of humoral immune responses to different SARS-CoV-2 antigens

17/1/2022

MARÍA CASANI FERNÁNDEZ DE NAVARRETE
Traductor/a Intérprete Jurado/a de INGLÉS
Nº 3892

with virus neutralizing antibodies and symptomatic severity in a German COVID-19 cohort Emerg Microbes Infect . 2021;10:774–781. doi:10.1080/2222175120211913973.
33. Earle K, Ambrosino D, Fiore-Gartland A, Goldblatt D, Gilbert P, Siber G, Dull P, Plotkin S. Evidence for antibody as a protective correlate for COVID-19 vaccines. Vaccine. 2021;39:4423–4428. doi:10.1016/j.vaccine.2021.05.063.
34. Anand SP, Prévost J, Nayrac M, Beaudoin-Bussières G, Benlarbi M, Gasser R, Brassard N, Laumaea A, Gong SY, Bourassa C, et al. Longitudinal analysis of humoral immunity against SARS-CoV-2 spike in convalescent individuals up to 8 months post-symptom onset. Cell Reports Med. 2021;2:100290. doi:10.1016/j.xcrm.2021.100290.
35. Dan JM, Mateus J, Kato Y, Hastie KM, Yu ED, Faliti CE, Grifoni A, Ramirez SI, Haupt S, Frazier A, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. Science . 2021;371: eabf4063.
36. Abt M, Osborne L, Monticelli L, Doering T, Alenghat T, Sonnenberg G, Paley M, Antenus M, Williams K, Erikson J, et al. Commensal bacteria calibrate the activation threshold of innate antiviral immunity. Immunity. 2012;37:158–170. doi:10.1016/j.immuni.2012.04.011.
37. Bradley KC, Finsterbusch K, Schnepf D, Crotta S, Llorian M, Davidson S, Fuchs SY, Staeheli P, Wack A. Microbiota-driven tonic interferon signals in lung stromal cells protect from influenza virus infection. Cell Rep. 2019;28:245–256.e4. doi:10.1016/j.celrep.2019.05.105.
38. Panigrahi P, Parida S, Nanda NC, Satpathy R, Pradhan L, Chandel D, Baccaglini L, Mohapatra A, Mohapatra SS, Misra PR, et al. A randomized synbiotic trial to prevent sepsis among infants in rural India. Nature. 2017;548:407–412. doi:10.1038/nature23480.
39. Martínez-Romero E, Aguirre-Noyola JL, Bustamante-Brito R, González-Román P, Hernández-Oaxaca D, Higareda-Alvear V, Montes-Carreto LM, Martínez-Romero JC, Rosenblueth M, Servín-Garcidueñas LE. We and herbivores eat endophytes. Microb Biotechnol. 2020;1–18.
40. Yeoh YK, Zuo T, Lui GC-Y-Y, Zhang F, Liu Q, Ayly L, Chung ACCK, Cheung CP, Tso EYYK, Fung KSCS, et al. Gut microbiota composition reflects disease severity and dysfunctional immune responses in patients with COVID-19. Gut. 2021;70:698–706. doi:10.1136/gutjnl-2020-323020.
41. Falony G, Vieira-Silva S, Raes J. Richness and ecosystem development across faecal snapshots of the gut microbiota. Nat. Microbiol. 2018;3:526–528. doi:10.1038/s41564-018-0143-5.
42. Roager HM, Hansen LBS, Bahl MI, Frandsen HL, Carvalho V, Gøbel RJ, Dalgaard MD, Plichta DR, Sparholt MH, Vestergaard H, et al. Colonic transit time is related to bacterial metabolism and mucosal turnover in the gut. Nat Microbiol . 2016;1:16093.
43. Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK. Gut biogeography of the bacterial microbiota. Nat. Rev. Microbiol. 2015;14:20–32. doi:10.1038/nrmicro3552.
44. Kastl AJ, Terry NA, Wu GD, Albenberg LG. The structure and function of the human small intestinal microbiota. Curr Understanding Future Directions. 2020;9:33–45.
45. Wieërs G, Belkhir L, Enaud R, Leclercq S, de Foy J-MP, Dequenne I, de Timary P, Cani PD, Feld JJ, Kandel C, et al. How probiotics affect the microbiota. Front Cell Infect Microbiol. 2019;9:454. doi:10.3389/fcimb.2019.00454.
46. Mörbe UM, Jørgensen PB, Fenton TM, Von Burg N, Riis LB, Spencer J, Agace WW. Human gut-associated lymphoid tissues (GALT); diversity, structure, and function. Mucosal Immunol. 2021;14:793–802. doi:10.1038/s41385-021-00389-4.
47. Gutierrez-Merino J, Isla B, Combes T, Martinez-Estrada F, De Motes CM. Beneficial bacteria activate type-I interferon production via the intracellular cytosolic sensors STING and MAVS. Gut Microbes. 2020;11:771–788. doi:10.1080/19490976.2019.1707015.
48. Weiss G, Rasmussen S, Zeuthen L, Nielsen B, Jarmer H, Jespersen L, Frøkiaer H. Lactobacillus acidophilus induces virus immune defence genes in murine dendritic cells by a Toll-like receptor-2-dependent mechanism. Immunology. 2010;131:268–281. doi:10.1111/j.1365-2567.2010.03301.x.
49. Lozupone C, Stombaugh J, Gordon J, Jansson J, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. Nature. 2012;489:220–230. doi:10.1038/nature11550.
50. Ma C, Zhang C, Chen D, Jiang S, Shen S, Huo D, Huang S, Zhai Q, Zhang J. Probiotic consumption influences universal adaptive mutations in indigenous human and mouse gut microbiota. Commun Biol. 2021;4:1–12. 2021 41. doi:10.1038/s42003-021-02724-8.
51. Colosimo DA, Kohn JA, Luo PM, Piscotta FJ, Han SM, Pickard AJ, Rao A, Cross JR, Cohen LJ, Brady SF. Mapping interactions of microbial metabolites with Human G-protein-coupled receptors. Cell Host Microbe. 2019;26:273–282.e7. doi:10.1016/j.chom.2019.07.002.
52. Belkaid Y, Harrison OJ. Homeostatic immunity and the microbiota. Immunity. 2017;46:562–576. doi:10.1016/j.immuni.2017.04.008.
53. Lynn DJ, Benson SC, Lynn MA, Pulendran B. Modulation of immune responses to vaccination by the microbiota: implications and potential mechanisms. Nat Rev Immunol. 2021;21:1–14. doi:10.1038/s41577-020-00486-8.
54. Smilowitz NR, Kunichoff D, Garshick M, Shah B, Pillinger M, Hochman JS, Berger JS. C-reactive protein and clinical outcomes in patients with COVID-19. Eur Heart J. 2021;42:2270–2279. doi:10.1093/eurheartj/ehaa1103.
55. Nugroho J, Wardhana A, Maghfirah I, Mulia EPB, Rachmi DA, A'yun MQ, Septianda I. Relationship of D-dimer with severity and mortality in SARS-CoV-2 patients: a meta-analysis. Int J Lab Hematol. 2021;43:110–115. doi:10.1111/ijlh.13336.
56. Koutsoumanis K, Allende A, Alvarez-Ordóñez A, Bolton D, Bover-Cid S, Chemaly M, Davies R, De Cesare A, Hilbert F, Lindqvist R, et al. Update of the list

MARÍA CASANI FERNÁNDEZ DE NAVARRETE
Traductor/a Intérprete Jurado/a de INGLÉS
Nº 3892
17/1/2022

of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 12: suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2020. EFSA J. 2020;18:e06174. doi:10.2903/j.efsa.2020.6174.

57. Suez J, Zmora N, Segal E, Elinav E. The pros, cons, and many unknowns of probiotics. Nat. Med. 2019;25:716–729. doi:10.1038/s41591-019-0439-x.
58. Yelin I, Flett KB, Merakou C, Mehrotra P, Stam J, Snesrud E, Hinkle M, Lesho E, McGann P, McAdam AJ, et al. Genomic and epidemiological evidence of bacterial transmission from probiotic capsule to blood in ICU patients. Nat Med. 2019;25:1728–1732. doi:10.1038/s41591-019-0626-9.
59. Didari T, Solki S, Mozaffari S, Nikfar S, Abdollahi M. A systematic review of the safety of probiotics. Expert Opin. Drug Saf. 2014;13:227–239. doi:10.1517/14740338.2014.872627.
60. Gold JAW, Rossen LM, Ahmad FB, Sutton P, Li Z, Salvatore PP, Coyle JP, DeCuir J, Baack BN, Durant TM, et al. Race, ethnicity, and age trends in persons who died from COVID-19 — United States, May–August 2020. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2020;69:1517–1521. doi:10.15585/mmwr.mm6942e1.
61. Falony G, Joossens M, Vieira-Silva S, Wang J, Darzi Y, Faust K, Kurilshikov A, Bonder MJ, Valles-Colomer M, Vandeputte D, et al. Population-level analysis of gut microbiome variation. Science (80-). 2016;352:560–564. doi:10.1126/science.aad3503.
62. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, Bleicker T, Brünink S, Schneider J, Schmidt ML, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Eurosurveillance. 2020;25:2000045. doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.
63. Svedlund J, Sjödin I, Dotevall G. GSRS-A clinical rating scale for gastrointestinal symptoms in patients with irritable bowel syndrome and peptic ulcer disease. Dig Dis Sci. 1988;33:129–134. doi:10.1007/BF01535722.
64. Schloss PD. Reintroducing mothur: 10 years later. Appl Environ Microbiol. 2020;86:e02343-19.
65. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. Nucleic Acids Res. 2013;41:D590-6.

MARÍA CASANI FERNÁNDEZ DE N...
Traductor/a Intérprete Jurado/a de INGLÉS
Nº 3692

17/11/2022