



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

**IL MICROBIOTA NASALE NELLE BRONCHIOLITI DA
VIRUS RESPIRATORIO SINCIZIALE**

Facoltà di Medicina e Odontoiatria

Dottorato in Tecnologie Biomediche in Medicina Clinica

XXXII ciclo

Dottoranda: Antonella Frassanito

Relatore: Prof. Fabio Midulla

Matricola: 937091

A mia figlia Elisa

INDICE

ABSTRACT	3
INTRODUZIONE.....	6
OBIETTIVI DELLO STUDIO.....	16
MATERIALI E METODI.....	17
• Pazienti	
• Ricerca dei virus	
• Studio del microbiota	
• Analisi statistica dei dati	
RISULTATI.....	22
• Caratteristiche demografiche e cliniche dei bambini con bronchiolite.	
• Confronto delle caratteristiche demografiche e cliniche tra il gruppo con VRS e il gruppo virus negativa.	
• Confronto delle caratteristiche demografiche e cliniche tra il gruppo con VRS-A e il gruppo con VRS-B.	
• Confronto della composizione del microbiota nasale tra pazienti con bronchiolite da VRS e pazienti con bronchiolite virus negativa.	
• Confronto del microbiota nasale tra pazienti con VRS-A e pazienti con VRS-B.	
DISCUSSIONE.....	26
CONCLUSIONI.....	31
TABELLE E FIGURE.....	32
BIBLIOGRAFIA.....	44

ABSTRACT

Introduzione: La bronchiolite è l'infezione virale più comune nei bambini al di sotto del primo anno di vita. La presenza del virus nell'ecosistema nasale potrebbe avere un impatto sul microbiota nasale, così come il microbiota potrebbe interagire con l'attività del virus. Tali reciprocità potrebbero avere delle conseguenze, andando a influenzare sia la severità della patologia, sia la risposta immunitaria dell'ospite.

Obiettivi dello studio: Caratterizzare il microbiota nasale in bambini ricoverati per bronchiolite ed evidenziare eventuali differenze tra bambini con Virus Respiratorio Sinciziale (VRS +) e bambini con bronchiolite virus negativa (virus -) e tra i bambini con VRS di gruppo A e B.

Materiali e metodi: Abbiamo arruolato 81 pazienti con età inferiore a 6 mesi ricoverati per bronchiolite virale durante tre stagioni epidemiche (ottobre 2015 - maggio 2018). La ricerca del virus con conseguente caratterizzazione del genotipo è stata fatta su aspirato nasofaringeo. La caratterizzazione del microbiota è stata fatta dal DNA totale estratto dai lavaggi nasali, che è stato utilizzato come stampo per l'amplificazione della regione V3-V4 del gene batterico codificante l'RNA 16s, tramite PCR. I prodotti di PCR sono stati sequenziati tramite Next Generation sequencing (NGS) su piattaforma Illumina Miseq. Con l'utilizzo di software dedicati abbiamo ripulito le sequenze ottenute dall'NGS ed abbiamo effettuato la valutazione dell' α e β diversità (indici di Simpson, Shannon e Observed Otus) al fine di mettere a confronto la composizione del microbiota nasale nei diversi gruppi studiati (VRS vs Virus - e VRS-A vs VRS-B).

Risultati: Il microbiota nasale è risultato differente tra i pazienti bronchiolite da VRS e pazienti virus negativi in maniera statisticamente significativa. Nel gruppo VRS, è presente una minore alfa diversità con specie discriminante lo *Streptococcus Pneumoniae* per il gruppo VRS e il *Kineothrix Alysoides* per il gruppo virus negativo. Differenze significative nella composizione del microbiota nasale sono state evidenziate, per la prima volta, anche tra il gruppo VRS-A e il gruppo VRS-B. Le specie discriminanti sono il *Clostridium Indolis* per il gruppo VRS-A e l'*Haemophilus Haemolyticus* per il gruppo VRS-B.

Conclusioni: I nostri risultati dimostrano che il microbiota nasale distingue i pazienti VRS, rispetto ai pazienti virus negativi. Inoltre evidenzia, per la prima volta, che anche il sottotipo del VRS sembra interferire significativamente con il microbiota nasale. Tali differenze potrebbero giocare un ruolo cruciale nella suscettibilità allo sviluppo di bronchiolite e/o nel differente decorso clinico.

Studi futuri, su una popolazione più vasta, potrebbero modificare la teoria virus centrica della bronchiolite verso una più attuale teoria dell'interazione virus – microbiota - sistema immunitario.

CONTEGGIO PAROLE: 12311

PAROLE CHIAVE:

Bronchiolite, Microbiota, Virus Respiratorio Sinciziale, Biodiversità, Specie Discriminanti

ABBREVIAZIONI:

VRS: Virus Respiratorio Sinciziale

RV: Rhinovirus

OTU: Operational Taxonomic Unit

VIP: Variable Importance in Projection

LEFSE: Linear Discriminant Analysis Effect Size

PLS-DA: Partial Least Square Discriminant Analysis

TIP: Terapia Intensiva Pediatrica

INTRODUZIONE

La bronchiolite è una patologia del tratto respiratorio inferiore che coinvolge i bronchioli terminali del polmone ed è la principale causa di ospedalizzazione nei bambini al di sotto del primo anno di vita (1). Si calcola infatti che circa 1 bambino su 3 sviluppa la bronchiolite entro il primo anno di età, con il 2-3% dei bambini affetti che va incontro a ospedalizzazione. E' una patologia ad andamento stagionale ed è prevalentemente diagnosticata nel nostro emisfero nei mesi invernali, in particolare tra ottobre e maggio, con un picco nei tre mesi centrali, quando i virus responsabili circolano maggiormente.

Sebbene le moderne tecniche molecolari hanno permesso di identificare diversi virus associati alla patologia, il Virus Respiratorio Sinciziale (VRS) resta il più frequentemente isolato dalle secrezioni nasali dei pazienti affetti, con una prevalenza che va dal 41% all'83%. Sin dalla sua scoperta nel 1955, il VRS è stato notato essere tra le maggiori cause di infezioni respiratorie dell'infanzia correlate ad alto tasso di ospedalizzazione e mortalità nel primo anno di vita. Nei climi temperati come quello italiano, esso presenta un picco annuale tra l'autunno inoltrato e l'inizio della primavera con durata di 3-4 mesi, caratteristica epidemiologica che risulta essere complementare alla stagionalità della bronchiolite (2).

Il VRS è un virus a RNA a singolo filamento negativo dotato di capsidi appartenente al genere Orthopneumovirus e alla famiglia *Pneumoviridae*. Possiede un rivestimento lipidico e un nucleocapside a simmetria elicoidale. Il genoma di questo virus presenta 10 geni codificanti per 11 proteine:

- tre proteine strutturali di membrana (G – F - SH) con funzione di fusione e di attacco alle cellule epiteliali;
- tre proteine associate al genoma che formano il nucleocapside e sono necessarie per la trascrizione e replicazione delle proteine virali;
- due proteine bloccanti l'azione antivirale dell'organismo (NS1-NS2);
- due proteine per la replicazione e la trascrizione dell'RNA (NS2-NS22);
- una proteina di matrice (M).

E' la variabilità antigenica della glicoproteina G che permette di distinguere il VRS in due sottotipi, A e B. L'analisi della sequenza nucleotidica della proteina G ha portato all'identificazione di 11 genotipi di VRS-A (GA1-GA7, NA1, NA2, SAA1 e ON1) e 23 genotipi di VRS-B (GB1-GB4, SAB1-SAB4, URU1, URU2, BA1-BA12 e THB) (3-6).

Il genoma del VRS è più variabile di quanto si pensasse in passato. VRS-A e VRS-B co-circolano durante successive stagioni epidemiche. Entrambi i sottotipi di solito circolano durante le

stagioni epidemiche seguendo un pattern di prevalenza irregolare ed alternato, il sottotipo A con una prevalenza cumulativa più elevata rispetto al sottotipo B (7).

Lo scambio periodico dei genotipi VRS può riflettere un'immunità genotipo-specifica. Possono manifestarsi nuovi genotipi con elevata diversità genomica e possono sostituire i genotipi VRS dominanti per diversi anni. Questo è quanto accaduto per il genotipo VRS-B identificato per la prima volta nel 1999 a Buenos Aires (per questo denominato BA) caratterizzato da una duplicazione di 60 nucleotidi (nt) all'estremità 3' del gene G e che gradualmente ha sostituito i genotipi di VRS-B più vecchi (8). In anni più recenti, un genotipo VRS-A derivato da NA1, ha acquisito una duplicazione di 72 nt nella regione del gene G corrispondente a quella del genotipo BA. Questo nuovo genotipo denominato ON1 è stato identificato per la prima volta in Ontario e poi si è rapidamente diffuso in tutto il mondo. Difatti fino al 2011-2012 predominava il genotipo NA1 di VRS-A, sostituito nel 2012 dal nuovo genotipo ON1 (9-11). La rapida diffusione di questo nuovo genotipo è probabilmente stata resa possibile dalla diversità genetica della sua proteina G. Gli studi effettuati da Pierangeli et al. nella stagione epidemica 2012/2013, dove in Italia si è registrato il 90% di casi di ON1, hanno tuttavia messo in luce la presenza di alcune differenze rispetto al prototipo iniziale depositato alla GenBank (12, 13). Dunque ON1 ha già cominciato la sua diversificazione in più sottotipi e alcuni studi hanno proposto l'ipotesi che ciò sia derivato da tre eventi di duplicazione indipendenti (14, 10). L'abilità a rimpiazzare gli altri genotipi di VRS-A e l'aver anticipato il picco stagionale nel 2012-2013 potrebbero essere conseguenze della sua spiccata diversità antigenica, così anche l'aver constatato che i neonati infettati da questo nuovo genotipo sono stati protetti in maniera minore dagli anticorpi materni, diretti principalmente verso i precedenti genotipi di VRS-A circolante. Questa ipotesi spiegherebbe anche il riscontro relativo all'età, infatti i pazienti ospedalizzati per infezione da ON1 erano risultati inizialmente più piccoli d'età rispetto ai bambini infettati dai precedenti genotipi di VRS-A, in Italia e Germania (13). E' già noto che l'età precoce ed in particolare la prematurità rientrano nei fattori che predispongono alla bronchiolite severa. Infatti nei bambini nati pretermine, la risposta immunitaria immatura e la mancanza di anticorpi anti-VRS materni predispongono ad un rischio maggiore di contrarre l'infezione e minor probabilità di eradicarla una volta infettati (15).

I casi di bronchiolite registrati durante la stagione epidemica 2012/2013 hanno avuto un decorso meno severo rispetto alla stagione precedente, ciononostante il numero di pazienti che hanno richiesto cure in terapia intensiva per infezione da ON1 è stato simile se non maggiore (10).

Sebbene la correlazione tra genotipo RSV ed espressione clinica sia ancora dibattuta, recentemente il nostro gruppo ha dimostrato che il VRS-A NA1 è associato ad un decorso clinico più grave della malattia (16).

Tra gli altri virus isolati, coinvolti anch'essi nell'eziologia della bronchiolite, figurano il Rhinovirus, il Metapneumovirus, i Coronavirus, il Bocavirus umano, i virus influenzali, gli Adenovirus e i virus Parainfluenzali (1). Nonostante ciò, in molti bambini con bronchiolite acuta, non è possibile identificare un agente causale, questo potrebbe essere dovuto al fatto che potrebbero essere presenti altri virus non facenti parte del pannello di ricerca, oppure il virus potrebbe essere stato precocemente eliminato grazie ad una migliore risposta da parte del bambino, o per errori tecnici durante raccolta e l'analisi del campione.

Dal punto di vista fisiopatologico, la bronchiolite è caratterizzata da un'estesa infiammazione con edema della mucosa del bronchiolo (struttura peculiare poiché non dotata di muscolatura liscia e di cartilagine di sostegno) in associazione ad un aumento della secrezione mucosa. In particolare, il VRS penetra all'interno delle cellule epiteliali della mucosa dei bronchioli, si replica e determina una necrosi e una distruzione dell'epitelio ciliare. Ciò determina l'attivazione della risposta immunitaria con infiltrazione di polimorfonucleati e linfociti. I detriti cellulari e il muco si accumulano nel lume del bronchiolo, favorendo fenomeni di ostruzione, air trapping e, talora, differenti gradi di atelettasie polmonari (17).

La presentazione clinica è caratterizzata da iniziali sintomi a carico del tratto respiratorio superiore come rinorrea, febbre e tosse stizzosa, seguiti dall'interessamento del tratto respiratorio inferiore. Segni a carico di quest'ultimo sono: tachipnea, aumentato lavoro respiratorio (rientramenti intercostali e sovraclaveari, utilizzo dei muscoli addominali, alitamento delle pinne nasali) e ipossiemia. Il reperto auscultatorio classico è rappresentato dai rantoli crepitanti diffusi accompagnati a volte da sibili; la febbre può essere presente in fase precoce, di solito prima della comparsa del distress respiratorio. Tra le complicanze, l'apnea centrale è la più frequente nei bambini più piccoli, ma sono state riportati anche disordini elettrolitici, l'acidosi metabolica e la disidratazione.

I bambini hanno una diversa suscettibilità nello sviluppo di patologie respiratorie dipendente da fattori di rischio ben caratterizzati quali la scolarizzazione, la durata dell'allattamento, l'esposizione al fumo di sigaretta, le condizioni socio-economiche, il sesso maschile (i maschi hanno in genere vie aeree di minori dimensioni rispetto alle femmine), il parto cesareo, la prematurità, una storia familiare positiva per asma e/o atopia e la presenza di comorbidità (fibrosi cistica, patologie polmonari croniche, cardiopatie congenite, deficit dell'immunità cellulare, Sindrome di Down). Questi fattori, però, sembrerebbero spiegare solo in piccola parte, la grande variabilità interindividuale (18).

A tal proposito, è piuttosto recente la dimostrazione che le vie aeree non sono sterili e che le comunità microbiche che colonizzano le superfici epiteliali delle vie respiratorie superiori sono

elementi chiave nel mantenimento di un microambiente locale sano, grazie ad un'azione diretta contro i patogeni e ad una modulazione della risposta immunitaria (19). Alcuni microrganismi considerati patogeni come lo *Streptococcus Pneumoniae* o l'*Haemophilus Influenzae* (patobionti) sono frequentemente osservati come commensali del tratto respiratorio superiore in condizioni ideali di equilibrio e biodiversità e formano, insieme ad altri batteri non patogeni (simbionti), un intricato network ecologico che prende il nome di microbiota. Le comunità batteriche non sono esclusive del sistema respiratorio superiore, ma anzi colonizzano gran parte delle superfici corporee come la cute, la vagina, la cavità orale, il polmone e anche l'intestino, il più studiato in questo ambito. Il loro ruolo coinvolge il metabolismo, la maturazione del sistema immunitario, la funzione di barriera mucosale e la resistenza alla colonizzazione da parte di patogeni. Meno del 10% delle nostre cellule è di origine umana e i simbionti con cui ci evolviamo sono componenti essenziali della nostra fisiologia. Si è passati dalla teoria postulata dal dottor Robert Koch “un patogeno/una malattia” alla teoria che il benessere di un corpo è il risultato di una rete complessa di interazione tra i microrganismi e il loro ospite (20). Se questo equilibrio è perturbato si instaura una condizione di disbiosi, un vero e proprio collasso di un ecosistema, che potrebbe spiegare l'aumentata suscettibilità alle infezioni e, come detto in precedenza, andrebbe ad aggiungersi alle altre cause di variabilità interindividuale. I fattori che possono contribuire alla disbiosi sono gli antibiotici, determinanti una possibile e significativa distruzione microbica (l'uso di antibiotici nel periodo perinatale compromette la colonizzazione da parte di Bifidobatteri e Lactobacilli con l'instaurarsi di una maggiore predisposizione alle allergie), i disordini immunitari (il sistema immunitario è un'interfaccia tra le popolazioni batteriche, il microbiota e l'ospite, la dieta e le differenti esposizioni ambientali). Riguardo quest'ultimo punto, gli studi sembrano concordi nel ritenere che, se durante i primi periodi dello sviluppo del bambino viene meno il contatto con i microbi usuali, egli sarà incline a sviluppare patologie allergiche e autoimmuni poiché, secondo la teoria dell'igiene, la diminuzione dell'esposizione ambientale, determina uno shift da una risposta immunitaria linfocitica Th1 ad una Th2 e favorisce meccanismi di disbiosi (21). Infatti, un'esposizione in età molto precoce a patogeni ambientali d'origine rurale stimola positivamente il sistema immunitario ad un'azione adeguata e mirata verso le infezioni con diminuita incidenza di patologia asmatica nel bambino. Si veda a riguardo il noto studio che mette a confronto la prevalenza di asma nella popolazione Amish e Hutterita (pur avendo medesima genetica, varia l'esposizione precoce a patogeni ambientali rurali) (22).

Definire la biogeografia e la composizione delle popolazioni batteriche è fondamentale per capire le relazioni microbi-ospite in condizioni di salute e di malattia. Tuttavia, gli studi sul microbiota respiratorio sono resi complessi dal fatto che i campioni prelevati offrono una scarsa

biomassa. A questo proposito si è andato progressivamente sostituendo l'uso delle tecniche tradizionali, basate sulle colture, con metodiche coltura-indipendenti, cioè metodi molecolari basati sul sequenziamento del DNA o sui microarrays. Queste tecniche, complessivamente definite come “metagenomiche”, sono basate in particolare sull'identificazione dei polimorfismi del gene batterico che codifica per il 16S rRNA. Sulla base del grado di omologia del gene sequenziato, tramite analisi bioinformatiche, si può assegnare ogni unità tassonomica (operational taxonomic unit, OTU) ad uno specifico taxon (phylum, classe, ordine, famiglia, genere, specie). In questo modo si evidenzia un importante vantaggio nello studio del microbiota umano, in quanto è possibile identificare contemporaneamente un gran numero di taxa, in modo tale da cogliere la complessità e la diversità del microbiota. E' possibile inoltre identificare anche specie batteriche normalmente non coltivabili, scoprire taxa batterici precedentemente sconosciuti e stimare l'abbondanza relativa di ognuno. In tal modo non è necessario conoscere a priori i microrganismi né tantomeno è richiesta la capacità di sottoporre gli stessi ad esami colturali. Grazie a queste moderne tecnologie, oggi sappiamo che l'albero respiratorio presenta un microbiota omogeneo che decresce in biomassa dalle alte vie alle basse vie respiratorie. Dunque, il microbiota polmonare del paziente sano non contiene una flora a sé stante, ma contiene bassi livelli di specie batteriche in gran parte indistinguibili da quelle delle alte vie respiratorie (23). Le tecniche broncoscopiche hanno dimostrato come, per l'appunto, la maggior parte delle specie batteriche presenti nelle vie aeree più basse riflette la “cross-contaminazione” da parte delle vie aeree più alte (24, 25). Il tratto respiratorio superiore è un sistema unificato di cute e mucosa che è in diretto contatto con il mondo esterno. Le narici consentono l'accesso alle cavità nasali, queste fungono da siti collettori delle secrezioni dei seni frontali, mascellari, etmoidali e sfenoidali e sono in continuità con il rinofaringe situato più posteriormente. Quest'ultimo è infine separato dall'orofaringe dal palato molle. Sia la cavità orale sia l'orofaringe sono parte del tratto respiratorio e del tratto gastrointestinale (26). In questa trattazione si farà riferimento in particolar modo al tratto che va dalle narici al rinofaringe. L'ecosistema microbico delle narici anteriori è vario e tipicamente dominato dal phyla degli Actinobacteria (*Corynebacterium* e *Propionibacterium*) e dei Firmicutes (*Streptococcus* nei bambini e *Staphylococcus* negli adulti) (27). A livello del rinofaringe prevalgono i profili dominati dai genera *Moraxella*, *Corynebacterium*, *Dolosigranulum*, *Streptococcus* o *Staphylococcus*. I Gram-negativi anaerobi, presenti soprattutto nell'orofaringe e nella cavità orale, come *Prevotella* e *Veillonella* sono spesso osservati in bassa concentrazione nel nasofaringe dei bambini piccoli e questo può essere spiegato dal rigurgito orale e nasale presente nei primi mesi di vita (28). In questo microambiente ben equilibrato sono presenti anche patobionti (*S.pneumoniae*, *M.Catarrhalis*, *H.Influenzae*, *S.Aureus* e streptococchi emolitici) che, in condizioni di disequilibrio, possono

crescere in maniera incontrollata instaurando un quadro di infezione, ma che sono senza dubbio considerati parte della flora residente in condizioni ideali. La colonizzazione da parte di questi batteri può avere un ruolo ambiguo nello sviluppo di patologie respiratorie: da un lato la colonizzazione da parte del patogeno è prerequisito per lo sviluppo della malattia, dall'altro la colonizzazione da parte del patobionto non necessariamente porta all'infezione ma anzi dovrebbe contrastare la crescita degli altri patogeni.

La biodiversità della flora batterica è associata ad alta resistenza contro le infezioni da parte di virus, così come il trattamento antibiotico può essere associato all'invasione di nuovi patogeni e perdita dell'equilibrio. Comunità microbiche variegata agiscono contro le infezioni tramite vari meccanismi tra cui, per esempio, l'utilizzo competitivo delle risorse dell'ospite in modo da sottrarle al potenziale patogeno. Lo strato di muco che ricopre la superficie delle cellule epiteliali del rinofaringe forma una barriera fisica che separa la flora batterica residente nel lume, dalle stesse cellule. Lo scopo di questa barriera è limitare i contatti tra il microbiota e il tessuto dell'ospite per prevenire un'inflammatione locale che, se pur di basso grado, può causare una rottura dell'equilibrio e la crescita di patobionti (29).

Anche nel discorso inerente il microbiota nasale, sembra ci siano dei risvolti positivi per i bambini allattati al seno e nati da parto naturale. I bambini allattati al seno presentano dei profili ricchi di *Dolosigranulum* e *Corynebacterium* (il cosiddetto microbiota protettivo) rispetto a bambini allattati artificialmente dove, a sei settimane di vita, prevalgono i profili dominati dagli *Stafilococchi* (30). Allo stesso modo, in uno studio longitudinale su bambini dell'Europa Occidentale dalla nascita ai sei mesi di vita, si è visto che, già 24 ore dopo la nascita, c'è un'abbondanza nel rinofaringe di *Streptococchi*, che si arricchisce e si differenzia con altre specie batteriche attraverso un processo che inizia dopo una settimana circa. Tale processo è ritardato o assente nei bambini nati da parto cesareo che hanno riduzione della colonizzazione da parte di *Corynebacterium* e *Dolosigranulum* e un'incidenza più elevata di polmoniti e bronchioliti (31).

Tra gli studi più significativi riguardo l'argomento, in letteratura troviamo: lo studio condotto da Biesbroek et al. nel quale sono stati arruolati 60 bambini, di cui è stato studiato il microbiota nasale a 6 settimane, 6 mesi, 12 mesi e 24 mesi con lo scopo di identificarne i profili, seguirne eventuali cambiamenti nel tempo e valutarli in associazione alla storia clinica. Dallo studio emerge che, a sei settimane di vita, nell'aspirato nasofaringeo si individuano clusters diversi, dominati rispettivamente dal genere *Streptococcus*, *Moraxella*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium* e *Corynebacterium* e/o *Dolosigranulum*. Dopo le sei settimane di vita il profilo dominato dallo *Staphylococcus* scompare per lasciare il posto ad un cluster dominato dall'*Haemophilus*. Questo dato può riflettere la maturazione del sistema immunitario a partire dai sei mesi, ma anche la

colonizzazione di altri batteri che entrano in competizione con lo *Staphylococcus*. Infatti, in generale in letteratura, che si parli di microbiota o di infezioni, sia lo *Streptococcus Pneumoniae* sia l'*Haemophilus Influenzae* non si trovano mai in associazione allo *Staphylococcus Aureus*. L'alta concentrazione di *Staphylococcus* e *Corynebacterium* nel nasofaringe dei bambini a sei settimane è supportata dalle teorie ambientali: entrambi i batteri sono commensali della cute dell'adulto. Dai sei mesi di vita in poi prevalgono i profili dominati da *Moraxella*, questo può essere conseguenza di un aumento del contatto con gli altri bambini (asilo nido). Dallo studio emerge che un microbiota stabile nei primi due anni è caratterizzato da una precoce colonizzazione da parte di *Moraxella* e *Dolosigranulum/Corynebacterium*, mentre un'instabilità è favorita dai profili dominati da *Haemophilus* e *Streptococcus*. I microbiota con profilo stabile sono associati ad una storia di allattamento materno e poche infezioni respiratorie. La stabilità della flora nel tempo è considerata un indice della biodiversità delle comunità batteriche che, come detto in precedenza, è un fattore protettivo. Dai dati emerge che il profilo dominato da *Corynebacterium/Dolosigranulum* a sei settimane, precede lo sviluppo del profilo dominato da *Moraxella* a partire dai sei mesi. Il profilo dominato dai *Dolosigranulum/Corynebacterium* è protettivo per il sistema respiratorio da un punto di vista infettivo (diminuzione del rischio di otite nei bambini con più di sei mesi di vita). In contrasto, i profili dominati da *Haemophilus* e *Streptococcus* sono associati ad un alto tasso di cambiamenti nel microbiota e una maggiore predisposizione allo sviluppo di bronchioliti e polmoniti (32). La mancata stabilità di questo cluster spiegherebbe la correlazione tra la presenza dei virus respiratori e l'*Haemophilus Influenzae/Streptococcus Pneumoniae* (33). Ciò suggerisce che sia i virus che i batteri possono potenziare in maniera reciproca la loro singola patogenicità, soprattutto in condizioni di prevalenza di una specie e di disbiosi.

Lo studio di Vissing (COPSAC2000) ha arruolato una coorte di 411 bambini nati da madri con asma e, a partire da un aspirato nasofaringeo fatto a 4 settimane, sono stati seguiti per tre anni raccogliendo le informazioni cliniche. Lo studio ottiene risultati che concordano in parte con Biesbrock. I neonati colonizzati da *Streptococcus Pneumoniae*, *Haemophilus Influenzae* e *Moraxella Catarrhalis* hanno un più alto rischio di sviluppare polmonite e bronchiolite nei tre anni di follow-up (34).

Dallo studio longitudinale di coorte di Teo et al. emerge che molti bambini sono inizialmente e transitoriamente, colonizzati nel tratto delle vie aeree da *Staphylococcus* o *Corynebacterium*, prima di una più stabile colonizzazione con *Alloiococcus* o *Moraxella* e una più tardiva e progressiva acquisizione di *Streptococcus* ed *Haemophilus* correlata ad un picco di incidenza di infezioni delle vie aeree. I dati mostrano anche che la presenza di *Moraxella* contribuisce all'aumento della severità delle infezioni da VRS nei bambini. Tra i batteri commensali

compare in più, rispetto agli studi precedenti, l'*Alloiococcus*, un batterio Gram positivo che nei dati di questo studio non è associato a infezioni delle vie aeree e otiti, nonostante si trovi spesso nei canali uditivi dei bambini con otite media (35).

Lo studio di Rosas Salazar dimostra che l'abbondanza di *Lactobacillus* nel nasofaringe durante un'infezione delle vie aeree da VRS, è associata ad una diminuzione del rischio di sviluppare wheezing a 2 anni. D'altro canto è anche emerso che l'abbondanza di *Streptococcus* è un forte predittore di wheezing ricorrente a 5 anni (36). Bisgaard et al. in uno studio su 321 neonati sani, ha trovato una correlazione tra wheezing ricorrente e asma nei bambini con una colonizzazione nasofaringea di *Streptococcus*, *Haemophilus* e *Moraxella* (37). Inoltre, Hilty et al. confermano che il phylum dei Proteobacteria è significativamente più comune nei bambini con asma rispetto ai controlli (38).

Hasegawa et al. hanno studiato il microbiota delle vie aeree in relazione alla severità della malattia nei bambini ospedalizzati per bronchiolite, una popolazione vulnerabile e con alta morbilità. Il principale "outcome" utilizzato è stato il ricorso a cure di terapia intensiva e /o l'uso di ventilazione meccanica in qualunque momento durante l'ospedalizzazione. Il secondo "outcome" utilizzato è stato la lunghezza del ricovero maggiore di tre giorni, utilizzando come standard della lunghezza del ricovero due giorni, come fornito da precedenti studi. Si tratta di uno studio multicentrico di 1005 bambini con meno di 12 mesi, affetti da bronchiolite grave in cui sono stati identificati quattro distinti profili di microbiota nasale. I bambini con una prevalenza di *Haemophilus* presentavano un tasso più alto di ricorso a cure di terapia intensiva e più prolungati ricoveri rispetto al profilo con dominanza di *Moraxella*. E' possibile che un microbiota *Haemophilus* dominante possa alterare la risposta immunitaria nei bambini, incrementando la gravità della bronchiolite. Infatti, la colonizzazione da parte di *Haemophilus Influenzae* nelle vie aeree di neonati asintomatici, è associata ad un'aumentata risposta infiammatoria della mucosa respiratoria con prevalenza di Th2 e Th17. Dai dati emerge, inoltre, una minore abbondanza del microbiota protettivo (*Dolosigranulum*, *Corynebacterium*) nei bambini ricoverati per bronchiolite grave rispetto ai controlli sani di precedenti studi (39).

La mucosa delle vie aeree è costantemente esposta ad un complesso ambiente costituito da microorganismi, allergeni e inquinanti. Questi possono essere definiti con il termine "esposoma". A seconda della sua composizione, possono essere attivate vari tipi di risposta immunitaria con il conseguente rilascio di citochine e chemochine a livello mucosale (40). L'abilità di mantenere una risposta immunitaria bilanciata è fondamentale per la gestione della salute delle vie aeree, laddove un rilascio incontrollato di mediatori chimici, può determinare l'instaurarsi di una risposta infiammatoria dannosa (41). I batteri che colonizzano le vie aeree dei neonati non sono

microrganismi inerti, ma partecipano attivamente alla stimolazione e alla maturazione immunitaria. *M. Catarrhalis* e *H. Influenzae* determinano un aumento della produzione di tutti i mediatori, senza attivazione specifica dei linfociti T, ma al contrario una risposta mista, Th1, Th2, Th17 con alti livelli di IL-1 e TNF alfa. La presenza di entrambe le risposte immunitarie (Th2 e Th17), stimola il reclutamento di eosinofili e neutrofili. Tale fattore può compromettere la risposta Th1 che è necessaria ad eradicare i virus o gli stessi batteri intracellulari e portare ad uno stato di infiammazione cronica (42). Lo *S. Aureus* stimola una forte risposta immunitaria con prevalenza di neutrofili, dominata dal rilascio di IL-17, IL-1beta, IL-8 senza una eccessiva espansione di Th1 e Th2; infatti, sembra non ci sia alcuna associazione tra la colonizzazione da parte dello *Stafilococco* nel primo mese e il rischio di sviluppare asma durante l'infanzia o altre sequele a lungo termine (38). Al contrario, la *Moraxella* e l'*Haemophilus*, quando colonizzano le vie aeree dei neonati, possono rappresentare fattori di rischio per lo sviluppo di asma a lungo termine (43).

Anche lo studio di Wouter del 2016 si è posto l'obiettivo, oltre che di valutare il tipo di microbiota nei piccoli pazienti affetti da infezione da VRS gravi, scelti in base al bisogno di ospedalizzazione (in maniera concorde agli altri studi elencati il microbiota rischioso era costituito da una predominanza di *Streptococcus* ed *Haemophilus*), anche di valutare in questi casi la direzionalità della risposta immunitaria. Dallo studio è emerso che i profili di microbiota con dominanza di *Haemophilus* e *Streptococcus*, producevano una distinta risposta infiammatoria, caratterizzata dall'overespressione di geni correlati ai Toll-like receptor, alla sintesi di IL-8 e IL-17, da un maggior richiamo nelle vie aeree di neutrofili, da un maggior grado di infiammazione e, in ultima analisi, conducevano a infezioni più gravi, rispetto ai bambini con altra composizione del microbiota, come i profili dominati dalla *Stafilococcus* (44). Questo studio, inoltre, ci suggerisce una relazione potenzialmente patogena tra lo streptococco e il VRS. Il VRS potrebbe predisporre alla malattia pneumococcica, come dimostrato da evidenze epidemiologiche (45, 46) e da studi in vivo (47) ma è da sottolineare anche che, nelle osservazioni di pazienti vaccinati contro lo pneumococco, è presente una diminuzione del tasso di ospedalizzazione dovuta a infezione da VRS (48). Quindi il discorso sarebbe simile sia per le relazioni tra patogeni batterici e virus sia egualmente tra microbiota e virus (21, 49).

Quanto precedentemente detto, può spostare l'attenzione da una teoria prettamente virus-centrica nell'ambito delle bronchioliti, verso una più attuale teoria dell'interazione virus - microbiota - risposta immunitaria dell'ospite che potrebbe aprire la strada a nuove strategie terapeutiche, sia nella gestione della bronchiolite che ad oggi prevede una terapia di supporto e non una vera e propria cura, sia per prevenire le sequele a lungo termine come l'asma o le bronchiti asmatiche. Se effettivamente l'equilibrio microbiota - sistema immune fosse confermato come

protagonista nella colonizzazione virale da futuri e più approfonditi studi, non è escluso che nuovi approcci nel trattamento delle infezioni respiratorie potrebbero essere l'utilizzo di vaccinazioni o probiotici.

Abbiamo due modi per “usare” il microbiota. Il primo e il più semplice è utilizzarlo per stratificare i pazienti, costruendo dei database che colleghino il profilo di ciascun microbiota con la risposta immunitaria e la storia clinica, tutto ciò allo scopo di predire gli outcomes della malattia e delle cure. Il secondo modo in cui il microbiota può essere utilizzato è la cura delle patologie. In sintesi gli obiettivi sarebbero mappare il microbiota dei piccoli pazienti, identificare quale profilo porti ad esacerbazioni delle attuali malattie e quale le sopprima e imparare a manipolarlo a servizio della variabilità interindividuale.

La relazione tra microbiota e virus rappresenta la base da cui partire per il nostro studio in cui, al fine di caratterizzarla, ci siamo serviti del confronto tra un gruppo di bambini con bronchiolite virus negativa e un gruppo di bambini con bronchiolite VRS positiva, esaminando le particolarità a livello batteriologico. L'obiettivo è quello di confrontare il microambiente nasale privo del VRS con quello eventualmente perturbato dal virus. Allo stesso modo, siamo andati a valutare se i sottotipi del VRS fossero associati a microbiota diversi per confermare e/o smentire la teoria riguardo la loro variabilità in rapporto a determinate condizioni del paziente.

OBIETTIVI DELLO STUDIO

1. Valutare eventuali differenze nella composizione batterica del microbiota nasale in rapporto alla presenza VRS, confrontando la sua composizione tra un gruppo di pazienti con bronchiolite da VRS e un gruppo di pazienti in cui non è stato isolato nessun virus.
2. All'interno del gruppo di bambini con bronchiolite VRS positiva, valutare e confrontare la composizione del microbiota nasale tra pazienti con VRS-A e pazienti con VRS-B.

MATERIALI E METODI

Pazienti

Sono stati arruolati 91 bambini di età inferiore a 6 mesi, ricoverati presso il reparto di Osservazione Breve del Dipartimento Materno Infantile e Scienze Urologiche del Policlinico Umberto I per un episodio acuto di bronchiolite nel corso di tre stagioni epidemiche (da ottobre 2015 a maggio 2018). Non sono stati arruolati i bambini che avevano assunto terapia antibiotica o terapia con probiotici. Ugualmente sono stati esclusi i bambini prematuri, con immunodeficienze, con cardiopatie, con patologie neurologiche e/o neuromuscolari.

La bronchiolite è stata definita come il primo episodio di infezione respiratoria acuta delle basse vie respiratorie nei bambini con età inferiore a 12 mesi, basandosi sulla presenza di tosse, rinite, distress respiratorio e rantoli crepitanti diffusi all'ascoltazione del torace (1).

Ai genitori è stata richiesta la firma del consenso ed è stato somministrato loro un questionario strutturato per acquisire informazioni riguardo l'esposizione al fumo di sigaretta, la familiarità per asma, la familiarità per wheezing pre-scolare, rinocongiuntivite ed eczema. Dalle cartelle cliniche sono stati ricavati i seguenti dati: sesso, età, etnia, giorni di ospedalizzazione, frequenza cardiaca, frequenza respiratoria, saturazione di ossigeno in aria ambiente, presenza di rientramenti, trattamento con ossigeno, fluido terapia e numero dei globuli bianchi, linfociti, concentrazione della PCR nel sangue.

Ad ogni paziente è stato assegnato uno score di gravità clinica da 1 a 8 in base alla frequenza respiratoria (<45atti/min=0, 45-60 atti/min=1, >60 atti/min=2), alla saturazione di ossigeno in aria ambiente (>95%=0, 95-90%= 1, <90%=2), alla presenza di rientramenti (nessuno=0, presenti=1, presenti + alitamento delle pinne nasali=2) e in base all'alimentazione (normale=0, ridotta=1, in fluidoterapia=2) (1).

Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico del Policlinico Umberto I di Roma (RIF.CE:5271).

Ricerca del virus

La ricerca dei virus è stata eseguita tramite aspirato nasofaringeo: 1 ml di soluzione fisiologica è stato istillato in ciascuna narice del bambino tramite sondino introdotto al di sopra delle coane e dotato di siringa e successivamente aspirato. Si è poi provveduto al trasporto del campione in ghiaccio, entro 1-2 ore dalla raccolta, al Laboratorio di Virologia diretto dal Prof. Guido Antonelli (Medicina Molecolare Sapienza Università di Roma). In sede di laboratorio il campione è stato centrifugato e trattato con sostanze in grado di dissolvere il muco. Ciascun campione è stato diviso in 2 aliquote: una usata per l'estrazione dell'acido nucleico e la seconda divisa in 2 aliquote identiche e conservate a -80 °C. Sono stati impiegati 200 µl di secreto respiratorio per l'estrazione dell'acido nucleico, utilizzando un kit per isolamento totale di quest'ultimo diluito in 50 µl di soluzione tampone. L'analisi molecolare dei campioni è stata effettuata tramite la metodica Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), oppure tramite metodiche nested PCR per la ricerca di 14 virus respiratori: il Virus Respiratorio Sinciziale, il Rhinovirus umano, i Virus dell'influenza A e B, i Coronavirus umani OC43, 229E, NL-63 e HUK1, gli Adenovirus, i Virus Parainfluenzali 1-3, il Bocavirus umano e il Metapneumovirus umano (50). I campioni VRS positivi sono stati sottoposti a sequenziamento della seconda metà della regione ipervariabile del gene codificante per la proteina G per l'assegnazione del genotipo. Con la metodica real-time PCR sono stati identificati i sottotipi A e B.

Studio del microbiota nasale

Lo studio del microbiota nasale, effettuato presso il laboratorio del Dipartimento di Sanità pubblica e Malattie Infettive dell'Università Sapienza di Roma è stato eseguito tramite estrazione del DNA totale dai campioni di aspirato nasofaringeo. Il sequenziamento NGS è stato effettuato dall'Istituto Italiano di Tecnologia, con successiva analisi bioinformatica dei risultati ottenuti. Il protocollo prevede diverse fasi:

- a) estrazione DNA totale dai campioni collezionati;
- b) creazione di una libreria di Ampliconi V3-V4;
- c) sequenziamento degli ampliconi tramite NGS;
- d) analisi delle sequenze.

a) Estrazione DNA dai campioni dei lavaggi nasali

Il primo passo è stato quello di estrarre il DNA totale dai campioni raccolti. I campioni di lavaggio nasale (1 ml) sono stati centrifugati (14000 rpm, 5 minuti) e, al fine di concentrare i batteri presenti nel campione, il sedimento ottenuto è stato risospeso in 200 µl. L'estrazione del DNA totale è stata effettuata con l'utilizzo del Kit DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN Hilden, Germany)

secondo il protocollo di supporto. Al fine di avere il massimo recupero anche del genoma di batteri Gram positivi è stata apportata una modifica nella fase di lisi. Brevemente, dopo l'incubazione con la proteinasi K, un'ulteriore fase di incubazione con lisozima 20 mg/ml a 37°C per 2 ore è stata aggiunta. La concentrazione del DNA estratto è stata determinata con Bio Photometer Eppendorf a 260 nm e la sua purezza secondo il rapporto A260/A280 (21).

b) Creazione libreria di ampliconi V3-V4

La caratterizzazione delle comunità batteriche tramite sequenziamento è stata preceduta dalla creazione di una libreria di ampliconi relativi alla regione V3-V4 all'interno del gene batterico codificante per 16S rRNA. A tal fine, utilizzando il DNA estratto dai campioni come stampo, la regione V3-V4 all'interno del gene batterico 16S rRNA è stata amplificata tramite PCR, utilizzando primer universali che appaiano, a monte e a valle delle regioni V3-V4 variabile, in regioni costanti uguali in tutte le specie batteriche, a cui è stata aggiunta una sequenza barcode, che sarà in seguito riconosciuta nella piattaforma Illumina (21). I primer utilizzati sono:

- 16S Forward Primer 5'TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAAGAG;
- ACAGCCTACGGGNGGCWGCAG;
- 16S Reverse Primer 5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAAGAGA;
- CAGGACTACHVGGGTATCTAATCC.



c) Sequenziamento Next generation sequencing (NGS)

Gli ampliconi, prodotti della PCR, ottenuti, sono quindi stati sequenziati mediante next generation sequencing (NGS) su una piattaforma Illumina MiSeq (21).

d) Analisi sequenze ottenute

Le sequenze ottenute (reads) sono state ripulite da chimere ed errori, ed in seguito raggruppate in unità tassonomiche operative (OTUs). In filogenesi una "Operational Taxonomic Unit" (OTU) consiste in una definizione operativa tassonomica di una specie o di un gruppo di specie, basandosi sulla similarità di sequenza (21).

Al fine di quantificare le differenze indicative nella struttura delle comunità batteriche ed eseguire cross-correlazioni con i dati raccolti è stata utilizzata: statistica multivariata/test non-parametrici e analisi degli indici ecologici.

Analisi statistica dei dati

L'insieme dei dati ottenuti ha permesso di valutare diversi tipi di variabili. Sono infatti presenti variabili di tipo: qualitativo (dati anamnestici riguardanti il sesso e la presenza del virus), di tipo quantitativo discreto (score di gravità) e di tipo quantitativo continuo (dati anamnestici riguardanti l'età del paziente, i dati di laboratorio e gli esami ematochimici, in particolare la PCR, e le abbondanze relative dei vari livelli tassonomici del microbiota respiratorio).

In primo luogo è stata eseguita un'analisi descrittiva del campione esaminato con tabelle e grafici corrispondenti al tipo di variabili qualitative o quantitative. L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando sia test parametrici che non parametrici a seconda del tipo di variabile in questione. In particolare, per le variabili discrete sono stati usati test di statistica univariata non parametrica (test del χ^2 e test esatto di Fischer per le frequenze molto basse), mentre per quelle continue, sono stati usati test non parametrici (Mann-Whitney U test e Kruskal-Wallis). Sono stati considerati statisticamente significativi i valori di $p \leq 0,05$. I dati sono stati analizzati con SPSS versione 25.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) per quanto riguarda i parametri clinici.

L'analisi bioinformatica dei dati grezzi NGS è stata effettuata con pipelines e linguaggi di programmazione dedicati (Mothur v.1.13.9 e Python v2.7). L'assegnazione delle varie Operational Taxonomic Unit (OTUs) è stata effettuata con il software local-BLAST ed il database 16S, entrambi del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Una volta ottenute le abbondanze relative nei gruppi (VRS positivi e Virus negativi e VRS-A VRS-B) ad ogni livello tassonomico, il test di Mann-Whitney è stato utilizzato allo scopo di comparare non solo tutte le abbondanze relative, ma anche l'alfa diversità stimata utilizzando tre differenti indici: Shannon e Simpson per la biodiversità, mentre Observed OTUs per la ricchezza. L'indice di ricchezza opera un semplice conteggio delle specie presenti nel campione. Gli indici di Shannon e Simpson tengono conto anche del numero di unità presenti per ogni specie. Questo perché, se è vero che un elevato numero di specie è sinonimo di biodiversità, bisogna anche considerare che se una specie è nettamente prevalente rispetto alle altre, maggiori saranno le specie "irrilevanti" e minore sarà la diversità. Per quanto riguarda le differenze tra i due indici di diversità:

1) L'indice di Shannon è dato da $HSH = -\sum_{i=1}^S p_i \log_2 p_i$. Si tratta di una funzione crescente del numero di specie s , che può variare fra 0 e $+\infty$, dove p_i sta ad indicare la probabilità che un individuo della comunità preso a caso appartenga alla specie i ($i=1,2,\dots,S$). Da sottolineare come per un dato numero di specie S la funzione H assume il suo valore più grande quando le abbondanze relative sono tutte uguali, ovvero quando le specie sono equidistribuite.

2) L'indice di Simpson è dato invece da $HSI = 1 - \sum_{i=1}^S p_i^2$. Si tratta ugualmente di una funzione crescente di S per la quale è possibile allo stesso modo dimostrare che il massimo valore è

raggiunto in corrispondenza di $p_i = 1/s$ per ogni i . A differenza dell'indice di Shannon, che può variare fra 0 e $+\infty$, l'indice di Simpson è compreso fra 0 e 1. Inoltre, l'indice di Shannon, a causa della presenza del logaritmo, dà relativamente più peso, rispetto all'indice di Simpson, alle specie rare.

Per trovare le specie che fossero discriminanti nei gruppi studiati è stata effettuata un'analisi discriminante lineare chiamata Lefse. Il grafico Lefse (linear discriminant analysis effect size) è uno strumento di statistica multivariata che è stato applicato in questo contesto per visualizzare le abbondanze batteriche relative nei due gruppi di riferimento. Le barre colorate rappresentano la misura d'effetto per ogni particolare specie in ciascun gruppo. La lunghezza della barra colorata rappresenta quindi un LDA score trasformato in \log_{10} . Sono significativi i valori di LDA superiori a 3. E' possibile in questo modo usare valori assoluti di una misura d'effetto per ottenere un'interpretazione delle differenze fra i due gruppi. L'analisi discriminante PLS-DA è stata eseguita per operare la massima demarcazione tra i gruppi di osservazione (in questo caso tra virus negativi e virus positivi e tra VRS-A e VRS-B). All'interno dell'analisi PLS-DA, il VIP (variable importance in projection) score è stato utilizzato per valutare il peso che ciascuna variabile (in questo caso ciascuna specie) ha nella divisione dei gruppi. E' una misura della rilevanza delle variabili presenti e serve a determinare se è presente una particolare specie che influenza maggiormente la possibilità di divisione tra i gruppi. Le variabili con il VIP score maggiore o vicino a 1 possono essere considerate più importanti rispetto alle altre nell'analisi, che al contrario potrebbero essere anche escluse (al di sotto di 1).

RISULTATI

Tra i 91 pazienti, 29 (35,8%) sono risultati negativi ai virus da noi ricercati e 48 (59,3%) sono risultati positivi al VRS. 10 bambini (9%) sono stati esclusi in quanto positivi ad altri virus (Bocavirus, Rhinovirus, Adenovirus e Virus Inflenzali) e 4 (4,9%) perchè presentavano coinfezione VRS/RV. Tra i pazienti con VRS, 30 erano del sottogruppo VRS-A (63,8%), 17 del sottogruppo VRS-B (36,2%) e in 1 non è stato possibile effettuare la genotipizzazione.

Caratteristiche demografiche e cliniche dei bambini con bronchiolite.

I 77 bambini inclusi nel nostro studio erano 39 maschi (50,6%), 33 (42,9%) nati da parto cesareo con età gestazionale media di 38,1 settimane (range 38-41), di età media in giorni di 72,3 (range 23-171), con una media di peso alla nascita di 3,027 kg (range 1,110-3,970). 46 (59,7%) avevano ricevuto un allattamento materno.

In base alle informazioni ricavate dall'anamnesi, 22 (28,6%) bambini avevano familiarità positiva per asma, 14 (18,2%) per "wheezing", 41 (53,2%) per atopia, 17 (22,1%) per eczema e 36 (46,8%) erano stati esposti al fumo di sigaretta in famiglia. Tra i pazienti arruolati, 4 (5,2%) erano affetti da eczema.

La media dei giorni di degenza è stata 4,4 (range 1-12), 37 bambini (48,1%) hanno presentato febbre durante il ricovero e 3 (3,9%) hanno necessitato di cure di terapia intensiva.

Per quanto riguarda i parametri di laboratorio, la media dei leucociti nel sangue è stata di 10262/ μ L (range 3080-20070) e la media degli eosinofili è stata di 165/ μ L (range 0-1150). La media dello score di gravità clinica tra i pazienti arruolati è stata di 3,5 (range 0-7) con 41 bambini (53,2%) con uno score >4 (tabelle 1.1, 1.2).

Confronto delle caratteristiche demografiche e cliniche tra il gruppo con VRS e il gruppo virus negativo.

I pazienti con VRS avevano uno score di gravità clinica e la durata del ricovero in media più elevati rispetto ai pazienti con bronchiolite virus negativa; inoltre, più pazienti del gruppo VRS hanno usufruito di ossigenoterapia rispetto ai pazienti virus negativi. Il numero di linfociti è stato in media più elevato nei pazienti con bronchiolite virus negativa rispetto ai pazienti con VRS. Differenze tendenti al significativo tra i due gruppi sono risultati il numero totale dei leucociti e il numero degli eosinofili, in media più elevati per i pazienti virus negativi. Tra il gruppo virus negativo e VRS non sono emerse differenze statisticamente significative per quanto riguarda il tipo di parto, il peso, l'età gestazionale, l'età in giorni, l'allattamento materno, le familiarità, l'esposizione al fumo di sigaretta (tabelle 2.1, 2.2).

Confronto delle caratteristiche demografiche e cliniche tra il gruppo con VRS-A e il gruppo con VRS-B.

Dai risultati emerge una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi per quanto riguarda la familiarità per atopia: maggiore nei pazienti con bronchiolite da VRS-A rispetto ai pazienti con bronchiolite da VRS-B. Non sono emerse differenze statisticamente significative per il resto dei parametri considerati (familiarità per asma, eczema, wheezing, febbre, score>4, ricorso alla TIP, ossigeno terapia, gravità clinica) (tabelle 3.1, 3.2).

Confronto della composizione del microbiota nasale tra pazienti con bronchiolite da VRS e pazienti con bronchiolite virus negativa.

Il confronto tra degli ecosistemi microbici nasali è stato eseguito attraverso il calcolo della α e della β diversità. La valutazione della α diversità, che analizza la biodiversità all'interno delle comunità microbiche, è stata compiuta con il calcolo degli indici di Simpson, Shannon ed observed OTUs (figura 1). Sono stati ottenuti risultati statisticamente significativi per l'indice di alfa diversità Simpson e per l'indice di ricchezza Observed OTUs (rispettivamente $p=0,03$ e $p=0,01$) ma non per l'indice di alfa diversità Shannon ($p=0,2$); questi dati indicano una biodiversità maggiore nei pazienti virus negativi rispetto ai bambini con VRS.

La valutazione della β diversità, che mette a confronto la composizione microbica delle due comunità presenti nei differenti habitat nasali (VRS+ e virus-), eseguita con la PLS-DA, indica in entrambe i casi una composizione significativamente differente ($p<0,001$ e test di significatività ANOSIM = 0,385) (figura 2). Il VIP score ci evidenzia i batteri più determinanti per la divisione sembrano essere gli *Alistipes Putredinis* (VIP>2), appartenenti al Phylum dei Bacteroidetes per quanto riguarda i pazienti virus negativi e i *Brucella Microti* (VIP>2) appartenenti al phylum dei Proteobacteria per i pazienti VRS positivi (figura 2).

Il grafico Lefse mostra in ordine decrescente le specie discriminanti per ciascuno dei due gruppi. Lo *Streptococcus Pneumoniae*, appartenente al phylum dei Firmicutes, del gruppo VRS è l'unico ad avere un LDA score maggiore di 5 ed è la specie più discriminante il gruppo stesso con una $p<0,009$. Per i virus negativi invece tra le specie discriminanti con LDA score più elevato (superiore a 4), troviamo il *Kineothrix Alysoides* appartenente al phylum dei Firmicutes (figura 3).

Confronto del microbiota nasale tra pazienti con VRS-A e pazienti con VRS-B.

La valutazione della α diversità (indici di Shannon, di Simpson e l'indice di ricchezza Observed OTUs), nel confronto tra pazienti VRS-A e VRS-B, evidenzia una significativa minore biodiversità, nel microbiota nasale nel gruppo VRS-A rispetto al gruppo VRS-B (Shannon $p=0,08$; Simpson $p=0,07$). Per quanto riguarda la ricchezza in specie, indice Observed OTUs, osserviamo un trend di diminuzione nel gruppo VRS-A, ma la differenza tra i due gruppi non è significativa ($p=0,2$) (figura 4).

Interessante è però notare come i pazienti con VRS-A abbiano una composizione del microbiota nasale che si differenzia del tutto dai pazienti con VRS-B ($p<0,0001$, test di significatività ANOSIM = 0,724) e le specie “responsabili” di questa differenza sono evidenziate dal VIP score. In particolare, la *Veillonella Dispar* e il *Clostridium Ghonii*, appartenenti al phylum dei Firmicutes, e il *Parabacteroides Goldsteinii*, appartenente al phylum dei Bacteroidetes, sono quelli che hanno il più alto VIP score (>2) e sono importanti nella demarcazione del gruppo VRS-B. Lo *Pseudoflavonifractor Capillosus* è tra le specie con il più alto VIP score ($>1,8$) ed è importante nella separazione del gruppo VRS-A dall'altro. L'*Haemophilus Haemolitycus*, appartenente al phylum dei Proteobacteria, è significativamente over rappresentato nel gruppo VRS-B rispetto al gruppo VRS-A, pur non avendo il VIP score più elevato (figura 5). L'analisi Lefse mostra il *Clostridium Indolis* (LDA score >4), appartenente al phylum dei Firmicutes e l'*Haemophilus Haemolitycus* (LDA score >4), appartenente al phylum dei Proteobacteria, come specie più discriminanti rispettivamente per il gruppo VRS-A e VRS-B ($p<0,05$) (figura 6).

DISCUSSIONE

Il focus di questo studio è l'interazione tra microbiota nasale e Virus Respiratorio Sinciziale, il più comune agente eziologico delle bronchioliti. Tale interazione è stata valutata in primis confrontando l'assetto batterico del microambiente nasale in bambini con VRS e senza virus, ed è stata successivamente valutata nell'ambito dei sottotipi del VRS (VRS-A e VRS-B). I nostri risultati hanno evidenziato una minore biodiversità nel microbiota nasale dei pazienti affetti da bronchiolite da VRS rispetto al gruppo virus negativo. La composizione del microbiota è differente tra i due gruppi con specie discriminanti lo *Streptococcus Pneumoniae* per il gruppo VRS positivo e il *Kineothrix Alysoides* per il gruppo virus negativo. I risultati ottenuti, inoltre, suggeriscono un microbiota differente anche tra pazienti infettati dal VRS-A e pazienti infettati dal VRS-B con specie discriminanti il *Clostridium Indolis* per il gruppo VRS-A e l'*Haemophilus Haemolyticus* per il gruppo VRS-B.

La minore biodiversità all'interno delle comunità batteriche dei pazienti infettati dal VRS, sia in termini di ricchezza di specie (Observed OTUs) sia in termini di diversità in specie (indici di Simpson e Shannon), sta a significare che nel gruppo VRS, a differenza del gruppo virus negativo, è presente una riduzione del numero di specie nella comunità e una diminuzione delle unità per ogni singola specie. La biodiversità della flora batterica è associata ad alta resistenza contro le infezioni da parte di virus (51), comunità microbiche variegata agiscono contro le infezioni tramite vari meccanismi tra cui quello competitivo, sia nell'utilizzo delle risorse dell'ospite sottraendole ad eventuali patogeni, sia nell'occupazione delle nicchie all'interno dell'habitat (29).

La specie discriminante, determinata tramite l'analisi LEFSE, per il gruppo VRS risulta essere lo *Streptococcus Pneumoniae*, appartenente al phylum dei Firmicutes. Tale dato trova ampio riscontro in letteratura: prendendo come riferimento gli studi longitudinali, sembra che i profili batterici dominati dallo streptococco siano associati ad un'instabilità del microbiota nei primi due anni di vita e sembra che questa instabilità sia a sua volta associata ad una bassa biodiversità e ad una maggiore predisposizione allo sviluppo di bronchioliti e polmoniti (32). Lo studio di Brealey del 2017 suggerisce che il VRS e lo *Streptococcus Pneumoniae* possano agire in maniera sinergica tra di loro: la glicoproteina G del VRS funzionerebbe da "recettore" per l'aderenza dello streptococco facilitando la colonizzazione del tratto respiratorio superiore e il VRS potenzierebbe la virulenza dello pneumococco nei modelli sperimentali animali. Nei bambini con bronchiolite la colonizzazione da parte di batteri del genere streptococco, infine, è stata correlata ad un'aumentata gravità nel decorso della malattia e a maggiore infiammazione a livello delle vie aeree (52). A tal proposito, analizzando le tabelle descrittive del nostro studio, è possibile evidenziare che nei pazienti VRS e quindi con *Streptococcus Pneumoniae* come specie discriminante ci sia più frequentemente necessari-

tà di ossigenoterapia, una più lunga durata della degenza e uno score di gravità clinica più elevato rispetto al gruppo virus negativo.

Per quanto riguarda il gruppo virus negativo, invece, l'analisi Lefse indica come specie discriminante il *Kineothrix Alysoides*, batterio anaerobio sporigeno, produttore di butirrato, appartenente anch'esso al phylum dei Firmicutes. Recentemente uno studio ha dimostrato, in pazienti sottoposti a trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche, un'alta concentrazione nel microbiota fecale di batteri produttori di butirrato che diminuisce di circa cinque volte il rischio di sviluppare infezioni delle vie respiratorie basse, tipiche in pazienti trattati con immunosoppressori, e cioè infezioni da VRS, Influenza Virus, Coronavirus, Adenovirus. Il butirrato è un prodotto della fermentazione anaerobica di un gruppo di batteri tra cui la specie *Kineothrix* che contribuisce all'integrità dell'epitelio intestinale e, elemento più interessante, contribuisce anche alla salute nell'ospite in organi a distanza come il polmone riducendo l'infiammazione. Potrebbe quindi essere ipotizzabile un parallelismo tra il suo ruolo e, in generale, tra il ruolo di batteri produttori di butirrato nel microbiota intestinale e nel microbiota nasale, considerando per l'appunto, che il *Kineothrix* è la specie discriminante del gruppo virus negativo (53).

Sempre in merito alla differenza nel microbiota tra pazienti virus negativi e VRS, l'analisi PLS-DA mostra che i due gruppi si dividono in maniera abbastanza netta e ciò significa che sono caratterizzati da microbiota differenti. In particolare, il VIP score correlato all'analisi mostra, tra le specie più determinanti ai fini della divisione, per il gruppo virus negativo, l'*Alistipes Putredinis* appartenente al phylum dei Bacteroidetes, mentre per il VRS, la *Brucella microti*, appartenente al phylum dei Proteobacteria. Il dato concorda con molti studi in letteratura che hanno più volte dimostrato che l'alterazione qualitativa che più caratterizza il microbiota durante le infezioni respiratorie da VRS e che più lo distingue da un microbiota non perturbato dal virus, è la diminuzione di Bacteroidetes e una predominante abbondanza relativa di Proteobacteria (54). Quest'ultima osservazione non è da intendersi in senso assoluto: le comunità microbiche sono variegata e non può attribuirsi un rapporto di causa effetto alla presenza di Proteobacteria e all'infezione da VRS, è la predominanza di un determinato phyla che rompe l'equilibrio bilanciato della nicchia ecologica creando l'ambiente favorevole all'infezione. Il gruppo virus negativo si distingue rispetto al gruppo VRS anche per quanto riguarda l'abbondanza di *Lactobacillus Rogosae*. Il genere *Lactobacillus* è inserito nel cosiddetto "microbiota protettivo" insieme ai generi *Dolosigranulum* e *Corynebacterium*. In effetti, recenti lavori dimostrano che l'uso di antibiotici nel periodo perinatale compromette la colonizzazione da parte di bifidobatteri e lactobacilli con l'instaurarsi di una maggiore predisposizione alle allergie (21). Inoltre, altri studi dimostrano che l'inoculazione a livello nasale di specie di *Lactobacillus* protegge i topi dalle infezioni da VRS, grazie all'induzione di citochine antiinfiammato-

rie con un segnale mediato dai recettori Toll-like 3 (55). Sostanzialmente, quindi, dai nostri risultati emerge che il microbiota è differente tra i due gruppi e ciò ci legittima a ipotizzare che il VRS possa essere associato a un microbiota diverso (per predisposizione oppure per modifica post infezione) rispetto ai pazienti in cui il VRS stesso non è presente. Un microbiota differente tra i due gruppi porta anche ad ipotizzare che il gruppo di pazienti con bronchiolite virus negativa sia effettivamente una popolazione differente. Ciò potrebbe derivare da una clearance virale delle alte vie aeree più efficace e più rapida (per un microambiente più resistente o una risposta immunitaria più efficiente) o dalla presenza di un virus non facente parte del nostro pannello di identificazione ma comunque diverso dal VRS.

Molti studi oggi suggeriscono che il decorso della bronchiolite è influenzato non solo dal tipo di virus, ma anche dal sottotipo e dal genotipo. Partendo da tale premessa si è deciso di arricchire la nostra analisi con una comparazione tra il VRS-A e il VRS-B, andando a valutare innanzitutto se ci fossero delle differenze nelle caratteristiche anamnestiche, cliniche e demografiche e successivamente se effettivamente ci fossero dei profili distinti di microbiota da correlare ad uno o all'altro sottotipo. I risultati ottenuti, come mostrato dal grafico PLS-DA, suggeriscono una divisione abbastanza netta tra i due gruppi che, a sua volta, testimonia una differenza statisticamente significativa nei profili di microbiota. Dal punto di vista della biodiversità, i valori ottenuti non sono statisticamente significativi ma tendono comunque alla significatività, e mostrano una minore biodiversità per il microbiota dei pazienti infettati dal VRS-A (genotipo ON1) rispetto al gruppo con VRS-B (genotipo BA). Il genotipo A ON1, che è molto diffuso alle nostre latitudini e ha sostituito praticamente del tutto il genotipo A NA1, ha un decorso clinico più lieve rispetto a quest'ultimo; alcuni studi tuttavia lo contrappongono al VRS-B come genotipo capace di determinare un'infezione più grave (3). Ciò concorderebbe con la minore biodiversità del VRS-A rispetto al VRS-B emersa dai nostri risultati. Ad ogni modo il grafico PLS DA mostra i due gruppi che si dividono abbastanza nettamente e le specie discriminati sono il *Clostridium Indolis*, appartenente al phylum dei Firmicutes e l'*Haemophilus Haemolitycus* appartenente al phylum dei Proteobacteria rispettivamente per il gruppo VRS-A e il gruppo VRS-B. In letteratura non sono presenti studi riguardo la differenziazione del microbiota all'interno dei vari sottotipi di VRS, ma comunque l'*Haemophilus* fa parte insieme allo *Streptococcus* e a *Moraxella* di quel "microbiota rischioso" citato in precedenza, il *Clostridium Indolis* fa parte dello stesso phylum degli streptococchi, i Firmicutes. Questo ci dimostra comunque che all'interno del gruppo VRS, ci sono due specie a caratterizzarne le suddivisioni, appartenenti entrambe ai phyla che più sono associati a una predisposizione a sviluppare patologie respiratorie (53). Ponendo il caso che non sia il virus a determinare la dominanza dell'*Haemophilus* a livello del microbiota ma che la colonizzazione da parte dell'*Haemophilus* delle vie aeree sia indi-

pendente e precedente, potrebbe esistere una maggiore predisposizione allo sviluppo di asma nei bambini con questa precoce e caratteristica colonizzazione (35). In particolare, i generi *Haemophilus*, *Moraxella* e *Neisseria* determinano un aumentato rischio di sviluppare asma quando vengono a colonizzare il nasofaringe dei neonati (38). E' possibile che la presenza di questi patobionti, soprattutto quando si trovano in predominanza e in condizioni di scarsa biodiversità, determini un'inflammatione cronica delle vie aeree (56).

Il nostro studio è di tipo osservazionale trasversale, rappresenta una fotografia dell'assetto microbiologico ecologico e virale dei bambini arruolati durante un episodio di bronchiolite, e si pone in linea con la letteratura, ancora esigua, presente sull'argomento nel non poter stabilire un rapporto di causa – effetto tra microbiota e infezione. Non è possibile, cioè, definire con certezza se le differenze tra i profili di microbiota dipendano dalla perturbazione del microambiente da parte del VRS al momento dell'infezione, oppure se rappresentino esse stesse fattori predisponenti o protettivi di base su cui agisce poi il virus. Ad ogni modo un'opzione non esclude l'altra. Sono stati fatti dei tentativi per valutare se ci fosse una determinata consequenzialità: ad esempio lo studio di Kloepfer, aveva dimostrato come l'infezione da Rhinovirus (RV) potesse precedere l'aumento dell'abbondanza di *Streptococcus* e *Moraxella* di una settimana (57), mentre il lavoro di Gulraiz dimostrava come l'*Haemophilus* potesse favorire l'infezione da RV e aumentare la risposta infiammatoria contro il VRS (58). I risultati sono, però, parziali e contrastanti probabilmente perché a riguardo la risposta non è univoca. Si sottolinea a tale proposito la necessità di studi longitudinali che possano seguire i bambini e i cambiamenti del microbiota nel tempo associandoli alla storia clinica durante tale periodo e all'eventuale sopraggiungere di infezioni. Interessante sarebbe anche analizzare il microbiota e mettere in evidenza determinate differenze in base alla tipologia di virus che causano la bronchiolite, essendo ormai verificata la variabilità nel decorso clinico e nel follow-up a seconda del virus.

Si configurano come punti di forza del nostro studio la selezione dei bambini secondo criteri ben definiti (età < 6 mesi, ricoverati con diagnosi di bronchiolite, non prematuri, non sindromici, non pazienti con immunodeficienze, non precedente trattamento antibiotico o con probiotici), l'attenta raccolta d'informazioni riguardanti la storia pre-, peri- e post-natale, i dati clinici al momento dell'episodio acuto del bambino e l'anamnesi familiare per patologie di interesse pneumologico. Il nostro studio è poi il primo a ricercare eventuali differenze nel microbiota a seconda del sottotipo di VRS. I gruppi analizzati sono omogenei ed eliminando le coinfezioni abbiamo valutato il VRS in maniera isolata ed esente da bias; il gruppo VRS-A è stato valutato come costituito interamente dal genotipo ON1, e il gruppo VRS-B come costituito interamente dal genotipo BA.

Un limite del nostro studio potrebbe essere rappresentato dal fatto che abbiamo utilizzato come gruppo di controllo pazienti con bronchiolite ma senza il virus presente nell'aspirato nasofaringeo. Tale gruppo di controllo si discosta da quelli utilizzati negli studi presenti in letteratura sull'argomento, quindi è essenziale chiarirne il concetto: può essere considerato come un gruppo VRS negativo da confrontare con il corrispettivo VRS positivo, può essere considerato un gruppo in cui effettivamente la clearance virale delle alte vie aeree è più efficiente e più rapida (ciò potrebbe derivare da un ambiente più resistente o da una risposta immunitaria più efficiente) o potrebbe essere un gruppo di pazienti in cui non siamo riusciti ad isolare il virus perché non facente parte del nostro pannello di identificazione dei 14 virus respiratori: Influenza A e B, Coronavirus OC43, 229E, NL-63, HUK1, Adenovirus (AV), Parainfluenza virus 1-3 (PIV 1-3), Metapneumovirus, Bocavirus, Virus Respiratorio e Rhinovirus.

CONCLUSIONI

In conclusione, le differenze emerse nel microbiota nasale tra il gruppo virus negativo e il gruppo VRS, dimostrano che la struttura del microbiota stesso, è frutto dell'interazione con il VRS: l'uno potrebbe influenzare l'altro e viceversa. Inoltre, il nostro è il primo studio a caratterizzare anche le differenze tra il microbiota associato al VRS-A e quello associato al VRS-B.

Questi risultati sono la base da cui partire per l'identificazione di specifiche specie batteriche come marcatori di determinate condizioni cliniche del paziente. Tale caratterizzazione potrebbe anche aiutare a ripristinare, qualora venisse meno, un microbiota nasale capace di influenzare positivamente la risposta immunitaria, vista la mancanza di una terapia antivirale efficace in corso di bronchiolite. Approfondire la relazione virus-microbiota in associazione alla risposta immunitaria, rappresenta, infatti, il passo immediatamente successivo a questo studio. Una maggiore conoscenza nell'ambito di questo argomento, può condurre a risvolti terapeutici oltre che clinici con la possibilità di individuare i pazienti che potrebbero ottenere giovamento in termini di prevenzione e/o trattamento da presidi quali terapia antibiotica, vaccinazioni o uso di probiotici a seconda dei casi. Il microbiota andrebbe ad aggiungersi ai tanti fattori di rischio e variabili individuali e potrebbe assumere un ruolo centrale nell'innovazione e nella personalizzazione della terapia in corso di bronchiolite e più in generale di patologie respiratorie.

TABELLE

Tabella 1.1: caratteristiche demografiche e anamnestiche dei pazienti con bronchiolite (n=77).

Maschi*	39 (50,6 %)
Parto cesareo*	33 (42,9%)
Età in giorni**	72,3 (23-171)
Peso al ricovero**	5,2 (2,7-8,3)
Familiarità per asma*	22 (28,6%)
Familiarità per wheezing*	14 (18,2%)
Familiarità per atopia*	41 (53,2%)
Familiarità per eczema*	17 (22,1%)
Allattamento materno*	46 (59,7%)
Allattamento materno al ricovero*	36 (46,8%)
Esposizione al fumo in famiglia*	36 (46,8%)
Esposizione al fumo materno*	20 (26%)
Fumo in gravidanza*	11 (14,3%)
Eczema*	4 (5,2%)

* numero di pazienti e percentuale

** media con range

Tabella 1.2: caratteristiche cliniche e di laboratorio dei pazienti con bronchiolite.

Febbre*	37 (48,1%)
Giorni di degenza**	4,4 (1-12)
Score di gravità**	3,5 (0-7)
Score > 4*	41 (53,2%)
Globuli bianchi**	10262,9 (3080-20070)
Numero eosinofili**	164,7 (0-1150)
Eosinofili > 400*	6 (7,8%)
TIP*	3 (3,9%)

* numero di pazienti e percentuale

** media con range

Tabella 2.1: caratteristiche demografiche e anamnestiche dei bambini con bronchiolite da VRS (n=48) e virus negativa (n=29).

	Virus negativi n=29	VRS positivi n=48	p Value
Maschi *	14 (48,3%)	25 (52,1%)	0,465
Parto cesareo*	12 (42,9%)	27 (43,8%)	0,566
Età in giorni**	65,7 (26-171)	76,3 (23-162)	0,203
Peso al ricovero**	5,0 (2,7-7,6)	5,3 (3,4-8,3)	0,269
Familiarità per asma*	6 (21,4%)	16 (34,8%)	0,170
Familiarità per wheezing*	3 (10,7%)	11 (23,9%)	0,135
Familiarità per atopia*	14 (46,4%)	28 (60,9%)	0,166
Familiarità per eczema*	5 (17,9%)	12 (26,1%)	0,301
Allattamento materno*	15 (55,61%)	31 (64,6%)	0,299
Esposizione al fumo in famiglia*	13 (45,4%)	23 (51,1 %)	0,441
Esposizione al fumo materno*	6 (21,4%)	14 (31,1%)	0,266
Fumo in gravidanza*	4 (14,3%)	7 (15,6%)	0,582

* numero di pazienti e percentuale

** media con range

Tabella 2.2: caratteristiche cliniche dei pazienti con bronchiolite VRS positiva (48) e virus negativa (29).

	Virus negativi n=29	VRS positivi n=48	p Value
Giorni di degenza**	3,7 (2-9)	4,8 (1-12)	0,052
Score di gravità**	3,0 (0-6)	3,9 (1-7)	0,015
Score >4*	12 (42,9 %)	29 (60,4%)	0,107
Globuli bianchi**	11083 (6510-20070)	9784 (3080-16200)	0,094
Numero di eosinofili**	213 (10-706)	137 (0-1150)	0,099
Eosinofili>400*	4 (14,3 %)	2 (4,2%)	0,129
Ossigenoterapia*	3 (10,7%)	18 (37,5%)	0,01
TIP*	0	3 (6,3%)	0,246

* numero di pazienti e percentuale

** media con range

Tabella 3.1: caratteristiche demografiche e anamnestiche dei pazienti con bronchiolite da VRS-A (n=30) e VRS-B (n=17).

	VRS-A n=30	VRS-B n=17	p Value
Maschi*	15 (50%)	9 (52,9%)	0,544
Parto cesareo*	11 (36,7%)	9 (52,9%)	0,218
Età in giorni**	75,7 (23-162)	75,9 (30-115)	0,989
Peso al ricovero**	5,3 (3,4-8,3)	5,3 (3,43-6,71)	0,759
Familiarità per asma*	10 (34,5%)	6 (37,5%)	0,545
Familiarità per wheezing*	7 (24,1%)	4 (25%)	0,610
Familiarità per atopìa*	21 (72,4%)	7 (43,8%)	0,058
Familiarità per eczema*	10 (34,5%)	2 (12,5%)	0,105
Allattamento materno*	22 (73,3%)	9 (52,9%)	0,137
Esposizione al fumo in famiglia*	14 (50%)	8 (50%)	0,623
Esposizione al fumo materno*	9 (32,1%)	4 (25%)	0,443
Fumo in gravidanza*	4 (14,3%)	2 (12,5%)	0,624

* numero di pazienti e percentuale

** media con range

Tabella 3.2: caratteristiche cliniche dei pazienti con bronchiolite da VRS-A (n=30) e VRS-B (n=17).

	VRS-A n=30	VRS-B n=17	p Value
Giorni di degenza**	5,1 (1-12)	4,2 (1-8)	0,207
Score di gravità**	4 (1-7)	3,7 (1-6)	0,452
Score > 4*	19 (63,3%)	9 (52,9%)	0,347
Globuli bianchi**	10110 (3080-16200)	9079 (5490-15010)	0,259
Numero di eosinofili**	114,8 (10-390)	183,1 (0-1150)	0,244
Eosinofili >400*	0	2 (11,8%)	0,126
Ossigeno terapia*	13 (43,3%)	5 (29,4%)	0,266
TIP*	3 (10%)	0	0,250

* numero di pazienti e percentuale

** media con range

Figura 1: Box plots α -diversità, gli indicatori di biodiversità (indici di Simpson e Shannon) e ricchezza (observed OTUs) sono riportati per i gruppi Virus-negativi vs VRS-positivi.

■ Virus negativi=29 ■ VRS positivi=48

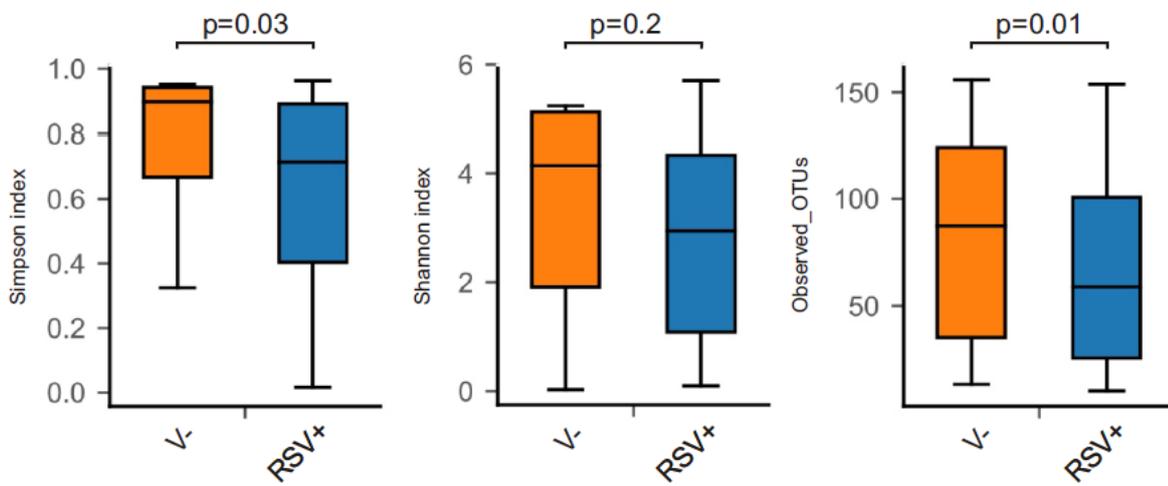


Figura 2: grafico PLS-DA e VIP score per i gruppi virus negativo e VRS positivo.

■ Virus negativi=29 ■ VRS positivi=48

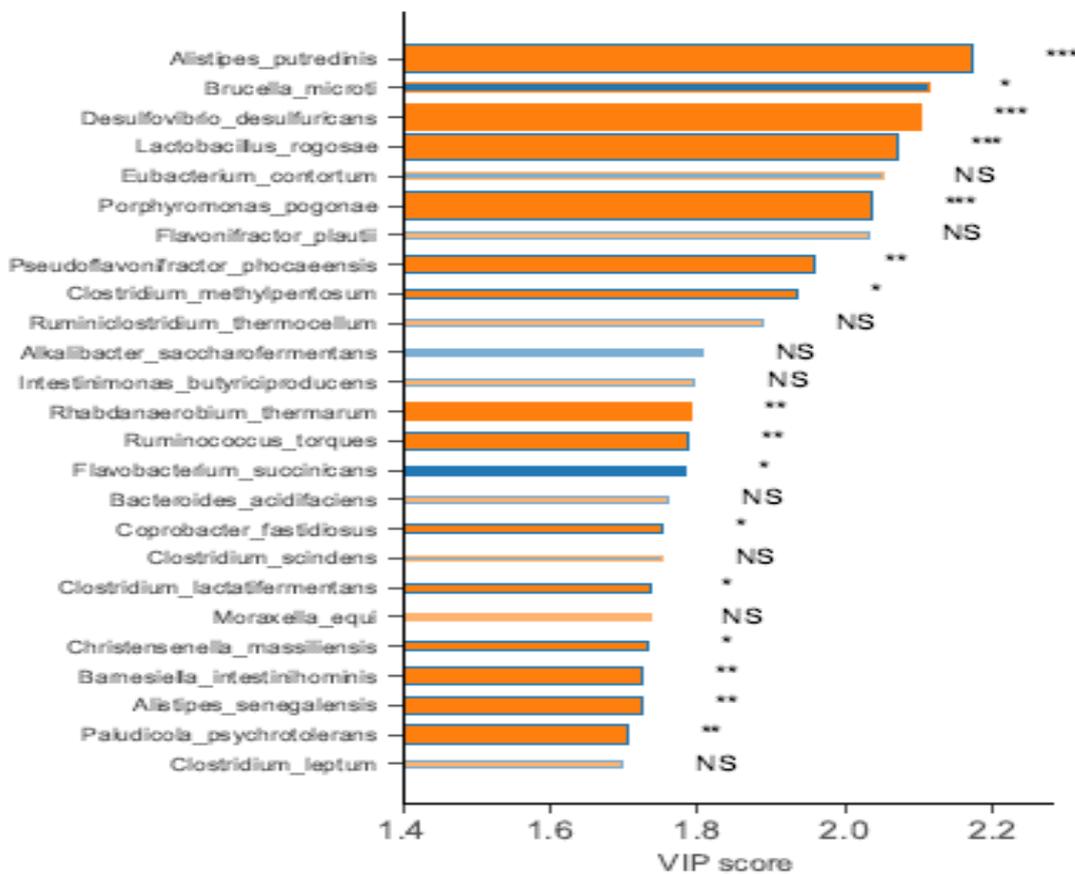
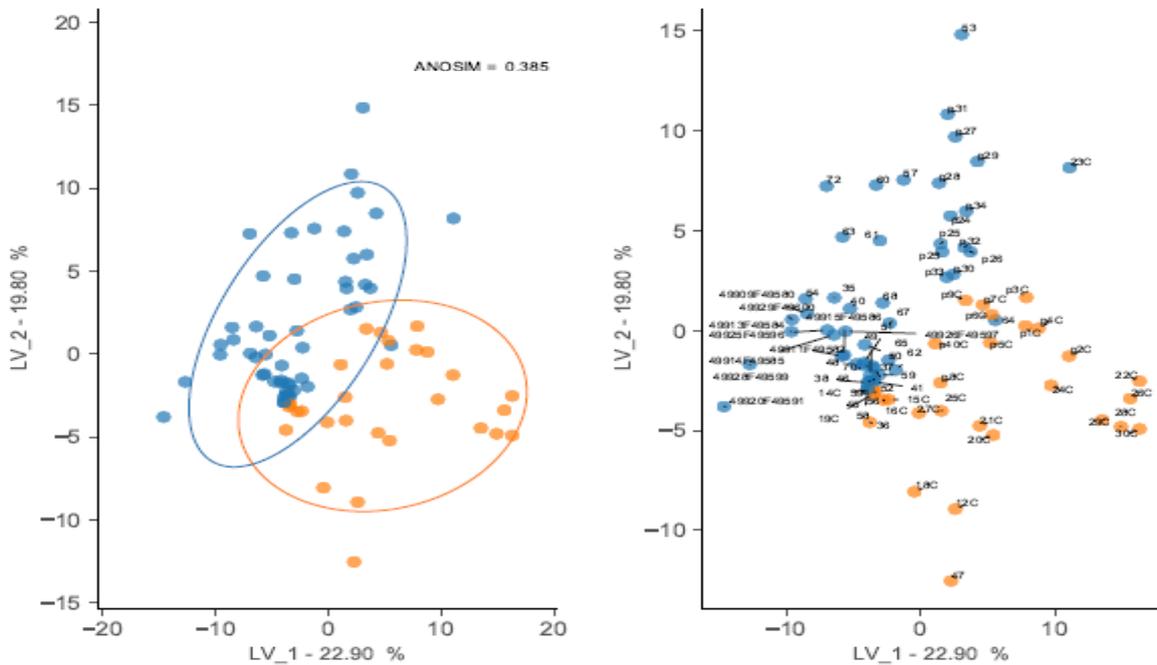


Figura 3: Grafico LEFSE come test indicatore di specie discriminanti nel gruppo VRS positivo e virus negativo.

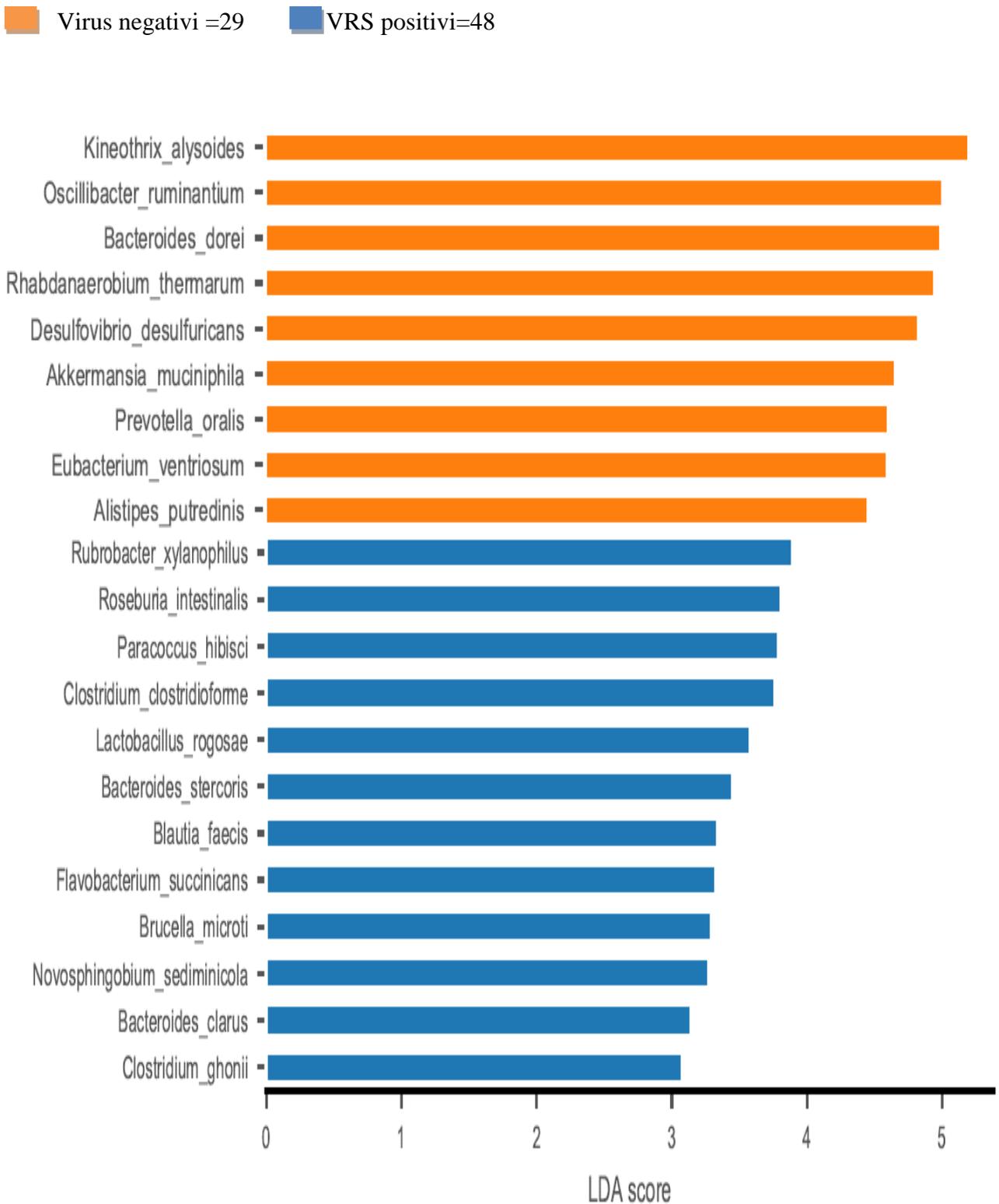


Figura 4: Box plots α -diversità, gli indicatori di biodiversità (indici di Simpson e Shannon) e ricchezza (observed OTUs) sono riportati per i gruppi VRS-A e i VRS-B.

■ VRS-A=30

■ VRS-B =17

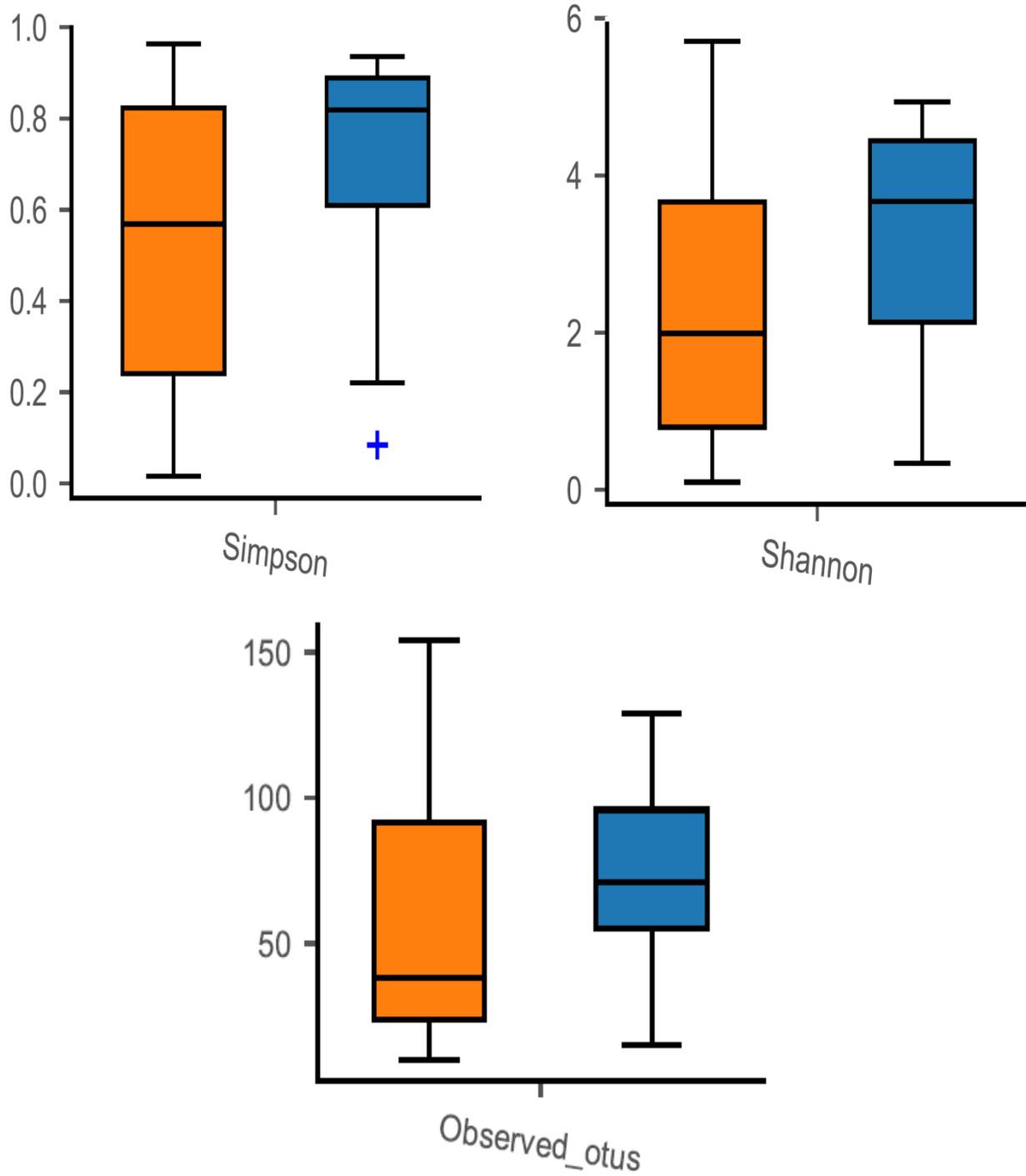


Figura 5: grafico PLS-DA e VIP score per i gruppi VRS-A e VRS-B

■ VRS-A=30 ■ VRS-B= 17

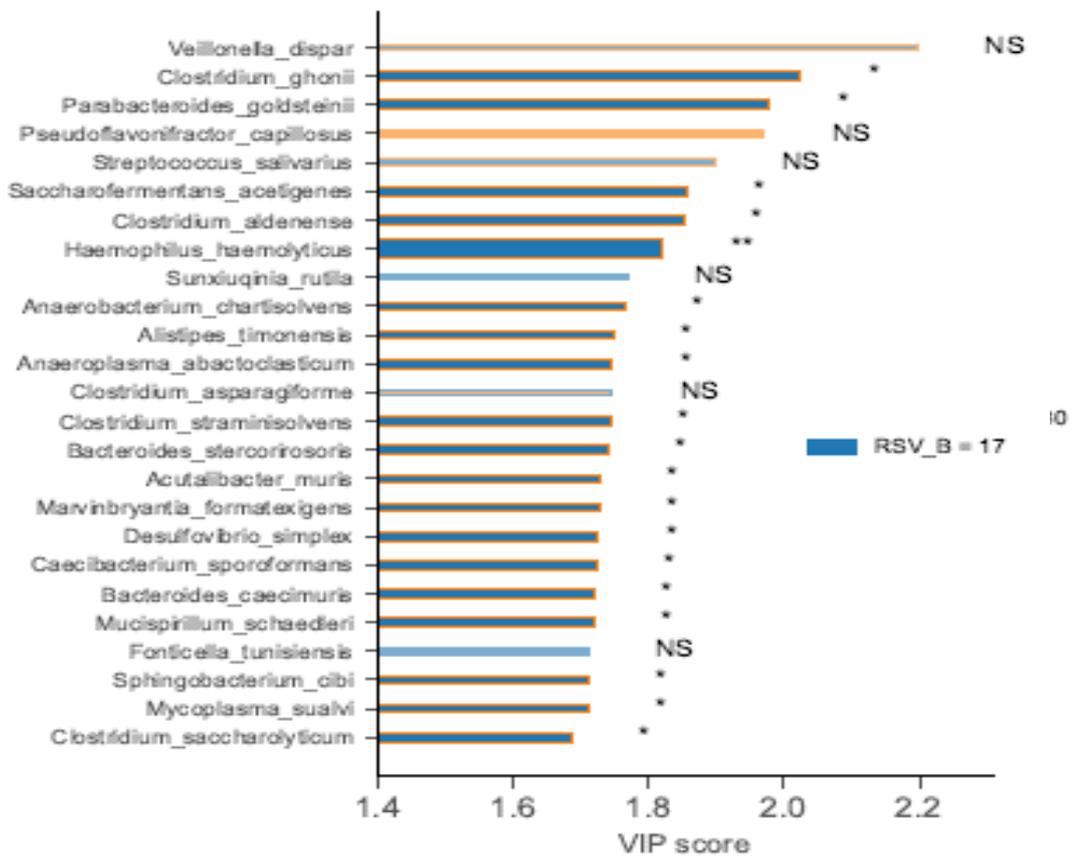
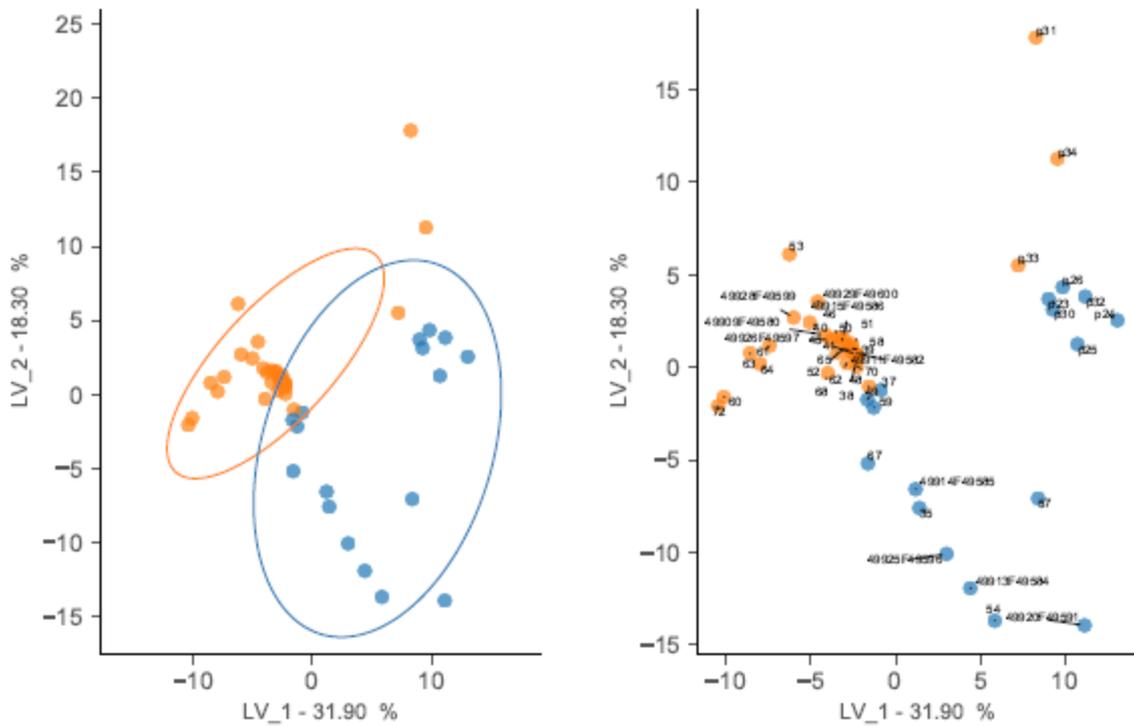
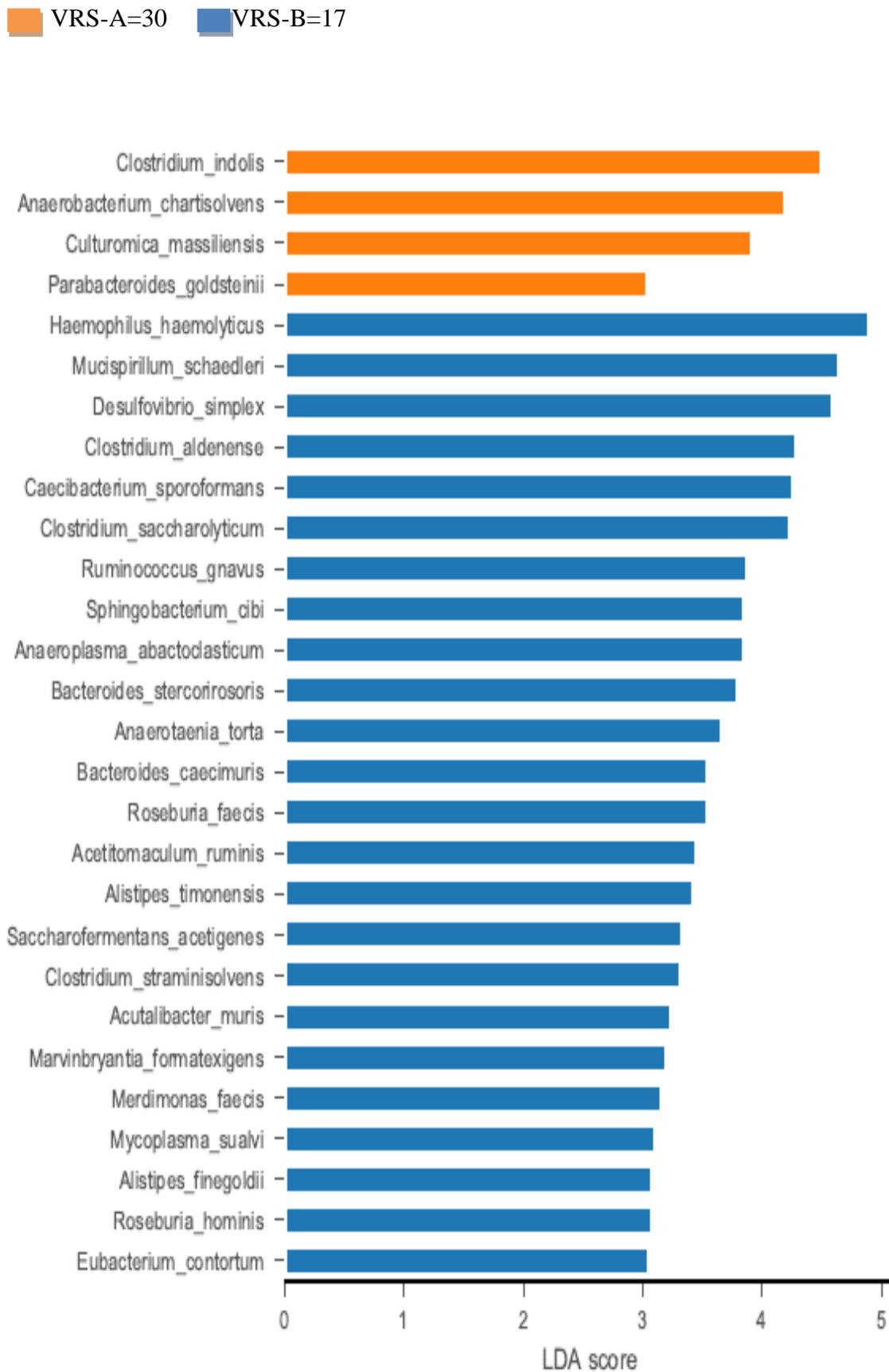


Figura 6: Grafico LEFSE come test indicatore di specie discriminanti nel gruppo VRS-A e VRS-B.



BIBLIOGRAFIA

1. Midulla F, Scagnolari C, Bonci E et al. *Respiratory syncytial virus, human bocavirus and rhinovirus bronchiolitis in infants*. Arch Dis Child 2010; 95:35–41.
2. Smyth RL, Openshaw PJ. *Bronchiolitis*. Lancet 2006; 368: 312–322.
3. Vandini S, Biagi C, Lanari M et al. *Respiratory Syncytial Virus: The Influence of Serotype and Genotype Variability on Clinical Course of Infection*. Int. J. Mol. Sci. 2017; 18: 1717-1730.
4. Laham FR, Mansbach JM, Piedra PA et al. *Clinical profiles of respiratory syncytial virus subtypes A and B among children hospitalized with bronchiolitis*. Pediatr. Infect. Dis. J. 2017; 376: 111-134.
5. Fodha I, Vabret A, Ghedira L et al. *Respiratory syncytial virus infections in hospitalized infants: Association between viral load, virus subgroup, and disease severity*. J. Med. Virol. 2007; 79: 1951–1958.
6. Hornsleth A, Klug B, Nir M et al. *Severity of respiratory syncytial virus disease related to type and genotype of virus and to cytokine values in nasopharyngeal secretions*. Pediatr. Infect. Dis. J. 1998, 17: 1114–1121.
7. Peret TC, Hall CB, Schnabel KC et al. *Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community*. J Gen Virol 1998; 79: 2221-2229.
8. Trento A, Galiano M, Videla C et al. *Major changes in the protein G of human respiratory syncytial virus isolates introduced by a duplication of 60 nucleotides*. J Gen Virol 2003; 84: 3115-3120.
9. Eshaghi A, Duvvuri VR, Lai R et al. *Genetic variability of human respiratory syncytial virus A strains circulating in Ontario: a novel genotype with 72 nucleotide G gene duplication*. PLoS One 2012; 7: e32807.
10. Pierangeli A, Trotta D, Scagnolari C et al. *Rapid spread of the novel respiratory syncytial virus A ON1 genotype, central Italy, 2011 to 2013*. Euro Surveill 2014; 19: 20843.
11. Otiero JR, Kamau EM, Nokes FJ et al. *Spread and evolution of respiratory syncytial virus A genotype ON1, Coastal Kenya, 2010-2015*. Emerg Infect Dis 2017; 23: 264-271.
12. Khor CS, Sam IC, Hooi PS et al. *Displacement of predominant respiratory syncytial virus genotypes in Malaysia between 1989 and 2011*. Infect Genet Evol. 2013; 14:357-60.
13. Prifert C, Streng A, Krempl CD et al. *Novel respiratory syncytial virus A genotype, Germany, 2011-2012*. Emerg Infect Dis. 2013;19(6):2019-30.

14. Comas-García A, Noyola DE, Cadena-Mota S et al. *Respiratory Syncytial Virus-A ONI Genotype Emergence in Central Mexico in 2009 and Evidence of Multiple Duplication Events*. J Infect Dis. 2018 Mar 13;217(7):1089-1098.
15. Hervás D, Reina J, Yañez A et al. *Epidemiology of hospitalization for acute bronchiolitis in children: differences between RSV and non-RSV bronchiolitis*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012 Aug;31(8):1975-81.
16. Nenna R, Scagnolari C, Petrarca L et al. *How Respiratory Syncytial Virus Genotypes Influence the Clinical Course in Infants Hospitalized for Bronchiolitis*. J Infect Dis. 2019 Jan 29;219(4):526-534.
17. Florin TA, Plint AC, Zorc J et al. *Viral bronchiolitis*. Lancet 2017; 389: 211–224.
18. Koch A, Sorensen P, Homoe P et al. *Population-based study of acute respiratory infections 355 in children, Greenland*. Emerging Infect Dis 2002; 8:586–593.
19. Bomar L, Brugger SD, Lemon KP et al. *Bacterial Microbiota of the Nasal Passages Across the Span of Human Life*. Curr Opin Microbiol 2018; 41: 8–14.
20. Vayssier-Taussat M, Albina E, Citti C et al. *Shifting the paradigm from pathogens to pathobiome: new concepts in the light of meta-omics*. Front Cell Infect Microbiol. 2014; 4:29-34.
21. Iebba V, Nicoletti M, Schippa S. *Gut Microbiota and the immune system: an intimate partnership in health and disease*. Sage journals 2012; 25:823-825.
22. Stein MM, Hrusch CL, Gozdz et al. *Innate Immunity and Asthma Risk in Amish and Hutterite Farm Children*. N Engl J Med. 2016; 375: 411-421.
23. Abt MC, Osborne LC, Monticelli LA et al. *Commensal bacteria calibrate the activation threshold of innate antiviral immunity*. Immunity 2012; 37: 158–170.
24. Charlson ES, Bittinger K, Haas AR et al. *Topographical Continuity of Bacterial Populations in the Healthy Human Respiratory Tract*. Am J Respir Crit Care Med 2011; 184: 957-963.
25. Marsland BJ, Gollwitzer ES. *Host-microorganism interactions in lung diseases*. Nat Rev Immunol. 2014; 14: 827-835.
26. Geurkink N. *Nasal anatomy, physiology, and function*. J Allergy Clin Immunol. 1983; 72: 123-128.
27. Camarinha-Silva A, Jáuregui R, Chaves-Moreno D et al. *Comparing the anterior nare bacterial community of two discrete human populations using Illumina amplicon sequencing*. Environ Microbiol. 2014; 16 :2939-2952.
28. Stearns JC, Davidson CJ, McKeon S et al. *Culture and molecular-based profiles show shifts in bacterial communities of the upper respiratory tract that occur with age*. ISME J. 2015; 9: 1246-1259.

29. Wouter A. A, De Steenhuijsen P, Sanders EA et al. *The role of the local microbial ecosystem in respiratory health and disease*. *Phil. Trans. R. Soc.* 2014; 370: 571-574.
30. Biesbroek G, Bosch AA, Wang X et al. *The impact of breastfeeding on nasopharyngeal microbial communities in infants*. *Am J Respir Crit Care Med* 2014, 190: 298-308.
31. Bosch AA, Levin E, van Houten MA et al. *Development of upper respiratory tract microbiota in infancy is affected by mode of delivery*. *E Bio Medicine* 2016; 9: 336-345.
32. Biesbroek G, Tsivtsivadze E, Sanders E et al. *Early Respiratory Microbiota Composition Determines Bacterial Succession Patterns and Respiratory Health in Children*. *Am J RespirCrit Care Med* 2014; 190:1283-1292.
33. Van den Bergh MR, Biesbroek G, Rossen JW et al. *Associations between pathogens in the upper respiratory tract of young children: interplay between viruses and bacteria*. *PLoS ONE* 2012; 7: e47711.
34. Vissing NH, Chawes LK, Bisgaard H. *Increased Risk of Pneumonia and Bronchiolitis after Bacterial Colonization of the Airways as Neonates*. *Am J RespirCrit Care Med* 2013; 188(10): 1246–1252.
35. Teo MS, Mok D, Pham K et al. *The infant airway microbiome in health and disease impacts later asthma development*. *Cell Host Microbe*.2015; 17: 704–715.
36. Rosas-Salazar C, Shilts M, Tovchigrechko A et al. *Nasopharyngeal Lactobacillus is associated with a reduced risk of childhood wheezing illnesses following acute respiratory syncytial virus infection in infancy*. *J Allergy ClinImmunol* 2018; 142: 1447–1456.
37. Bisgaard H, Hermansen MN, Buchvald F et al. *Childhood asthma after bacterial colonization of the airway in neonates*. *N England J Med* 2007; 357:1487-1495.
38. Hilty M, Burke C, Pedro H et al. *Disordered microbial communities in asthmatic airways*. *PloS One* 2010; 5: 8578-8593.
39. Hasegawa K, Mansbach MJ, Ajami NJ et al. *Association of nasopharyngeal microbiota profiles with bronchiolitis severity in infants hospitalized for bronchiolitis*. *EurRespir J* 2016; 48: 1329–1339.
40. Chromy BA, Fodor IK, Montgomery NK et al. *Cluster analysis of host cytokine responses to biodefense pathogens in a whole blood ex vivo exposure model (WEEM)*. *BMC Microbiol.* 2012; 12: 79-85.
41. Martino D, Prescott S. *Epigenetics and prenatal influences on asthma and allergic airways disease*. *Chest* 2011; 139: 640–647.
42. Zhu J, Yamane H, Paul WE. *Differentiation of effector CD4 T cell populations*. *Annu Rev Immunol* 2010; 28: 445–489.

43. Følsgaard NV, Schjørring S, Chawes BL et al. *Pathogenic Bacteria Colonizing the Airways in Asymptomatic Neonates Stimulates Topical Inflammatory Mediator Release*. Am J Respir Crit Care Med 2013; 187: 589–595.
44. Wouter A. A, de Steenhuijsen P, Santtu He et al. *Nasopharyngeal Microbiota, Host Transcriptome, and Disease Severity in Children with Respiratory Syncytial Virus Infection*. Am J Respir Crit Care Med 2016; 194: 1104–1115.
45. Weinberger DM, Klugman KP, Steiner CA et al. *Association between respiratory syncytial virus activity and pneumococcal disease in infants: a time series analysis of US hospitalization data*. PLoS Med. 2015; 12: e1001776.
46. Stensballe LG, Hjulær T, Andersen A et al. *Hospitalization for respiratory syncytial virus infection and invasive pneumococcal disease in Danish children aged <2 years: a population-based cohort study*. Clin Infect Dis. 2008; 46:1165–1171.
47. Stark JM, Stark MA, Colasurdo GN et al. *Decreased bacterial clearance from the lungs of mice following primary respiratory syncytial virus infection*. J Med Virol. 2006; 78: 829–838.
48. Madhi SA, Klugman KP. *A role for Streptococcus pneumoniae in virus-associated pneumonia*. Nat Med. 2004; 10:811–813.
49. Ichinohe T, Pang IK, Kumamoto Y et al. *Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection*. Proc Natl Acad Sci USA. 2011;108: 5354–5359.
50. Pierangeli A, Midulla F, Antonelli G et al. *Detection and typing by molecular techniques of respiratory viruses in children hospitalized for acute respiratory infection in Rome, Italy*. J Med Virol, 2007 Apr;79(4): 462-8.
51. Dillon RJ, Vennard CT, Buckling A et al. *Diversity of locust gut bacteria protects against pathogen invasion*. Ecol. Lett 2005; 8: 1291–1298.
52. Brealey JC, Chappel KJ, Galbraith S et al. *Streptococcus pneumoniae colonization of the nasopharynx is associated with increased severity during respiratory syncytial virus infection in young children*. Respirology 2017; 23: 220-227.
53. Haak BW, Littmann ER, Chaubard JL et al. *Impact of Gut Colonization with Butyrate Producing Microbiota on Respiratory Viral Infection Following Allo-HCT*. Blood 2018; 131: 2978-2986.
54. Hyde ER, Petrosino JF, Piedra PA et al. *Nasopharyngeal Proteobacteria are associated with viral etiology and acute wheezing in children with severe bronchiolitis*. J Allergy Clin Immunol. 2014; 133: 1220–1222.

55. Tomosada Y, Chiba E, Zelaya H et al. *Nasally administered Lactobacillus rhamnosus strains differentially modulate respiratory antiviral immune responses and induce protection against respiratory syncytial virus infection.* BMC Immunol 2013; 14:40-45.
56. Kraft M. *The role of bacterial infections in asthma.* Clin Chest Med 2000 21: 301–313.
57. Kloepfer KM, Wai Ming Lee, Pappas ET et al. *Detection of pathogenic bacteria during Rhinovirus infection is associated with increased respiratory symptoms and asthma exacerbations.* J Allergy Clin Immunol 2014; 133: 1301-1307.
58. Gulraiz F, Bellinghausen C, Bruggeman CA et al. *Haemophilus influenzae increases the susceptibility and inflammatory response of airway epithelial cells to viral infections.* FASEB J. 2015; 29: 849-58.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il professore Fabio Midulla, tutor di questo mio percorso di Dottorato, per l'aiuto fornitomi, per la grande conoscenza che mi ha donato, per la capacità di stimolare in me l'interesse per l'argomento qui discusso e infine per la pazienza, la fiducia e l'entusiasmo che mi ha trasmesso.

Ringrazio le mie colleghe Ambra, Greta, Laura e Raffaella per la disponibilità e il sostegno dimostratomi durante tutto il periodo di dottorato. La vostra presenza è stata una certezza per me.

Un ringraziamento particolare va a mio marito Alessio per il suo dolce e instancabile sostegno nel corso degli studi.

Ringrazio i miei genitori e mia sorella per tutti gli insegnamenti che custodirò sempre con me e per tutto l'amore che mi hanno continuamente donato.

Un pensiero speciale va alla mia piccola Elisa da cui giornalmente ho attinto energia per continuare il mio percorso. Spero che quando sarai grande sarai fiera della tua mamma e perdonerai le mie assenze.