

Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE MEDICHE GENERALI E SCIENZE DEI SERVIZI

Ciclo 35

Settore Concorsuale: 06/G1 - PEDIATRIA GENERALE, SPECIALISTICA E NEUROPSICHIATRIA
INFANTILE

Settore Scientifico Disciplinare: MED/38 - PEDIATRIA GENERALE E SPECIALISTICA

RELAZIONE TRA CARICA VIRALE, REAZIONE IMMUNITARIA DELL'OSPITE,
MICROBIOTA E DECORSO CLINICO DELLA BRONCHIOLITE ACUTA NEI
BAMBINI CON ETÀ INFERIORE AI 12 MESI (RMB2018)

Presentata da: Alessandro Rocca

Coordinatore Dottorato

Fabio Piscaglia

Supervisore

Marcello Lanari

Esame finale anno 2023

Sommario

1. Introduzione	1
1.1 Bronchiolite acuta	1
1.2 Virus Respiratorio Sinciziale (VRS)	12
1.2.1 Correlazione carica virale e severità del decorso clinico della bronchiolite	13
1.2.2 Interazione VRS-ospite: ruolo della risposta immunitaria ed infiammatoria dell'ospite	30
1.3 Microbiota	33
1.3.1 Microbiota e bronchiolite	33
1.3.2 Microbiota e wheezing ricorrente in età pre-scolare/asma in età scolare	84
2. Scopo del progetto di ricerca	112
3. Materiali e metodi	113
3.1. Disegno dello studio	113
3.2. Popolazione dello studio	113
3.3. Visite, campioni e dati raccolti	113
3.4. Analisi statistica	119
4. Risultati	120
4.1. Analisi della carica del VRS e correlazione con outcome di severità clinica in corso di bronchiolite acuta	126
4.2. Analisi della composizione del microbiota nasofaringeo, salivare ed intestinale durante bronchiolite acuta e follow-up a breve termine	133
5. Discussione	150
6. Conclusioni e prospettive future	158
7. Bibliografia	159

1. Introduzione

1.1 Bronchiolite acuta

Definizione ed epidemiologia

La bronchiolite è una malattia infiammatoria acuta del tratto respiratorio inferiore, caratterizzata da ostruzione delle piccole vie aeree (bronchioli), ad eziologia infettiva, generalmente virale.

E' caratterizzata dall'insorgenza di rinite e tosse cui si associa la presenza di flogosi delle vie aeree inferiori (broncospasmo-wheezing, rantoli crepitanti) nei primi mesi/anni di vita. L'età di insorgenza, e di conseguenza la definizione stessa della bronchiolite, variano nel mondo: per gli Europei (in primis il National Institute for Health and Care Excellence, NICE, ma anche a livello nazionale con la Consensus pubblicata da alcuni anni dalla Società Italiana di Pediatria, SIP) la bronchiolite è una patologia tipica del primo anno di vita, pur potendo essere ancora sospettata nel corso del secondo anno di vita.¹⁻² Per i Nord Americani (specie l'American Academy of Pediatrics – AAP), la bronchiolite è definita come il primo episodio di broncospasmo nel bambino di età inferiore ai 24 mesi di vita con segni clinici di flogosi delle vie aeree inferiori in assenza di altre cause scatenanti il wheezing.³

La bronchiolite acuta rappresenta una delle più comuni patologie del lattante e si stima colpisca 1 bambino su 3 nei primi 12 mesi di vita.¹ Si tratta della principale causa di ospedalizzazione del lattante, sebbene i dati al riguardo siano influenzati dalla differenza nel criterio dell'età adottato per la definizione di questa patologia (sono riportati circa 30.500 ricoveri all'anno per bronchiolite nel Regno Unito, pari al 2-3% di tutti gli affetti, mentre si parla di circa 100.000 ospedalizzazioni annue negli Stati Uniti).^{1,3}

L'epidemiologia della bronchiolite acuta riflette quella dei virus causativi, in primo luogo il Virus Respiratorio Sinciziale (VRS), ma anche il Rhinovirus (RV), meno comunemente l'Adenovirus, i virus influenzali e parainfluenzali, diversi sierotipi di Coronavirus, il Metapneumovirus (MPV), il Bocavirus, i Cocksackievirus.^{2,4-6}

Conseguentemente, questa patologia presenta un'incidenza fluttuante nel corso dell'anno, con incremento dei casi nel periodo invernale nelle zone a clima temperato, come l'Italia, in cui il periodo epidemico si estende da novembre fino ad aprile, con picco di incidenza d'infezione in gennaio-febbraio.⁷ Tuttavia, la recente pandemia COVID-19 causata dal virus SARS-CoV-2, ed in particolare l'attuazione dei ripetuti lockdown ed il diffuso utilizzo di dispositivi di protezione individuale (DPI) hanno determinato un drastico cambiamento nell'andamento epidemiologico della bronchiolite acuta. Data la ridottissima circolazione di virus respiratori, durante la stagione invernale 2020-2021 la bronchiolite è pressoché scomparsa dallo scenario ospedaliero, per poi ripresentarsi con una stagionalità anomala in tutto il mondo (e concordemente anche in Italia), che ha visto insorgere i primi casi a partire già dai mesi estivi dell'anno 2021, arrivando ad un picco epidemico nel mese di novembre, con successivo declino da gennaio 2022 (alla ripresa della diffusione di SARS-COV-2 e delle misure di contenimento).⁷⁻⁹

Fisiopatologia e clinica

La bronchiolite esordisce con sintomi prodromici caratterizzati da flogosi delle prime vie aeree (rinite siero-mucosa, faringite). Col passare dei giorni, l'infezione si estende alle vie aeree inferiori e ai bronchioli, dove provoca flogosi, edema, necrosi epiteliale e secrezione mucosa endoluminale (solo in minima parte contrazione reattiva della muscolatura bronchiale). Il processo flogistico determina l'insorgenza di distress respiratorio caratterizzato da tachipnea con associata comparsa di utilizzo dei muscoli respiratori accessori, presenza di alitamento delle pinne nasali, rientramenti al

giugulo, intercostali e costo-diaframmatici. All'auscultazione compaiono i tipici reperti come sibili o rantoli fini. Il distress respiratorio può determinare, nel paziente più piccolo, l'insorgenza di difficoltà alimentari, con conseguente rischio di disidratazione. Possono verificarsi episodi di apnea. Il processo infiammatorio può arrivare a produrre un'ostruzione "a valvola", con sviluppo di air trapping a livello bronchiolare ed alveolare e successiva comparsa di atelettasia distale, con alterazione degli scambi gassosi.¹⁻⁴

Fattori di rischio per bronchiolite severa e score clinici

Nella valutazione del lattante affetto da bronchiolite acuta occorre tenere a mente alcuni fattori di rischio anamnestici che gravano sulla severità clinica della patologia e sulla conseguente necessità di ospedalizzazione del paziente.

Tra questi fattori spicca innanzitutto l'età al momento dell'infezione (in particolare sotto i 6 mesi di vita), che correla in maniera inversamente proporzionale alla gravità clinica, come evidenziato anche da un ampio studio prospettico condotto su 5067 bambini peraltro sani.^{2,10}

La nascita pretermine rappresenta uno dei principali fattori di rischio per bronchiolite acuta severa in corso di infezione da VRS, come si evince dalle più recenti revisioni sistematiche, in cui il tasso di ospedalizzazione aumenta fino al 10% nei nati prematuri senza comorbidità. L'ospedalizzazione del lattante nato pretermine sembra essere direttamente proporzionale alla prematurità, aumentando al decrescere dell'età gestazionale (EG) alla nascita.^{2,11-12}

Numerose comorbidità sono riconosciute come fattori di rischio per sviluppo di bronchiolite acuta severa, in particolare in corso di infezione severa VRS.

La displasia broncopolmonare o chronic lung disease (BPD/CLD) rappresenta il fattore di rischio con odds ratio maggiori (OR 2.2 – 7.2 a seconda degli studi): questa categoria di bambini non solo è maggiormente esposta al rischio di infezione da VRS, ma anche alla necessità di supporto respiratorio, ventilatorio, ricovero in Terapia Intensiva (TI).^{2,13}

È stato inoltre documentato che cardiopatie emodinamicamente significative (HS-CHD, definite come CHD cianogene o meno non corrette chirurgicamente o sottoposte a palliazione chirurgica ed associate ad ipertensione polmonare; i pazienti con pressione arteriosa polmonare sistolica (PAPs) \geq 40 mmHg o PAP media \geq 25 mmHg; e/o necessità di terapia farmacologica per scompenso cardiaco congestizio), con iperafflusso polmonare, stasi polmonare, shunt sinistro/destro o cianosi, presentano molteplici e complessi fattori fisiopatologici cardiocircolatori e respiratori che riducono le capacità di risposta compensatoria adeguata a patologie intercorrenti. I pazienti affetti risultano essere maggiormente a rischio di bronchiolite severa in corso di infezione da VRS, fino al 53% dei pazienti può richiedere ricovero in TI ed è riportato un tasso di mortalità che ammonta fino al 3.3%.^{2,14}

La Trisomia 21 rappresenta una comorbidità con un livello di evidenza moderato ad un aumentato rischio di ospedalizzazione durante infezione da VRS. Altri fattori di rischio associati ad infezione severa da VRS, ma con un livello di evidenza basso, sono infine le condizioni di immunodeficit, la fibrosi cistica, le condizioni di impairment neurologico, la presenza di malformazioni congenite.^{2,15}

Numerosi fattori di rischio ambientali ed individuali aggiuntivi sono risultati variamente associati con un aumento del rischio di ospedalizzazione: nascita durante il periodo epidemico, presenza di fratelli maggiori in famiglia e ambiente domestico, inserimento in comunità, esposizione al fumo di sigarette, assenza di allattamento materno, sovraffollamento, basso peso alla nascita, sesso maschile, familiarità per asma e atopia.^{2,16-17}

<ul style="list-style-type: none"> • Anamnesi familiare <ul style="list-style-type: none"> ○ Familiarità per asma e atopia • Anamnesi personale <ul style="list-style-type: none"> ○ Prematurità (EG < 32 settimane) ○ Basso peso alla nascita/Low Birth Weight (LBW, PN < 2500 g) ○ Età < 3 mesi • Anamnesi patologica remota <ul style="list-style-type: none"> ○ Patologie cardiopolmonari <ul style="list-style-type: none"> ▪ Broncodisplasia (BPD/CLD) ▪ Cardiopatie congenite emodinamicamente significative (cardiopatie cianogene o meno non corrette chirurgicamente o sottoposte a palliazione chirurgica ed associate ad ipertensione polmonare, pazienti con pressione arteriosa polmonare sistolica (PAPs) \geq 40 mmHg o PAP media \geq 25 mmHg e/o necessità di terapia farmacologica per scompenso cardiaco congestizio) ▪ Fibrosi Cistica, malformazioni tracheo-bronchiali congenite) ○ Condizioni di impairment neurologico ○ Trisomia 21 ○ Immunodeficit primitivi o secondari • Esposizione domiciliare a: <ul style="list-style-type: none"> ○ Fumo di sigaretta ○ Sovraffollamento ○ Ambiente umido e freddo ○ Contesto familiare non affidabile, distanza dall'ospedale, mancanza di mezzi di trasporto che consentano un pronto ritorno al PSP in caso di peggioramento ○ Nascita durante il periodo epidemico ○ Presenza di fratelli maggiori nell'ambiente domestico condiviso ○ Inserimento in comunità
<p>Criteri di trasferimento in TI</p> <ul style="list-style-type: none"> • Insufficienza respiratoria con necessità di ventilazione assistita • Apnea associata a desaturazione • Grave compromissione delle condizioni generali

Tabella 1: Fattori di rischio per lo sviluppo di bronchiolite acuta severa.

La severità clinica della bronchiolite si estrinseca di fatto nello sviluppo di insufficienza respiratoria che rende necessaria la gestione del lattante affetto con un'intensità più o meno invasiva di assistenza respiratoria. Nel corso degli anni sono stati elaborati numerosi score clinici, con l'obiettivo di valutare la severità della bronchiolite, sia per tentare di stabilire con maggiore oggettività quale lattante necessiti di ricovero ospedaliero, sia per tentare di prevedere l'evoluzione del decorso clinico, specie in termini di necessità di supporto respiratorio, intensità di cure, durata dell'ospedalizzazione.

Una recente revisione sistematica (2018) ha analizzato tutti gli score pubblicati in letteratura, riscontrando che ne esistono almeno 32, che analizzano nel complesso 26 parametri variabilmente combinati tra loro (3 in particolare ricorrono: frequenza respiratoria – FR, wheezing, rientramenti). Soltanto 6 score hanno dimostrato di possedere comprovata validità metodologica; tra tutti, lo score di Marlais et al. viene in definitiva ritenuto lo strumento migliore attualmente a disposizione. Si tratta di uno score composto da 5 predittori clinici (FR, frequenza cardiaca – FC, saturazione

dell'ossigeno – SatO₂ o SpO₂, età, durata dei sintomi) significativamente ed indipendentemente associati ad ospedalizzazione nel lattante di età < 12 mesi con bronchiolite. Il punteggio totale varia da 0 a 5 punti, il cut-off ottimale per predire la necessità di ricovero è risultato essere ≥3 (sensibilità 74%, specificità 77%, calore predittivo positivo VPP – 67%, valore predittivo negativo – VPN 83%).¹⁸

Successivamente alla revisione sistematica del 2018 sono stati pubblicati altri 2 score (il Liverpool Infant Bronchiolitis Severity Score – LIBSS score ed il Respiratory Syncytial Virus Network – ReSViNET score), che analizzano molti più parametri del punteggio di Marlais, sempre con la finalità di individuare il lattante che necessita di ospedalizzazione. Il LIBSS presenta 2 versioni distinte (una per il lattante di età inferiore ai 3 mesi di vita, l'altra per età ≥3 mesi) ed analizza 10 parametri (aspetto generale, apnea, distress respiratorio, FiO₂ erogata, FR, FC, reattività, alimentazione, diuresi e tempo di refill capillare). Il punteggio totale permette di classificare la bronchiolite come lieve (0-10 punti), moderata (11-20 punti) o severa (≥21 punti).¹⁹

Anche il ReSViNET score si compone di 2 versioni: una per la valutazione da parte del medico, l'altra (semplificata) per la valutazione da parte del caregiver, con l'intento di favorire una valutazione oggettiva della severità anche nella gestione a domicilio. Analizza 7 parametri (difficoltà alimentari, necessità di terapia medica di supporto, grado di distress respiratorio, frequenza respiratoria, apnea, aspetto generale, febbre) per un punteggio globale da 0 a 20. Sebbene le due versioni del ReSViNET score rappresentino un punto di forza per questo punteggio in quanto considerabili una sorta di “linguaggio comune” tra medico e famiglia per valutare la severità della bronchiolite, va specificato che in un recente lavoro non è stata riscontrata un'adeguata concordanza nelle rispettive valutazioni del lattante con bronchiolite.²⁰⁻²¹

In un lavoro il LIBSS score ed il ReSViNET score sono stati comparati tra loro in Ruanda, in centri ospedalieri di terzo livello, riscontrando una elevatissima concordanza nella classificazione della severità della patologia respiratoria e nella loro efficacia nel guidare verso la decisione clinica di ospedalizzazione e addirittura trasferimento in TI. Va tuttavia specificato che la coorte analizzata nello studio è consistita in un campione di bambini affetti da qualunque tipo di infezione respiratoria acuta, non soltanto bronchiolite.²²

Allo stato attuale, nessuno score clinico risulta sufficientemente validato sotto il profilo predittivo della evoluzione del quadro o della risposta alla terapia impostata.¹⁸

Diagnosi

La bronchiolite è una malattia virale la cui diagnostica si concentra in due fasi principali: diagnosi clinica e diagnosi eziologica.

La **diagnosi clinica** viene sospettata in un bambino di età inferiore ad un anno (2 anni secondo linee guida AAP) con flogosi delle basse vie respiratorie caratterizzata da distress respiratorio (utilizzo dei muscoli accessori, rientramenti intercostali, sovra o sottocostali, grunting, alitamento delle pinne nasali) con tachipnea, eventuale desaturazione e con un reperto obiettivo di rantoli crepitanti e/o wheezing. Il sospetto è corroborato dalla presentazione clinica durante il periodo epidemico e/o in concomitanza con un quadro di flogosi delle alte vie respiratorie di un familiare.¹⁻³

La **diagnosi eziologica** non viene raccomandata nella routine clinica ma, soprattutto in ambito ospedaliero, può essere utile per ridurre il rischio di diffusione di infezioni nosocomiali attraverso il cohorting dei pazienti, nonché per le ricerche in ambito epidemiologico.

Per l'identificazione diagnostica virale ci si può avvalere delle seguenti metodiche:

1. Antigen detection (Immunofluorescence, Enzyme immunoassay). Si tratta dei cosiddetti “test rapidi”, la cui sensibilità arriva all'80-90%, con possibili falsi negativi in lattanti sotto i 3 mesi di vita. Possono essere eseguiti ambulatorialmente e rapidamente.
2. Genome detection (In situ hybridization, Polymerase chain reaction – PCR convenzionale o Real-Time). La PCR è l'esame gold standard nella diagnostica perché ha una sensibilità del 93-100% ed una specificità del 64-100%.

Le tecniche molecolari PCR sono più costose di quelle antigeniche ed attuabili esclusivamente in laboratorio, dunque quelle antigeniche sono di solito utilizzate di routine.²

Indagini laboratoristiche e strumentali

La valutazione laboratoristica e strumentale non è raccomandata di routine nel lattante affetto da bronchiolite. Infatti, gli esami ematici (emocromo con formula, indici di flogosi) risultano poco indicativi per escludere una possibile sovrainfezione batterica.¹⁻³

Tuttavia, i recenti risultati di uno studio prospettico monocentrico condotto su 675 lattanti con bronchiolite severa (ricoverati in TI) sono incoraggianti nel considerare la procalcitonina (PCT) un indice particolarmente sensibile e specifico nel discriminare i lattanti con Infezione Batterica Invasiva (IBI). Nella coorte analizzata, 181 lattanti (26.8%) hanno ricevuto diagnosi di IBI (sepsi, polmonite, infezione delle vie urinarie – IVU). Comparando i valori di PCT e PCR al momento del ricovero, a 24 ore, a 48 ore in questi pazienti, la PCT ha mostrato un'area sotto la curva (AUC) receiver-operator (ROC) significativamente più elevata rispetto alla PCR (con valori p da < 0.001 a 0.03) per la diagnosi sia di sepsi che di polmonite, dimostrandosi un eccellente predittore laboratoristico.²³

Altro pregio della PCT sembrerebbe essere quello di selezionare i casi di bronchiolite complicata da sovrainfezione batterica severa realmente necessitanti di antibiotico terapia. Infatti, lo stesso gruppo di ricerca spagnolo ha dimostrato, con uno studio osservazionale prospettico monocentrico coinvolgente 706 lattanti con bronchiolite ricoverati in TI, che l'adozione di un protocollo gestionale basato sull'analisi della PCT, avviato nel loro Centro nel 2014, porterebbe alla riduzione dell'antibiotico terapia. Confrontando la coorte dei 340 lattanti ricoverati in TI nel periodo 2010-2014 (prima dell'avvio del protocollo PCT-guidato) con quella dei 366 lattanti ricoverati successivamente (2015-2017), gli Autori hanno osservato una riduzione significativa del tasso di prescrizione di antibiotico terapia (88.2% vs 72.1%; p = 0.003) e della durata media della terapia stessa, quando avviata (8.65 ± 4.8 giorni vs 5.05 ± 3.18 giorni; p = 0.023).²⁴

Non sono ancora presenti in letteratura evidenze in merito all'utilizzo della PCT nel lattante affetto da bronchiolite di severità lieve o moderata, tale da non necessitare di ricovero in TI.

Il ricorso a indagini strumentali quali l'Rx torace non andrebbe effettuato di routine nel lattante con bronchiolite, ma riservato soltanto ai casi gravi (necessità di ricovero in TI) al fine di escludere la presenza di complicanze (es. pneumotorace) o di diagnosi alternative (es. cardiopatia sottostante).^{1,3} Ai classici reperti radiografici di iperinflazione terminale e di ispessimento peribronchiale, infatti, l'Rx torace può documentare la presenza di atelettasie, difficilmente distinguibili da polmonite, con conseguente rischio di sovradiagnosi di bronchiolite complicata da polmonite batterica e sovraprescrizione di antibiotico terapia.²⁵

L'ecografia polmonare si sta affermando come strumento valido, non invasivo, ben tollerato, non radiogeno, per valutare i lattanti con bronchiolite. Un recente studio prospettico monocentrico condotto dal nostro gruppo di ricerca su pazienti ospedalizzati in due stagioni epidemiche consecutive, per un totale di 87 lattanti, ha identificato una elevata capacità dell'ecografia polmonare nell'identificare i 25 casi di bronchiolite complicati da polmonite (sensibilità 100%, specificità 83.9%), sovrapponibile alla radiografia tradizionale (sensibilità 96%, specificità 87.1%), con una perfetta concordanza nei risultati ottenuti da ecografia polmonare effettuata da Pediatri e da Rx torace analizzata da Radiologi pediatri (K di Cohen calcolata sui primi 30 pazienti indagati in parallelo: K 0.93). Questi risultati permettono di suggerire l'uso della sola ecografia polmonare come metodica di imaging nel sospetto di bronchiolite complicata, in maniera da garantire protezione dalla radioesposizione del lattante.²⁶

L'indagine ecografica polmonare potrebbe rivelarsi uno strumento efficace anche per il monitoraggio evolutivo del lattante con bronchiolite, per predire la necessità di supporto respiratorio e di cure intensive. In un recente studio prospettico monocentrico italiano, infatti, è stata valutata la correlazione tra uno score ecografico polmonare costruito ad hoc (lung ultrasound –

LUS score) ed uno clinico in 92 lattanti ospedalizzati (63 per bronchiolite acuta, 29 per patologia non respiratoria, utilizzati come controllo). Dall'analisi dei risultati è emersa una correlazione positiva tra i due metodi di classificazione di severità clinica ($r = 0.62$; $p < 0.001$), ma anche tra un LUS score maggiore ed una più lunga durata di degenza ospedaliera ($r = 0.42$; $p < 0.001$), nonché la necessità di ossigenoterapia ($p < 0.001$).²⁷

Gestione terapeutica

Attualmente non esiste una terapia eziologica specifica per la bronchiolite e la strategia terapeutica effettuata è quella di supporto in caso di insufficienza respiratoria e difficoltà alimentari con disidratazione.

I presidi terapeutici di dimostrata efficacia in letteratura sono essenzialmente tre: l'aspirazione nasale, l'ossigenoterapia e l'idratazione.

Le linee guida nazionali ed internazionali raccomandano, soprattutto in caso di episodi di apnea, l'aspirazione superficiale delle prime vie aeree per migliorarne la pervietà e ridurre la difficoltà di alimentazione.^{1,2} L'aspirazione profonda delle vie aeree in corso di bronchiolite non è invece raccomandata, poiché è dimostrato che tale procedura possa associarsi ad un aumento della durata del ricovero.²⁸

Le linee guida nazionali ed internazionali suggeriscono la somministrazione di ossigeno supplementare qualora il lattante presenti valori di SatO_2 persistentemente inferiori a 90-92% in aria ambiente.¹⁻³

La supplementazione di ossigeno a bambini che non richiedano supporto ventilatorio può essere iniziata con nasocannule (flusso massimo 4 L/min) o cappa di Hood. L'ossigenoterapia può essere erogata direttamente dal sistema "a muro" o mediante blender: nel primo caso è difficile quantificare con precisione la frazione di ossigeno (FiO_2) erogata, in quanto inevitabilmente il paziente riceverà ossigeno miscelato in aria ambiente. L'erogazione mediante blender consente di somministrare una FiO_2 prestabilita (in genere dal 25% al 40%), sebbene anche in questo caso la FiO_2 effettiva sia inferiore di quella erogata per inevitabile miscela con aria ambiente.

In anni recenti l'ossigenoterapia ad alti flussi con ossigeno riscaldato e umidificato (High Flow Nasal Cannula, HFNC) si è affacciata come modalità di supporto respiratorio non invasivo. Il vantaggio di tale sistema consiste nel fatto che il flusso di gas erogato è superiore al picco di flusso inspiratorio del paziente, generando una pressione continua di apertura delle vie aeree (Continuous Positive Airways Pressure, CPAP) di circa 3-4 cm H_2O ed aiutando a ridurre il rischio di accumulo di CO_2 , e garantendo che la FiO_2 cui è sottoposto il paziente coincida con quella erogata e non risulti inficiata dalla miscela con aria ambiente.

Dopo un iniziale entusiasmo, le revisioni sistematiche degli studi più recenti hanno ridimensionato l'efficacia di tale tecnica di supporto respiratorio nel lattante con bronchiolite, e la Cochrane review del 2014 ha concluso per un'insufficienza di evidenze per stabilire se l'HFNC fosse tecnica sicura e più efficace nella gestione della bronchiolite.²⁹

Tuttavia, numerosi trial sono stati condotti in anni più recenti e l'efficacia dell'ossigenoterapia HFNC è tornata alla ribalta in una recentissima revisione sistematica, che ha analizzato i dati di 15 clinical trials, per un totale di più di 3400 pazienti. Dall'analisi dei dati aggregati di 4 studi confrontanti HFNC rispetto a ossigenoterapia standard emerge infatti una riduzione del fallimento terapeutico, inteso come necessità di passaggio a ventilazione non invasiva o invasiva, (OR 0.44; intervallo di confidenza – IC 95% 0.35–0.55; $p < 0.001$). Paragonata all'ossigenoterapia standard, l'HFNC sembra essere associata anche ad una riduzione nella durata di ossigenoterapia nel lattante con bronchiolite, come evidenziato dall'analisi dei dati aggregati di 6 studi (differenza media -0.08 giorni; IC95% -0.11 – -0.04; $p < 0.001$). Analogamente si evidenzia una degenza significativamente ridotta nei lattanti sottoposti a HFNC (diff. media -0.17 giorni; IC 95% 0.33 – -0.01; $p < 0.001$).

Non vi è invece differenza significativa nel gruppo sottoposto a ossigenoterapia HFNC rispetto a ossigenoterapia standard per quanto riguarda gli effetti avversi ($p = 0.45$).

Nella stessa revisione sono stati presi in considerazione gli studi confrontanti l'ossigenoterapia HFNC con la CPAP. Non emerge differenza dai dati aggregati ricavati da 4 studi in merito al fallimento terapeutico ($p = 0.07$), mentre in termini di effetti avversi l'ossigenoterapia HFNC ha dimostrato un minor rischio di trauma nasale rispetto alla CPAP (OR 0.20; IC 95% 0.06–0.63; $p = 0.006$). Va tuttavia precisato che gli studi analizzati relativi al confronto tra HFNC e CPAP sono caratterizzati da campioni di popolazione poco numerosi.³⁰

Per quanto riguarda l'utilizzo della CPAP nella bronchiolite acuta, è di quest'anno la più recente versione della Cochrane review in merito, edita per la prima volta nel 2015 e già rivista nel 2019. Il documento include i risultati di 3 RCT monocentrici (Regno Unito, Francia, India) per un totale di 122 lattanti, un gruppo dei quali di volta in volta sottoposto a nasal CPAP (nCPAP) o bubble CPAP vs terapia standard comprensiva di ossigenoterapia a bassi flussi con nasocannule, mascherina, oppure erogata tramite cappa di Hood. Purtroppo, le evidenze riscontrate sull'uso della CPAP nella bronchiolite acuta sono inficiate da bias relativi alle dimensioni dei campioni di popolazione e risultano di qualità bassa. Con tali limiti, si può affermare che l'uso della CPAP non riduce il rischio di dover passare a supporto ventilatorio invasivo (differenza di rischio -0.01; IC 95% -0.09 – 0.08), ma che, quando efficace, la CPAP determina miglioramento clinico, come ad esempio una riduzione della FR (differenza media -3.81 apm; IC 95% -5.78 – -1.84). Relativamente agli effetti avversi della CPAP, un solo studio li ha analizzati, non riportando casi di lesioni a livello del volto, pneumotorace, shock. Nessun altro risultato è analizzabile nella review e gli Autori invocano nuovi RCT con potenza e dimensione di campione maggiori per arrivare a dati da cui ricavare evidenze di qualità soddisfacente.³¹

I lattanti con bronchiolite possono presentare difficoltà alimentari, soprattutto se le secrezioni nasali sono abbondanti. I pazienti con difficoltà respiratoria presentano inoltre un aumentato rischio di inalazione, pertanto dovrebbero ricevere liquidi per via endovenosa (con volume di fluidi giornalieri somministrati pari ai 2/3 della quota di mantenimento nelle prime 24 ore).

La quota di mantenimento di fluidi da somministrare per idratazione e.v. può essere calcolata mediante la formula di Holliday e Segar e prevede la somministrazione di:

- 100 mL/Kg/die = 4 mL/Kg/h (per peso del paziente fino a 10 Kg) +
- 50 mL/Kg/die = 2 mL/Kg/h (per peso del paziente 11-20 Kg) +
- 20 mL/Kg/die = 1 mL/Kg/h (per peso del paziente > 20 Kg).

La fluidoterapia può essere somministrata anche per via enterale previo posizionamento di sondino nasogastrico (SNG).

In una recente Cochrane review (2021) le due metodiche di idratazione (enterale via SNG e parenterale ev) sono state comparate. La revisione ha potuto includere 2 RCT, il primo dei quali, multicentrico condotto in Australia e Nuova Zelanda, basato su un campione numeroso e a basso rischio di bias (759 lattanti, 381 randomizzati per idratazione enterale all'80% del mantenimento con boli di soluzione reidratante ogni 1-2 ore via SNG, 378 per idratazione ev continua a base di emifisiologica con aggiunta di glucosio al 2.5%, 4%, 5% a seconda dei casi). Dall'analisi dei 2 studi nell'insieme (campione totale di 810 lattanti) non emergono differenze significative tra le due metodiche di idratazione per quanto riguarda outcome come la durata di degenza, la guarigione clinica dalla bronchiolite ed il ritorno ad un'alimentazione orale valida. Con livello di evidenza moderato, tuttavia, l'idratazione enterale via SNG si è rivelata efficace al primo tentativo (risk ratio – RR 1.52; IC 95% 1.36 – 1.69), con un effetto protettivo sulla necessità di cambiare modalità di idratazione (RR 0.52; IC 95% 0.38 – 0.71), sulla necessità di trasferimento in TI (RR 0.83; IC 95% 0.47 – 1.46), sul rischio di riospedalizzazione per evento bronchiolite dopo la dimissione (RR 0.81; IC 95% 0.33 – 2.04). Anche in questo caso gli Autori concludono per la necessità di ulteriori RCT multicentrici per studiare ampi campioni di popolazione per poter trarre conclusioni basate su solide evidenze.³²

Trova ampio dibattito in letteratura l'uso di presidi farmacologici (somministrati per via inalatoria come la soluzione fisiologica o ipertonica, i broncodilatatori, la desossiribonucleasi, oppure per via endotracheale come il surfattante esogeno) la cui **efficacia è sostanzialmente dubbia** nella bronchiolite.

La terapia inalatoria con soluzione fisiologica (NaCl 0.9%) o ipertonica (NaCl 3%) è ubiquitariamente diffusa e, sebbene inizialmente l'utilizzo dell'ipertonica abbia acceso un grande entusiasmo, i risultati di molti RCT sono stati contrastanti in merito ad una reale efficacia o superiorità rispetto ad altri trattamenti. Il rationale della terapia inalatoria con soluzione ipertonica è basato sul fatto che quest'ultima riduce l'edema delle vie aeree e la viscosità delle secrezioni, migliorando la clearance ciliare e favorendo pertanto una più rapida ripresa.

I dati più solidi relativi alla terapia inalatoria con soluzione ipertonica nella bronchiolite sono riassunti nella più recente versione dell'apposita Cochrane review (2017). Questa revisione è arrivata ad includere 28 trial, per un totale di 4195 lattanti, di cui 2222 sottoposti a terapia inalatoria con soluzione ipertonica (da sola o associata a broncodilatatore), i rimanenti sottoposti invece a terapia inalatoria con soluzione fisiologica (da sola o associata a broncodilatatore). Il primo gruppo ha mostrato una durata media di degenza minore (di circa 10 ore) rispetto al gruppo trattato con soluzione fisiologica, differenza tuttavia inficiata da una bassa qualità di evidenza a causa di elevati livelli di eterogeneità statistica ($I^2=79%$) e di rischio di bias nei trial considerati. Analoghi risultati emergono a favore della soluzione ipertonica confrontata con la fisiologica quando si considera il miglioramento clinico dopo uno, due, tre giorni di trattamento. Tuttavia, la qualità dell'evidenza risulta bassa a causa dell'ampia eterogeneità di score clinici utilizzati per valutare il miglioramento. Più solida (moderata) è invece la qualità dell'evidenza relativa alla riduzione del rischio di ospedalizzazione (14%) nei lattanti valutati in ambulatorio o in PS e trattati con soluzione ipertonica rispetto a fisiologica (RR 0.86; IC 95% 0.76 – 0.98; $p = 0.02$). L'utilizzo della soluzione ipertonica si è rivelato sicuro e sostanzialmente privo di effetti avversi (alterazioni FC, alterazioni PA, desaturazione, pallore, tremore, nausea, vomito, diarrea, ritenzione urinaria acuta) presentando talvolta eventi, ma di entità lieve e di natura transitoria. La qualità delle evidenze ottenute finora rimane, secondo gli Autori, insufficiente per supportare un uso routinario della soluzione ipertonica nella gestione della bronchiolite.³³

Ad analoghi risultati (ridotta ospedalizzazione con l'utilizzo ambulatoriale/domiciliare di soluzione ipertonica inalatoria, ridotta durata di degenza ospedaliera) sono giunte le più recenti meta-analisi di RCT disponibili in letteratura (2020 e 2021), ma sempre con bassa qualità dell'evidenza riscontrata ed ampia eterogeneità degli studi analizzati.^{34,35}

L'efficacia è dubbia anche riguardo la terapia inalatoria con broncodilatatore. La più recente Cochrane review in merito (2014) ha analizzato 30 trials (per un totale di 1992 lattanti con bronchiolite), evidenziando come l'utilizzo di agenti broncodilatatori (albuterolo, salbutamolo), confrontato con placebo, non abbia determinato miglioramento in termini di SatO₂ (differenza media -0.43%; IC 95% -0.92 – 0.06), di tasso di ricovero ospedaliero (11.9% nei pazienti trattati fuori dall'ambito ospedaliero vs 15.9% placebo; OR 0.75; IC 95% 0.46 – 1.21), né in termini di riduzione della durata di ricovero (differenza media di durata di degenza -0.06 giorni; IC 95% -0.27 – 0.39).³⁶ Anche metanalisi più recenti (2020) sono giunte ad analoghe conclusioni.³⁷ Le linee guida internazionali si sono conseguentemente espresse contro l'utilizzo dei beta2-agonisti per via inalatoria in corso di bronchiolite.^{1,3}

A livello nazionale è invece ancora previsto un tentativo terapeutico con salbutamolo per aerosol, in particolare nei bambini con familiarità per atopia e asma, da proseguire in caso di valida risoluzione della componente sibilante auscultatoria, da sospendere invece in caso di mancato miglioramento.² Va tuttavia precisato che dal 2014 AIFA ha limitato l'uso di Broncovaleas® 5 mg/ml soluzione da

nebulizzare ai soggetti di età superiore ai 2 anni, escludendo quindi la fascia d'età colpita da bronchiolite e rendendone l'utilizzo in questo contesto off label.³⁸

Anche l'utilizzo dell'adrenalina nebulizzata rimane controverso nel lattante con bronchiolite. Infatti, la più estesa, sebbene datata, Cochrane review (2011) ha analizzato i 19 studi disponibili sull'uso dell'adrenalina nebulizzata nella bronchiolite (per un totale di 2256 pazienti, parte dei quali sottoposti a terapia inalatoria con adrenalina, gli altri a placebo), evidenziando che l'adrenalina può essere efficace nel ridurre la necessità di ospedalizzazione nei bambini che accedono al pronto soccorso (RR 0.67; IC 95% 0.50 – 0.89), ma che la stessa non è risultata efficace come trattamento nei pazienti già ricoverati nel ridurre la durata dell'ospedalizzazione.³⁹

La più recente metanalisi disponibile in letteratura (2021) ha confermato le evidenze in merito all'efficacia dell'adrenalina nel ridurre la necessità di ricovero (OR 0.64; IC 95% 0.44 – 0.93) se utilizzata all'esordio dei sintomi. A differenza della Cochrane review, inoltre, dalla metanalisi dei trial più recenti emerge che l'utilizzo di terapia inalatoria con adrenalina e soluzione ipertonica riduce la durata di degenza nei pazienti ricoverati rispetto a nebulizzazione di sola adrenalina, salbutamolo o placebo (differenza media di degenza -0.91 giorni, IC 95% -1.14 – -0.40). La qualità dell'evidenza di questi risultati è tuttavia molto bassa a causa dell'eterogeneità degli studi inclusi.³⁵ Sebbene quindi sia provata l'efficacia dell'adrenalina nebulizzata nel ridurre la necessità di ricovero nei lattanti con bronchiolite alla prima valutazione medica, le linee guida nazionali ed internazionali raccomandano di non somministrare questo farmaco.¹⁻³

Appartengono ad un RCT multicentrico che ha arruolato 800 lattanti di età 6 settimane-1 anno i risultati relativi alla somministrazione combinata di adrenalina per via inalatoria (2 somministrazioni a distanza di 30 minuti) e desametasone per via orale (1 mg/kg in dose unica, seguito da 0.6 mg/kg una volta al giorno per altri 5 giorni), con riduzione del rischio di ospedalizzazione durante i primi 7 giorni di malattia (RR 0.65; IC 95% 0.45 – 0.95; p = 0.02), suggerendo un effetto sinergico dei due farmaci, anche se la significatività statistica è risultata venire meno dopo analisi multivariata ed il number needed to treat (NNT) è risultato alto (11; IC 95% 7–76, ovvero 11 pazienti da trattare per evitare un ricovero).⁴⁰

Alla luce di questi dati, la versione più recente delle linee guida NICE (2021), nello sconsigliare l'uso di glucocorticoidi nella bronchiolite ammette che i dati emersi dal RCT del 2009 rendono meritevole considerare adrenalina e desametasone, ma invoca nuovi trial a riguardo.¹

La somministrazione di surfattante esogeno troverebbe un suo razionale nel lattante con bronchiolite severa ricoverato in TI. Infatti, anomalie qualitative o quantitative di surfattante endogeno potrebbero essere alla base della severità clinica della bronchiolite. La Cochrane review del 2015 ha sintetizzato le evidenze emerse da 3 RCT, per un totale di 79 lattanti con bronchiolite. Tutti i trial sono stati considerati a basso rischio di bias, ma escludendo dall'analisi uno dei tre (20 pazienti) fortemente incidente sull'eterogeneità dei dati, è emerso con livello moderato di evidenza che la terapia con surfattante (50-100 mg/Kg in 2-3 dosi variamente distribuite in un arco di tempo di 24 ore) comparata con nessun trattamento esogeno o con sola ossigenoterapia è risultata associata a riduzione della durata media di ventilazione invasiva (differenza media -28.99 ore; IC 95% -40.10 – -17.87) e di durata di degenza in TI (differenza media -1.81 giorni, IC 95% -2.42 – -1.19). Seppure di qualità moderata, le evidenze sono state estrapolate da studi con campioni di popolazioni troppo ridotti per poter trarre conclusioni influenti sulla pratica clinica.⁴¹

Per ovviare a questo limite e ottenere dati da un campione di popolazione maggiore, nel 2019 è stato elaborato un RCT multicentrico a livello nazionale (SURFABRON, registrazione ClinicalTrials.gov: NCT03959384) con l'obiettivo di valutare l'efficacia di Curosurf 25 mg/Kg in lattanti con bronchiolite severa ricoverati in TI. Purtroppo, l'arruolamento è stato interrotto da Febbraio 2020 a causa dello stravolgimento epidemiologico causato dal COVID-19.^{42,43}

Conclusioni analoghe al surfattante si possono trarre riguardo all'utilizzo di desossiribonucleasi umana ricombinante (rhDNasi). Le secrezioni dei lattanti affetti da bronchiolite sono ricche di DNA, che sembrerebbe favorire la formazione di veri e propri tappi e peggiorare l'ostruzione delle vie aeree. Il razionale dell'uso di rhDNasi nebulizzata consisterebbe nel suo effetto mucolitico, con riduzione della viscosità delle secrezioni e miglioramento della clearance mucociliare e della clinica della bronchiolite. Le evidenze sintetizzate dalla Cochrane review (2012) a riguardo hanno incluso i dati provenienti da tre RCT, per un totale di 333 pazienti affetti da bronchiolite, in cui l'intervento è consistito nella somministrazione di 2.5 mL di rhDNasi nebulizzata (1 mg/mL) una o due volte al giorno, confrontato con placebo. I risultati emersi sono stati a favore del placebo: infatti, il gruppo controllo ha presentato una ridotta durata di degenza ospedaliera (differenza media -0.50 giorni; IC 95% -0.10 – -0.90, p = 0.01) ed un miglioramento di punteggio degli score clinici utilizzati per la valutazione della severità (differenza media -0.24 punti; IC 95% -0.50 – 0.01, p = 0.06). La rhDNasi nebulizzata sembra quindi essere controproducente nel paziente ospedalizzato per bronchiolite. La stessa revisione sottolinea però i dati relativi ad un sottogruppo di pazienti del gruppo intervento con atelettasia (bronchiolite severa) in cui la rhDNasi nebulizzata ha documentato una rapida risoluzione dell'atelettasia all'Rx torace e potrebbe favorire il miglioramento clinico. Questa categoria di pazienti (bronchiolite severa con atelettasia documentata radiologicamente) potrebbe essere l'unica a beneficiare del trattamento con rhDNasi nebulizzata.^{44,45}

Vi sono infine alcuni presidi (terapia inalatoria o sistemica con corticosteroidi, ad eccezione del desametasone riportato sopra, o con magnesio solfato, o con elio, somministrazione di anti-leucotrienici, di antibiotici, di antivirali, la fisioterapia respiratoria) la cui **inefficacia** è stata provata nel corso del tempo in letteratura e sono pertanto da abbandonare nella pratica clinica della bronchiolite acuta.

Né la terapia inalatoria con corticosteroidi, né la somministrazione di steroidi per via sistemica (orale o parenterale) si sono dimostrati efficaci nel lattante con bronchiolite acuta. La versione più recente della Cochrane review a riguardo è del 2013 e ha preso in considerazione 17 trials, per un totale di 2596 pazienti. Dalla revisione è emerso che i corticosteroidi (inalatori o sistemici), comparati con placebo, non hanno efficacia nel ridurre l'incidenza di ospedalizzazione (RR 0.92; IC 95% 0.78 – 1.08), né la sua durata (differenza media -0.18 giorni; IC 95% -0.39 – 0.04).⁴⁶ Le linee guida nazionali ed internazionali raccomandano conseguentemente di non somministrare glucocorticoidi nei neonati e lattanti con bronchiolite, sebbene la versione più recente NICE (2021) ammetta che i dati emersi dal RCT del 2009 rendono meritevole considerare adrenalina e desametasone, ma invocano nuovi trial a riguardo.¹

Nemmeno il magnesio solfato, farmaco somministrabile sia per via inalatoria, che endovenosa, ed attualmente raccomandato per la gestione dello stato asmatico in età pediatrica grazie alla capacità di rilascio della muscolatura bronchiale, al momento non trova indicazione pratica per la bronchiolite. Nel 2020 è stata pubblicata la prima Cochrane review riassuntiva delle evidenze di RCT (4 in tutto, per un campione totale di 564 lattanti con bronchiolite) in cui l'utilizzo del magnesio solfato (inalatorio al dosaggio di 40 mg/kg fino a 150 mg/dose; ev al dosaggio di 25-100 mg/kg/dose, max 2 g), da solo o associato ad adrenalina, è stato variabilmente comparato a placebo, salbutamolo, adrenalina. Le evidenze a riguardo di qualunque outcome considerato (durata di degenza, severità clinica misurata attraverso score in 1° e 2° giornata di ricovero, necessità di TI, mortalità, effetti avversi, riospedalizzazione entro 30 giorni dalla dimissione) sono risultate tutte di scarsa qualità ed insufficienti per stabilire efficacia e sicurezza di tale agente nella bronchiolite acuta, richiamando alla necessità di ulteriori studi di qualità metodologica migliore in questo ambito.⁴⁷

La mancata superiorità del magnesio solfato rispetto allo standard of care è stata ribadita ancora più recentemente da un ulteriore RCT condotto in India su 60 lattanti affetti da bronchiolite moderato-

severa randomizzati in due gruppi, il primo dei quali ha ricevuto aerosol con 3 mL di magnesio solfato al 3.2% ogni 4 ore per 24 ore, mentre il gruppo controllo solo cure standard of care.⁴⁸

Considerando che il pathway dei leucotrieni sembra essere coinvolto nella genesi infiammatoria alla base della bronchiolite e nella riduzione dell'ingresso aereo nel paziente per la broncocostrizione scatenata anche da questi composti lipidici, l'utilizzo di farmaci anti-leucotrienici (montelukast, zafirlukast, pranlukast) potrebbe avere un razionale per contrastare i sintomi in acuto. Negli anni sono stati condotti, e con successo, studi che hanno utilizzato i farmaci anti-leucotrienici nell'asma. Più recentemente ne sono stati condotti alcuni sull'utilizzo di questi farmaci nella bronchiolite. Le principali evidenze sono state riassunte nel 2015 da un'apposita Cochrane review, e sono relative a 5 RCT (per un totale di 1296 bambini < 2 anni con bronchiolite) che hanno utilizzato come intervento montelukast 4 mg in acuto o nelle settimane successive all'episodio acuto per prevenire le complicanze post-bronchiolite. Le evidenze (mancata significatività nella riduzione dell'ospedalizzazione e miglioramento clinico) sono risultate inficciate dall'elevata eterogeneità di questi studi e non è stato possibile giungere ad alcuna conclusione significativa in merito ad un'efficacia di questi farmaci. Allo stato attuale, ed in assenza di nuovi studi, non è quindi possibile prendere in considerazione questi farmaci per un utilizzo pratico nella bronchiolite.⁴⁹

Nemmeno l'elio deve essere utilizzato nella bronchiolite. Noto per la proprietà di ridurre le resistenze delle vie aeree ed il distress respiratorio, come evidenziato da alcuni RCT prospettici, in sede di revisione Cochrane (2015) non ha presentato riduzione del rischio di intubazione e passaggio a ventilazione invasiva nei pazienti con bronchiolite ricoverati in TI, né riduzione dell'ospedalizzazione in Pronto Soccorso, né riduzione della durata di trattamento nei pazienti ricoverati. L'unico dato di rilievo emerso è stata una riduzione di punteggio alla valutazione del distress respiratorio con Wood Clinical Asthma Score modificato (m-WCAS) ad 1 ora dal trattamento, differenzialmente dai pazienti trattati con ossigenoterapia (differenza media -1.04; IC 95% -1.60 – -0.48).⁵⁰

È di quest'anno una nuova revisione sistematica basata sui dati di 6 RCT, per un totale di 560 lattanti con bronchiolite, e che ha dimostrato che la terapia inalatoria con elio (miscele erogate con elio al 70-79% e O₂ al 21-30%) non ha impatto significativo sulla riduzione della necessità di CPAP o ventilazione invasiva, né sulla durata di ospedalizzazione, confermandosi unicamente il dato di riduzione di score m-WCAS, ma con bassa qualità di evidenza. In conclusione, per gli Autori la terapia inalatoria con elio non dovrebbe essere utilizzata al di fuori di RCT in quanto priva di impatto su intensità di cure e durata di degenza.⁵¹

Anche l'utilizzo di antibiotici non trova raccomandazione nelle linee guida nazionali ed internazionali. Infatti, dalla versione del 2014 della Cochrane review a riguardo (7 trials per un totale di 824 lattanti) non emerge alcuna differenza significativa tra i pazienti sottoposti a terapia antibiotica (ampicillina, azitromicina, claritromicina, eritromicina a seconda del trial) confrontati con placebo in termini di riduzione della durata dell'ossigenoterapia, della degenza ospedaliera, di ri-ospedalizzazione.⁵² Conseguentemente, le linee guida raccomandano contro l'uso abituale degli antibiotici in caso di bronchiolite per il rischio di effetti collaterali, gli alti costi ed il possibile sviluppo di antibiotico-resistenze. Tale utilizzo andrebbe contemplato nei casi di bronchiolite con co-infezione batterica, documentata attraverso indici di flogosi ed eventuali indagini colturali o molecolari o nei bambini ricoverati in TI.¹⁻³

Anche l'uso della ribavirina non è raccomandato dalle linee guida correnti sulla bronchiolite,¹⁻³ sebbene si tratti dell'unico trattamento attualmente approvato dalla Food and Drug Administration (FDA) come antivirale contro il VRS. Si tratta infatti di un farmaco gravato da effetti avversi (anemia, aritmie, dolore toracico), nonché da rischio biologico derivante dal suo impiego da parte degli operatori sanitari. Attualmente sono in corso studi in fase preclinica e clinica su nuovi farmaci

antivirali per la terapia dell'infezione da VRS. Tra questi vi sono ALN-RSV01 (farmaco a base di uno small interfering RNA -siRNA- capace di inibire la replicazione virale), Presatovir (GS-5806), JNJ-53,718,678 e sisunatovir o RV521 (molecole capaci di inibire la fusione del virus con le cellule ospiti mediante azione sulla proteina virale F), EDP-983 (che ha invece come target la proteina virale N) e la lumicitabina o ALS-008176 (che ha invece come target la proteina virale L).⁵³

Infine, nemmeno la fisioterapia respiratoria sembra avere efficacia nel paziente con bronchiolite. La più recente revisione sistematica pubblicata sul database Cochrane nel 2016 ha analizzato 12 RCT (per un totale di 1249 partecipanti), confrontando la fisioterapia con nessun intervento, ed evidenziando come nessuna delle tecniche di fisioterapia respiratoria (tecniche espiratorie convenzionali, passive lente o espiratorie forzate) abbia portato ad una riduzione della severità clinica della bronchiolite. La revisione ha permesso di documentare, con livelli di evidenza elevati, che la fisioterapia respiratoria non può essere impiegata nella normale pratica clinica per i pazienti ospedalizzati con bronchiolite grave e che addirittura le tecniche di espirazione forzata in pazienti con bronchiolite severa non migliorano il loro stato di salute e possono portare a gravi eventi avversi.⁵⁴ I risultati di trial più recenti non sono considerati attendibili perché inficiati da errori metodologici.⁵⁵

1.2 Virus Respiratorio Sinciziale (VRS)

Microbiologia

Il VRS appartiene alla famiglia Pneumoviridae, precedentemente nota come sottofamiglia dei Paramyxoviridae, ma riclassificata nel 2016 come famiglia a sé stante e suddivisa in due generi: Orthopneumovirus (cui appartiene il VRS umano) e Metapneumovirus.⁵⁶

Il VRS è un virus a RNA a singolo filamento negativo il cui genoma è costituito da dieci geni che codificano undici proteine. Il virione possiede un involucro lipidico costituito da quattro elementi: la proteina di matrice M (matrix), la SH (small hydrophobic) e due proteine di superficie glicosilate, denominate F (fusion) e G (attachment glycoprotein). Queste ultime rivestono un ruolo chiave per lo sviluppo di infezione. La proteina G garantisce l'adesione del virione alle cellule dell'epitelio respiratorio dell'ospite, la proteina F, invece, è coinvolta nell'ingresso del virus nelle cellule e nella successiva inserzione del genoma virale, da cui consegue lo sviluppo dei caratteristici "sincizi" cellulari.⁵⁶

La variabilità della proteina G è all'origine della differenziazione del VRS umano in due ceppi (A e B), a loro volta suddivisibili in numerosi genotipi (finora identificati da GA1 a GA7, NA1, NA2, SAA1 e ON1 per il gruppo A; da GB1 a GB4, da SAB1 a SAB4, da BA1 a BA12, URU1, URU2 e THB per il gruppo B). Una così ampia eterogeneità fa sì che ciascun genotipo circoli per un periodo limitato di tempo e venga rapidamente rimpiazzato da un altro, ma complessivamente si verificano frequenti infezioni e reinfezioni all'interno di una comunità.⁵⁷

Come già detto, il VRS rappresenta il principale patogeno della bronchiolite acuta nel lattante.²⁻³ Ne consegue che, interrogandosi sugli elementi che determinano la severità clinica della bronchiolite acuta, molti studi si sono concentrati non soltanto sulle caratteristiche dell'ospite (vedere Tabella 1: Fattori di rischio per lo sviluppo di bronchiolite acuta severa), ma anche sulle caratteristiche del patogeno scatenante la malattia, in primis proprio il VRS.

1.2.1 Correlazione carica virale e severità del decorso clinico della bronchiolite

Uno dei principali elementi di studio a riguardo della correlazione tra caratteristiche del patogeno VRS e decorso clinico della bronchiolite è, da decenni, il quantitativo virale e la sua relazione con la severità clinica. Relativamente a questa tematica sono stati pubblicati numerosi studi, alcuni i cui dati sembrano essere a favore di una correlazione diretta, come potrebbe essere anche intuitivamente comprensibile; altri invece con dati a favore di una correlazione inversa, in apparente controtendenza; altri ancora, infine, che hanno dimostrato l'assenza di una correlazione tra carica virale e severità clinica. Risultati così differenti sono influenzati dalle diverse dimensioni e caratteristiche (criteri di inclusione e di esclusione) della popolazione di studio considerata di volta in volta, nonché dalle modalità di quantificazione della carica di VRS e dalle variabili selezionate come outcome clinici e misuratori della severità della bronchiolite.

Il primo lavoro relativo al quantitativo del VRS e alla severità clinica risale al 1976 e consiste nell'analisi di titoli colturali di VRS ottenuti da lavaggi nasali di bambini ricoverati per patologia respiratoria acuta durante due mesi di stagione epidemica VRS nell'inverno del 1975 negli Stati Uniti. Sebbene l'età dei 59 bambini arruolati sia abbastanza variabile e compresa tra i 10 giorni ed i 4 anni, l'analisi del quantitativo virale da lavaggio nasale viene condotta su un sottogruppo di 19 lattanti di età inferiore agli 11 mesi. Mentre il campione totale è costituito anche da bambini ospedalizzati con infezione soltanto a carico delle alte vie aeree, il sottogruppo considerato al fine dell'analisi del quantitativo di VRS è invece costituito unicamente da pazienti con interessamento polmonare all'Rx torace (17 con polmonite, 5 dei quali con presenza di addensamenti alla radiografia, 2 con evidenza di sola bronchiolite).

Punto di forza dello studio è l'analisi ripetuta pressoché quotidianamente di VRS su coltura ottenuta da lavaggio nasale in questi pazienti, punto di debolezza l'assenza di criteri di esclusione. Infatti, il 49% dei pazienti incluso nello studio risulta affetto da patologia cronica cardiopolmonare o neurologica sottostante, con possibili ripercussioni sulla clinica.

Il quantitativo del VRS in questo lavoro viene espresso come scala logaritmica della Tissue Culture Infective Dose (\log_{10} TCID₅₀/mL), una misura che esprime la quantità di virus necessaria a determinare effetto citopatico nel 50% delle cellule infettate. I risultati ottenuti tra il quantitativo virale e gli outcome utilizzati come misura di severità clinica sono solo parzialmente a favore di una correlazione diretta tra carica virale e severità del decorso. Infatti, dal lavoro emerge una correlazione significativa tra elevato quantitativo virale e presenza di addensamenti polmonari all'Rx torace rispetto all'assenza di questi ultimi (media 4.90 \log_{10} TCID₅₀/mL nel gruppo dei 5 pazienti con presenza di addensamenti radiografici vs 4.12 \log_{10} TCID₅₀/mL dei rimanenti 14 senza addensamenti, $p < 0.025$). Tuttavia, manca una correlazione significativa tra l'aumentato quantitativo colturale di VRS ed altri outcome considerati come la presenza o assenza di ipossia (intesa come documentata $pO_2 \leq 60$ mmHg) e soprattutto l'aumento di durata di ospedalizzazione. Per quest'ultimo outcome non emerge una correlazione nemmeno tra aumentata durata di ricovero e prolungata presenza di VRS alle colture ottenute per un ulteriore sottogruppo di 23 pazienti (sovrapposto al precedente sottogruppo di 19 per soli 10 pazienti) sottoposti a lavaggi nasali ad intervalli periodici anche dopo la dimissione, fino a negativizzazione del titolo colturale.⁵⁸

Bisogna aspettare l'anno 2000 perché un nuovo lavoro in merito a carica del VRS e severità clinica venga pubblicato, questa volta dal Dr. Buckingham e Colleghi. Questo studio prospettico vede coinvolti 39 bambini < 2 anni ricoverati per infezione da VRS microbiologicamente comprovata (con test antigenico o con colturale da aspirato nasale). Punto di forza dello studio è la scelta degli Autori, per meglio caratterizzare la relazione tra VRS e severità clinica, di adottare criteri di esclusione dalla popolazione di studio quali patologie cardiopolmonari croniche o immunodeficit noti sottostanti, ma anche la pregressa somministrazione di immunoglobuline anti-VRS o la somministrazione di antivirali (Ribavirina) durante il ricovero. Popolazione di studio è quindi un

gruppo di 39 bambini, classificati come portatori di “patologia severa” se sottoposti a ventilazione meccanica durante il ricovero per insufficienza respiratoria acuta da infezione da VRS (15 bambini), viceversa facenti parti del sottogruppo “patologia non severa” se non sottoposti a ventilazione meccanica (24 bambini). L’outcome di severità clinica considerato è quindi insito nella categoria in cui i pazienti vengono stratificati.

A differenza del lavoro precedente, il titolo colturale di VRS, ottenuto in questo studio soltanto all’arruolamento, viene espresso come unità formanti placche (plaque forming units, pfu/mL), ovvero come quantitativo di virioni necessario per produrre una placca di lisi all’interno della cellula ospite.

All’analisi di modello lineare, i risultati di questo studio sembrano riscontrare una relazione diretta tra la titolazione virale e la severità clinica: la prima infatti risulta significativamente più elevata nel gruppo di pazienti con patologia severa rispetto ai restanti (valori medi $5.06 \pm 0.34 \log_{10}$ pfu/mL vs $3.91 \pm 0.35 \log_{10}$ pfu/mL, $p = 0.022$).⁵⁹

Nel 2002 Wright e Colleghi raccolgono prospettivamente dati relativi a 77 bambini < 2 anni ricoverati per infezione da VRS, accertata con ricerca antigenica, a carico delle basse vie aeree (criterio che viene fatto coincidere dagli Autori con la bronchiolite). Questi pazienti erano già stati reclutati in due trial terapeutici multicentrici randomizzati in doppio-cieco e placebo-controllati aventi come farmaco di studio immunoglobuline anti-VRS. Ne consegue che più di metà (44 bambini) della popolazione di studio derivata è costituita da bambini meritevoli di trattamento con anticorpi anti-VRS per la presenza di fattori di rischio di infezione severa (cardiopatía congenita emodinamicamente significativa, broncodisplasia polmonare, prematurità con nascita < 32 settimane), mentre solo i restanti 33 pazienti arruolati sono sani. Tra i criteri di esclusione adottati nello studio figurano la presenza di altre patologie croniche sottostanti (fibrosi cistica, wheezing o asma, immunodeficit, insufficienza renale) e la somministrazione di alcuni farmaci (immunoglobuline generiche nei 2 mesi precedenti l’arruolamento o di Ribavirina durante il ricovero).

La quantificazione del VRS in questo studio viene condotta su liquido ottenuto da lavaggio nasale o endotracheale e, analogamente al lavoro di Buckingham, espressa come log pfu/mL. I campioni biologici sono collezionati in questo lavoro non solo all’arruolamento, ma anche a distanza di 24 ore e di 8 settimane da quest’ultimo. Tale studio ha il pregio di voler analizzare numerosi outcome per definire la severità clinica, in primis uno score (va però precisato che quest’ultimo non viene descritto nel lavoro e quindi non si possono trarre considerazioni in merito), ma anche la durata in giorni di ossigenoterapia, di supporto ventilatorio, di ricovero. Tuttavia, gli Autori ricercano l’eventuale correlazione con elevata titolazione virale soltanto per quanto riguarda lo score clinico, evidenziando peraltro l’assenza di una relazione significativa, così come non emerge all’analisi seriata dei campioni biologici una correlazione tra più rapido decadimento del quantitativo virale e miglior outcome clinico (non meglio specificando quale outcome clinico).⁶⁰

Nel 2005 DeVincenzo e Colleghi conducono uno studio prospettico osservazionale specificatamente volto ad indagare la relazione tra i già noti fattori di rischio per infezione severa da VRS propri del paziente (es. età, prematurità, presenza di anomalie congenite) e i fattori propri del virus (in primis il quantitativo di VRS) e la severità clinica. Arruolano pertanto 141 bambini < 2 anni sani ricoverati per infezione da VRS (senza ulteriori precisazioni in merito alla localizzazione clinica dell’infezione), escludendo tutte le patologie sottostanti precedentemente considerate, ma anche l’aver ricevuto terapia corticosteroidica nell’ultimo mese o con Ribavirina durante il ricovero. La quantificazione del VRS da aspirato faringonasale ottenuto all’arruolamento è ancora una volta espressa come log pfu/mL. Gli outcome utilizzati come misura della severità clinica sono la durata di ricovero, la necessità di ricovero in Terapia Intensiva Pediatrica (TIP), la presenza di insufficienza respiratoria (intesa come necessità di ventilazione meccanica) durante il ricovero.

Concentrando l'attenzione sui fattori di rischio legati al virus, se già all'analisi univariata viene osservata una relazione tra elevata carica virale e ciascuno degli outcome precedentemente esposti, ma mai in presenza di significatività statistica, alla regressione logistica un'elevata titolazione di VRS risulta essere predittore statisticamente significativo indipendentemente per ciascuno dei 3 outcome analizzati, e addirittura per la durata di ricovero emerge un modello predittivo per cui ad ogni incremento di carica virale di 1 log pfu/mL corrisponde un aumento di durata di ricovero di 0.8 giorni.⁶¹

Anche il gruppo della Dr.ssa Fodha e Colleghi, nel 2007, focalizza l'attenzione sulla relazione tra alcuni fattori di rischio legati al paziente, fattori virali e severità clinica della bronchiolite. In questo studio prospettico osservazionale vengono arruolati 81 lattanti sani < 1 anno ricoverati per bronchiolite da VRS confermata microbiologicamente. Tra i criteri di esclusione figurano tutti quelli adottati dai precedenti studi. La popolazione di studio viene stratificata secondo la presenza di fattori di rischio per infezione severa propri dell'ospite (prematuroità con nascita < 37 settimane e/o basso peso alla nascita < 2500 g) e per severità della patologia (definita secondo specifici outcome: frequenza respiratoria > 60 atti/min, necessità di ricovero in TIP o di ventilazione meccanica, durata di ricovero > 7 giorni). I risultati ottenuti dallo studio evidenziano una correlazione diretta tra patologia severa e fattori di rischio intrinseci dell'ospite, nonché con la carica virale (ottenuta da campione di aspirato faringonasale di ogni paziente, analizzata con metodica Real Time – Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), espressa come copie di VRS-RNA/ μ L). In quest'ultimo caso, la correlazione tra carica virale e patologia severa si evidenzia sia nel gruppo di pazienti arruolati con fattori di rischio legati all'ospite ($p = 0.024$) che nel gruppo senza fattori di rischio ($p = 0.027$).⁶²

Il primo lavoro che focalizza l'attenzione su lattanti non ospedalizzati risale al 2010 (Houben et al.) e consiste in uno studio osservazionale prospettico che arruola 82 lattanti < 6 mesi precedentemente sani valutati in ambulatorio per 1° episodio di infezione respiratoria e sottoposti ad aspirato faringonasale esclusivamente all'arruolamento. Pecca di questo studio consiste nel non adottare (o non riportare) criteri di esclusione relativi alla popolazione selezionata. Di questa coorte, inoltre, soltanto 30 lattanti presentano il VRS nell'aspirato (in 11 casi unico patogeno rilevato dalla metodica RT-PCR). La carica virale in questo studio viene valutata sulla base del Cycle Threshold (ciclo soglia, CT) e corrisponde al numero di cicli di amplificazione di RT-PCR necessari per individuare il virus, valore quindi inversamente proporzionale alla carica virale vera e propria. La severità clinica della patologia viene misurata tramite un apposito score ereditato da lavori precedenti e che viene riportato nell'articolo. Alla regressione lineare i dati ottenuti dallo studio evidenziano una correlazione inversa tra valori di CT e punteggio di severità clinica nei 30 lattanti con AFN positivo anche per VRS ($\rho = -0.52$, $p = 0.003$). Essendo tuttavia il valore CT inverso del quantitativo virale, ciò si riflette in una correlazione diretta tra carica del VRS e punteggio di severità clinica. Tale correlazione (inversa per quanto riguarda il CT e lo score clinico, ma conseguentemente diretta tra carica virale e severità) risulta ancora più forte nel sottogruppo di 11 lattanti con monoinfezione da VRS ($\rho = -0.68$, $p = 0.02$).⁶³

Lo studio prospettico di El Saleeby et al. (2011) ha il pregio di comprendere un ampio numero degli aspetti positivi dei precedenti lavori. La popolazione di studio è robusta, costituita da 219 bambini < 2 anni precedentemente sani (vengono adottati come criteri di esclusione quelli precedentemente elencati in altri lavori in termini di patologie sottostanti e di terapia corticosteroidica ricevuta) con diagnosi di infezione da VRS microbiologicamente accertata, solo una parte dei quali (192 pazienti) va incontro a ricovero. La carica virale (espressa come log pfu/mL) viene analizzata su colture ottenute da aspirato nasale al giorno 1, 2 e 3 dall'arruolamento. Pregi di questo studio consistono quindi nell'analizzare il quantitativo virale presente nel tempo e la clearance del VRS in relazione alla severità del decorso clinico. Gli outcome clinici utilizzati come misura della severità di

patologia sono la necessità di ospedalizzazione, di trasferimento in TIP, di ventilazione meccanica, la durata del ricovero. Anche da questo studio emerge che alcuni fattori di rischio propri dell'ospite (basso peso, genere maschile, presenza di anomalie congenite) correlano con ospedalizzazione prolungata. Per quanto riguarda la carica virale (che risulta progressivamente inferiore negli aspirati nei giorni 1, 2 e 3), i dati evidenziano una correlazione diretta tra elevata carica e maggiore durata di ricovero ($p < 0.001$). Analogamente allo studio di DeVincenzo et al. (autore anche di questo lavoro), anche qui emerge un modello predittivo per cui ad ogni incremento di carica virale di 1 log pfu/mL corrisponde un aumento di durata di ricovero di circa 1 giorno. Inoltre, una elevata carica virale nell'aspirato collezionato al giorno 3 rispetto all'esordio dei sintomi rappresenta l'unica variabile in tale giornata che correla in maniera significativa con la necessità di ricovero in TIP (dati ottenuti da 14 pazienti, $p = 0.009$). Per converso, una più breve durata dei sintomi correla con una ridotta carica virale all'aspirato ottenuto in 1° giornata dall'esordio della clinica ($p = 0.032$). Infine, stratificando la popolazione di studio ospedalizzata sulla base della durata del ricovero ("durata < 4 giorni" e "durata \geq 4 giorni") ed analizzando la clearance virale (intesa come differenza dei valori di carica virale tra giorno 1 e giorno 3), dai risultati emerge che una ridotta clearance si associa significativamente ad un aumento della durata di ricovero ($p = 0.035$).⁶⁴

L'anno seguente Van Leeuwen e Colleghi pubblicano i dati di uno studio prospettico cross-sectional che ha come popolazione di studio 120 bambini < 2 anni ricoverati con diagnosi di infezione delle basse vie aeree. Oltre a non essere presenti nel lavoro ulteriori criteri di selezione e di esclusione della popolazione indagata, va precisato che solo 58 bambini risultano infettati da VRS al liquido ottenuto da lavaggio nasale all'arruolamento (11 bambini aventi coinfezione VRS + Rhinovirus, i rimanenti 47 solo VRS). La carica virale, analogamente allo studio di Houben et al., viene estrapolata dal valore di CT all'analisi RT-PCR, mentre come misura della severità clinica viene presa in considerazione unicamente la durata di ricovero. Dai dati emerge sì una correlazione tra valore di CT e durata di ricovero, ma decisamente ai limiti della significatività statistica ($r = 0.28$, $p = 0.05$). e quindi non considerata dagli Autori dello studio come tale.⁶⁵

Lo stesso anno viene pubblicato un lavoro italiano (Scagnolari et al.), uno studio osservazionale prospettico che arruola 132 bambini < 2 anni (età media di 2.2 mesi) ricoverati per bronchiolite da VRS. Criteri di esclusione dallo studio sono le patologie croniche precedentemente espresse (compreso il wheezing ricorrente). L'analisi della carica virale viene effettuata su liquido ottenuto da lavaggio nasofaringeo nelle prime 24 ore dal ricovero ed espressa come log VRS-RNA copie/mL. Gli outcome analizzati come misura della severità clinica sono uno score clinico predefinito ed applicato ad ogni paziente al momento del ricovero, nonché la durata di ricovero. Dai dati dello studio emerge una correlazione significativa diretta tra carica virale ed elevato punteggio allo score clinico ($r = 0.17$, $p = 0.024$), così come tra carica virale e durata di ricovero ($r = 0.16$, $p = 0.038$).⁶⁶

È del 2015 lo studio prospettico di Zhou e Colleghi che mira ad analizzare specificatamente la severità clinica della bronchiolite da VRS non solo in relazione alla carica virale, ma anche al suo variare (clearance) nel corso del ricovero. In questo lavoro vengono arruolati 60 lattanti < 1 anno precedentemente sani, essendo esclusi quelli con wheezing ricorrente o che abbiano ricevuto terapia steroidea nelle 2 settimane precedenti al ricovero o Ribavirina durante il ricovero. 40 lattanti risultano infettati da VRS su aspirato faringonasale ottenuto all'arruolamento (32 pazienti con mono-infezione, i rimanenti 8 con co-infezione da secondo agente virale). Sulla base del punteggio ottenuto applicando uno score clinico ben definito al ricovero, questi pazienti vengono classificati in 3 categorie di severità: 18 con bronchiolite severa, 18 con patologia moderata, i rimanenti 4 con malattia lieve. Altro punto di forza dello studio consiste nel fatto che l'aspirato faringonasale viene collezionato non solo all'ingresso in reparto, ma anche al giorno 3, 5 e 7 di degenza. La carica virale viene determinata con RT-PCR ed espressa come \log_{10} copie di VRS-RNA/mL. All'analisi

della regressione logistica si evidenzia una correlazione diretta tra elevata carica virale e maggior punteggio allo score clinico ($r^2 = 0.121$, $p < 0.001$). Analizzando i valori della carica virale stratificati per categoria di severità dei pazienti, inoltre, la carica risulta significativamente più elevata nel gruppo affetto da bronchiolite severa rispetto a quello con patologia lieve sia al ricovero ($p = 0.034$), sia al giorno 3 di degenza ($p = 0.014$). All'analisi multivariata, infine, la carica virale elevata al giorno 3 di degenza risulta essere l'unico fattore di rischio per elevato punteggio allo score clinico e conseguente maggior severità (OR 8.993, IC 95%: 1.015 – 79.687, $p = 0.048$).⁶⁷

I risultati più solidi in merito a questo ambito di ricerca derivano da lavori ottenuti nel contesto di uno studio multicentrico prospettico (il cosiddetto 30th Multicenter Airway Research Collaboration – MARC-30), condotto in 16 centri ospedalieri di 14 Stati del continente nordamericano e che ha visto l'arruolamento tra il 2007 ed il 2010, ed in 3 centri ospedalieri finlandesi con arruolamento tra il 2008 ed il 2011, per un totale di 2615 bambini di età inferiore ai 2 anni ospedalizzati per bronchiolite arruolati. Il Dott. Hasegawa e Colleghi nel 2015 analizzano i dati combinati ottenuti dalle due coorti e focalizzando l'attenzione sui 1764 bambini con infezione da VRS. Nello studio non vengono adottati particolari criteri di esclusione, preferendo gli Autori analizzare caratteristiche come la prematurità o la presenza di comorbidità come variabili da porre in relazione con la carica virale. Quest'ultima viene analizzata su campione nasofaringeo ottenuto nelle prime 24 ore di ricovero ed estrapolata, analogamente ad altri lavori, dal valore di CT all'analisi RT-PCR. Sulla base del valore di CT, inverso della carica virale, la popolazione di studio viene stratificata in 3 categorie di carica del VRS: bassa (CT ≥ 24.3 , 587 pazienti), moderata (CT 20.8-24.2, 598 bambini), alta (CT < 20.8 , i rimanenti 579). Outcome utilizzati come misura della severità clinica in questo lavoro sono una durata di ricovero ≥ 3 giorni e la necessità di cure intensive, intesa come ricovero in TIP e/o ventilazione meccanica durante il ricovero. Dai risultati emerge una correlazione diretta tra carica virale e probabilità di durata di ricovero ≥ 3 giorni (OR 1.55, IC 95%: 1.31 – 1.83, $p < 0.001$). Tale correlazione rimane anche una volta che l'analisi viene "aggiustata" per fattori quali età del paziente, prematurità, presenza di comorbidità (OR 1.58, IC 95%: 1.29 – 1.94, $p < 0.001$) e perfino quando viene considerato il solo sottogruppo di pazienti che rispondono ad una definizione "ristretta" di bronchiolite (lattanti < 1 anno nati a termine, 1223 pazienti in tutto: OR 1.46, IC 95%: 1.09 – 1.94, $p = 0.01$). Analogamente al primo outcome analizzato, anche per quanto riguarda carica virale e necessità di cure intensive si evidenzia una correlazione diretta (OR 1.49, IC 95%: 1.14 – 1.95, $p = 0.003$), che rimane all'analisi "aggiustata" per i fattori sopra riportati (OR 1.43, IC 95%: 1.03 – 1.99, $p = 0.03$), ma che perde significatività una volta considerato il sottogruppo di definizione "ristretta" di bronchiolite ($p = 0.14$). Dati ottenuti da una coorte così ampia permettono agli Autori di speculare sull'utilizzo della carica virale come predittore della severità clinica della bronchiolite.⁶⁸

A conclusioni analoghe giunge il lavoro di Skjerven et al. (2016), che pubblica i dati di uno studio prospettico multicentrico relativi ad una coorte di lattanti < 1 anno ricoverati per bronchiolite definita come moderata o severa sulla base di uno score clinico predefinito specificato dagli Autori. I lattanti considerati nel lavoro devono essere sani (criteri di esclusione sono rappresentati da patologie sottostanti di qualunque tipo, nonché da pregressa terapia corticosteroidica) e devono essere stati sottoposti ad aspirato faringonasale (1 per paziente), che viene analizzato appositamente nello studio per l'identificazione dei patogeni presenti e la quantificazione della carica virale (dedotta dal valore di CT ricavato alla RT-PCR). Di 363 lattanti arruolati, 300 presentano infezione da VRS all'aspirato (in 89 casi trattasi di mono-infezione), 200 con carica virale classificata come elevata sulla base del valore CT. Gli outcome utilizzati come misura della severità clinica sono la durata di ricovero ed il livello di intensità di cure (classificato come "non necessità di cure", "necessità di ossigenoterapia e/o sondino nasogastrico", "necessità di supporto ventilatorio"). Dai dati dello studio emerge una correlazione diretta tra elevata carica del VRS ed aumentata durata di ricovero ($p = 0.042$), nonché tra elevata carica del VRS e maggior livello di intensità di cure ($p =$

0.004). Tale associazione non si evidenzia per nessuno degli altri virus respiratori (Adenovirus, Bocavirus, Coronavirus, Influenza, Metapneumovirus, Parainfluenza, Rhinovirus) isolati dagli aspirati con elevata carica.⁶⁹

A conclusioni differenti giungono invece dal lavoro della Dr.ssa de Souza e Colleghi (2016), che conducono uno studio cross-sectional arruolando 110 lattanti < 1 anno ricoverati per bronchiolite (ancora una volta esclusi i pazienti con patologie croniche sottostanti o sottoposti a terapia antibiotica con macrolidi per sospetta o accertata infezione da *B. pertussis*). Tra questi pazienti, soltanto un sottogruppo di 56 lattanti ha un aspirato faringonasale positivo per VRS su cui viene effettuata con RT-PCR analisi della carica virale, espressa come copie di VRS-RNA/mL. Come misure di severità clinica vengono utilizzate nello studio la durata della sintomatologia (wheezing), la durata di ricovero, la durata di ossigenoterapia. Dai dati non emerge correlazione statisticamente significativa tra carica virale e durata del wheezing, del ricovero, dell'ossigenoterapia ($p > 0.05$).⁷⁰

Viene pubblicato nello stesso anno un ulteriore lavoro, relativo stavolta ad uno studio prospettico monocentrico condotto in Cina, che arruola bambini ricoverati per infezione virale acuta a carico delle basse vie aeree e che studia nello specifico anche il sottogruppo di bambini ricoverati per bronchiolite (160 pazienti). Tutti i pazienti vengono sottoposti ad aspirato faringonasale entro 3 giorni dal ricovero e sui campioni ottenuti viene effettuata l'identificazione dei patogeni respiratori e la quantificazione della carica virale, espressa come numero di copie di RNA-VRS/mL nei casi di nostro interesse. La severità della patologia viene definita sulla base di criteri clinici specificatamente riportati nel lavoro (valori di FR specifici per età, difficoltà alimentari, vomito, convulsioni, stato letargico, stridor). Pecca di questo studio è non riportare i dati microbiologici precisi relativi al sottogruppo di bambini affetti da bronchiolite, ma dai risultati segnalati emerge l'assenza di correlazione tra carica del VRS e severità della patologia ($p = 0.166$).⁷¹

Interessanti appaiono i dati del lavoro della Dr.ssa Espinosa e Colleghi (2017) relativi ad uno studio cross-sectional osservazionale che arruola 86 lattanti < 1 anno ricoverati per infezione a carico delle basse vie aeree. Dal punto di vista clinico, i pazienti vengono classificati in 2 gruppi (patologia moderata e patologia severa) sulla base di uno score clinico riportato in un precedente lavoro.⁷² Dal punto di vista microbiologico, i pazienti vengono sottoposti ad un singolo aspirato faringonasale in corso di ricovero e su questo campione viene effettuata l'identificazione dei patogeni virali (VRS identificato in tutti e 86 i casi, in 66 dei quali in mono-infezione) e l'analisi della carica virale (espressa come \log_{10} copie di VRS-RNA/mL). Considerando come misura di severità la classificazione operata all'interno della popolazione, dai risultati non emerge una differenza significativa dei valori di carica del VRS nel gruppo dei pazienti con patologia moderata (49 casi) rispetto a quelli con patologia severa (37 casi, $p = 0.12$). Nel momento in cui tuttavia si considera in quale giornata di ricovero è stato effettuato l'aspirato faringonasale, si osserva che la carica del VRS, ancora sostanzialmente simile nei casi moderati e severi sottoposti ad aspirato entro 3 giorni dal ricovero ($p = 0.45$), risulta invece significativamente più elevata nel gruppo di lattanti con patologia severa rispetto a quelli "moderati" il cui aspirato sia stato effettuato ≥ 3 giorni dal ricovero ($p = 0.04$). Questo dato sembra essere in accordo con il precedente risultato dello studio di Zhou che evidenziava come un'elevata carica di VRS al giorno 3 di ricovero fosse l'unico fattore di rischio significativo per patologia severa. Gli Autori sono quindi portati ad ipotizzare che una differenza così significativa negli aspirati raccolti ≥ 3 giorni dal ricovero siano il riflesso di una rallentata clearance virale, che potrebbe contribuire all'insorgenza di un danno maggiore a carico delle vie aeree e conseguentemente ad un decorso clinico più severo della patologia.⁷³

Il lavoro di Piedra e Colleghi appare invece in controtendenza rispetto ai precedenti risultati. Si tratta di uno studio prospettico cross-sectional monocentrico che arruola 112 bambini < 2 anni con diagnosi di bronchiolite alla valutazione clinica e lavaggio nasale effettuato soltanto

all'arruolamento nello studio. Dei 112 bambini arruolati, 79 presentano infezione da VRS all'analisi microbiologica. In questo lavoro viene effettuata l'analisi della carica genomica di 5 geni del VRS (NS1, NS2, N, G, F), il cui valore viene espresso in numero di copie (CN). I valori della carica genomica vengono studiati dagli Autori in relazione ad alcune citochine infiammatorie e biomarkers, mentre come misura di severità clinica vengono utilizzati 2 parametri: l'ospedalizzazione del paziente (dei 79 bambini con bronchiolite da VRS infatti 41 vengono ricoverati, i rimanenti 38 no) e con il valore di saturazione dell'ossigeno alla diagnosi di bronchiolite. Sorprendentemente, dai risultati emerge che una elevata carica genomica (per tutti i geni considerati tranne che per il gene F) correla con mancata ospedalizzazione, e quindi patologia meno severa (valori di p compresi tra 0.01 e 0.04, per il gene F $p = 0.21$). Inoltre, una elevata carica genomica (geni NS1, NS2 e N) correla direttamente con valori maggiori di saturazione alla diagnosi di bronchiolite ($r = 0.28$, $p = 0.03$). Considerando il fatto che elevati valori di carica genomica correlano anche con l'aumento di determinate citochine e biomarker, gli Autori interpretano questi dati, in apparente controtendenza con quanto visto finora in letteratura, ipotizzando che un'aumentata carica di VRS negli stadi precoci dell'infezione determini una robusta risposta immunologica ed infiammatoria, che favorisce un miglior outcome clinico.⁷⁴

A conclusioni analoghe giunge il lavoro di Thwaites e Colleghi che arruola 55 bambini < 2 anni ricoverati per bronchiolite (figurano tra i criteri di esclusione le comorbidità respiratorie, mentre la presenza di comorbidità non respiratorie viene analizzata come variabile). I partecipanti vengono sottoposti ad aspirato faringonasale da 1 a 2 volte al giorno durante il ricovero fino alla dimissione. Su questi campioni viene effettuata l'identificazione del patogeno (30 pazienti positivi al VRS) e l'analisi della carica virale, espressa come copie di VRS-RNA/mL. La severità della patologia è definita dalla necessità di ricovero in TIP ("patologia severa", 12 pazienti) rispetto al ricovero in Pediatria Generale ("patologia moderata", 18 bambini). Dallo studio emerge che la carica VRS è significativamente ridotta nei casi con patologia severa rispetto ai casi con bronchiolite moderata ($p = 0.001$). Inoltre, considerando gli aspirati ripetuti serialmente in corso di ricovero, gli Autori hanno potuto analizzare l'andamento della carica virale nel tempo ed osservare un maggior decremento del quantitativo di VRS nei pazienti con patologia severa rispetto a quelli con bronchiolite moderata ($p = 0.001$). Queste associazioni, unite ad altre relative alla carica virale e ad alcune citochine infiammatorie e mucine, similmente al precedente lavoro portano gli Autori di questo studio ad ipotizzare che alterazioni quantitative della carica virale possano, attraverso l'elicitazione o la soppressione di alcuni pattern infiammatori e della mucogenesi, influire attivamente sull'outcome clinico dei pazienti con bronchiolite.⁷⁵

Alla luce di risultati così variegati in letteratura, nel 2019 viene pubblicato il lavoro di Garcia-Mauriño e Colleghi inerente i risultati di uno studio prospettico monocentrico condotto su 150 bambini < 2 anni sani con infezione a carico delle basse vie aeree da VRS documentata microbiologicamente avente il duplice obiettivo di analizzare le differenze della carica del VRS tra pazienti ospedalizzati e pazienti che non necessitano di ricovero, nonché l'evoluzione della carica virale ed il decorso clinico nei pazienti ospedalizzati. Per selezionare la popolazione di studio vengono adottati numerosi criteri di esclusione (prematrità, tutte le comorbidità precedentemente elencate, esposizione a terapia steroidea nei giorni precedenti l'arruolamento, pregressa bronchiolite o wheezing, ricovero per apnea). I campioni biologici (tampone nasale) per l'analisi alla RT-PCR della carica del VRS (espressa in \log_{10} copie VRS-RNA/mL) vengono prelevati al solo arruolamento nei pazienti che non vengono ricoverati (39 bambini), ripetuti quotidianamente negli ospedalizzati (111 bambini). L'outcome clinico selezionato per la valutazione iniziale della severità dell'infezione in tutti i pazienti (ospedalizzati e non) è rappresentato dal Clinical Disease Severity Score (CDSS), punteggio specificato dallo studio. Gli outcome scelti per l'analisi longitudinale nei soli pazienti ospedalizzati sono rappresentati dal Reparto di ricovero (Pediatria Generale, TIP), dal CDSS, dalla durata di ricovero, dalla necessità di ossigenoterapia e dalla sua durata.

All'analisi all'arruolamento nello studio emerge una carica virale significativamente più elevata nel gruppo di pazienti non ospedalizzati rispetto agli ospedalizzati (valor medi rispettivamente di 7.23 ± 1.2 vs 6.48 ± 1.3 \log_{10} copie VRS-RNA/mL, $p = 0.003$). All'analisi della relazione tra carica virale e punteggio CDSS all'arruolamento in tutti i pazienti, inoltre, emerge una relazione inversamente proporzionale nei pazienti non ospedalizzati ($r = -0.56$, $p = 0.002$). Ne consegue che a valori di carica VRS maggiori corrisponda un minore punteggio al CDSS, e quindi una minore severità clinica. Non emerge invece alcuna correlazione nei pazienti ospedalizzati. Analizzando quest'ultima coorte nello specifico, ulteriormente suddivisa in bambini ricoverati in Pediatria Generale (79 casi) e TIP (32 pazienti), il secondo gruppo differisce significativamente dal primo per maggiori valori di CDSS, durata di ricovero, necessità di ossigenoterapia e sua durata ($p < 0.001$ per tutte queste variabili), ma i due gruppi non differiscono significativamente per carica virale ($p = 0.24$), che quindi non pare influire sulla clinica negli ospedalizzati. All'analisi multivariata, anzi, elevati valori di carica virale sembrano associarsi con ridotta necessità di ossigenoterapia ($p = 0.04$). Punto interessante dello studio, gli Autori si concentrano nell'analisi del sottogruppo di bambini trattati con terapia steroidea in corso di ricovero (24 pazienti), senza riscontrare alcuna differenza in termini di carica virale nei bambini ricoverati in Pediatria Generale rispetto a quelli ricoverati in TIP, osservando invece una differenza di valori di carica significativamente maggiori nei pazienti ricoverati in Pediatria Generale rispetto alla TIP ($p < 0.001$) nel sotto-gruppo di 95 bambini non trattati con terapia steroidea. Da questo riscontro gli Autori desumono che la terapia steroidea sembra influire sulla severità clinica dell'infezione da VRS (ricovero in TIP anche in presenza di valori di carica virale comparabili con i pazienti ricoverati in Pediatria Generale), probabilmente perché inibisce la clearance virale nel paziente trattato. In conclusione, da questo studio emerge che la carica del VRS è inversamente correlata con la severità clinica, sebbene l'esposizione a steroidi rallenti la clearance virale e favorisca un peggioramento del decorso clinico.⁷⁶

È del 2021 uno studio prospettico monocentrico brasiliano che ha incluso 70 lattanti < 6 mesi sani ospedalizzati per bronchiolite acuta con infezione da VRS (49 casi), Rhinovirus (9 casi), co-infezione di entrambi gli agenti patogeni (i rimanenti 12 lattanti). Criteri di esclusione sono patologie cardiopolmonari croniche sottostanti ed il recente o attuale trattamento corticosteroidico o antibiotico. L'identificazione e la quantificazione virale (analizzata alla RT-PCR ed espressa come \log_{10} copie VRS-RNA/mL) vengono effettuate su aspirato faringonasale collezionato entro 72 ore dal ricovero. Già ai risultati dell'analisi univariata, ma ancor più all'analisi multivariata "aggiustata" per età dei pazienti e per tempo intercorso tra esordio dei sintomi e collezione di aspirato faringonasale, emerge che un'elevata carica di VRS risulta essere fattore di rischio per durata globale del supporto respiratorio (OR 1.84, IC 95% 0.28-3.39, $p = 0.021$), durata ricovero in TIP (OR 2.03, IC 95% 0.14-3.93, $p = 0.036$), durata dell'ossigenoterapia (OR 2.96, IC 95% 0.68-5.23, $p = 0.011$), durata globale del ricovero in ambito ospedaliero (OR 3.23, IC 95% 0.70-5.75, $p = 0.012$). Nel momento in cui si considera come variabile la carica del Rhinovirus in mono-infezione non emergono correlazioni significative per le stesse variabili, mentre per quanto riguarda il gruppo di pazienti con co-infezione VRS+Rhinovirus, ancora una volta un'elevata carica del VRS risulta essere significativamente associata alla durata dell'ossigenoterapia (OR 4.78, IC 95% 0.86-8.69, $p = 0.017$).⁷⁷

L'ultimo lavoro pubblicato in merito a questo argomento è di quest'anno e consiste in uno studio prospettico monocentrico condotto su 72 bambini < 2 anni ospedalizzati per bronchiolite da infezione da VRS microbiologicamente confermata. Questo lavoro non adotta particolari criteri di esclusione, eccetto la pregressa esposizione a Palivizumab. Tutti i bambini sono sottoposti a collezione di aspirato faringonasale quotidianamente dall'arruolamento fino alla dimissione, dopodiché settimanalmente fino a completa negativizzazione del campione biologico per VRS. La carica virale è espressa come \log_{10} copie di VRS-RNA/mL. Dall'analisi dei risultati non emerge

alcuna correlazione significativa tra la carica virale e gli outcome selezionati come misura della severità clinica (necessità di ricovero in TIP, di intubazione, durata del ricovero).⁷⁸

In conclusione, la letteratura relativa alla relazione tra carica virale del VRS e decorso clinico dell'infezione a carico delle basse vie aeree (e della bronchiolite nello specifico) nei pazienti pediatrici appare ampia e variegata, con 12 studi i cui dati sono a favore di una correlazione diretta tra carica virale e maggior severità dell'infezione, 3 lavori i cui risultati riscontrano invece una correlazione inversa, 5 articoli in cui infine non emerge alcuna relazione significativa.

I lavori considerati sono quasi tutti studi osservazionali prospettici monocentrici. 4 studi sono cross-sectional, e per loro natura non possono contemplare la possibilità di ripetere sui soggetti dello studio l'analisi della carica virale nel corso del tempo. 2 lavori si inseriscono nel contesto di trial randomizzati controllati. 2 lavori raccolgono i dati da coorti multicentriche.

Come ipotizzato da alcuni studi più recenti, è possibile che alcune caratteristiche intrinseche alle popolazioni incluse di volta in volta nei singoli studi possano influenzare i risultati stessi, sebbene nella maggior parte dei lavori molti dei fattori di rischio dell'ospite noti in letteratura (in particolare prematurità, patologie croniche cardiopolmonari congenite o acquisite, immunodeficit) vengano adottati come criteri di esclusione, alla stregua dell'esposizione a farmaci immunomodulanti come corticosteroidi, antivirali (in primis la Ribavirina), immunoglobuline umane aspecifiche o specificatamente anti-VRS.

La dimensione del campione analizzato nei singoli studi, variabile da poche decine (minimo 38 pazienti) ad alcune migliaia di soggetti (massimo 1764 soggetti) potrebbe influenzare i risultati ottenuti e la loro qualità. Di fatto, 11 lavori includono una popolazione di studio inferiore ai 100 soggetti, 9 studi arruolano un numero di pazienti compreso tra 100 e 1000, un lavoro soltanto (ovviamente multicentrico) analizza una coorte di più di 1000 bambini.

Differenze metodologiche emergono inoltre per quanto riguarda la tipologia di campione biologico prelevato per l'analisi del VRS (aspirato nasale o faringonasale – talora aspirato tracheale nei pazienti intubati – in 13 studi, liquido ottenuto da lavaggio nasale o nasofaringeo o endotracheale in 5 lavori, tampone nasale in 2 studi) e la quantificazione della carica virale (titolo colturale espresso come \log_{10} TCID₅₀/mL nel primissimo studio condotto nel 1975, espresso come \log_{10} PFU/mL in 4 successivi lavori, carica virale vera e propria calcolata mediante RT-PCR ed espressa come numero di copie di VRS-RNA/mL o μ L, talora in scala logaritmica, in 8 studi, valore di CT alla RT-PCR nei rimanenti lavori, in un lavoro infine viene effettuata l'analisi della carica genomica valutata come numero di copie di geni espressi). È importante osservare che solo 7 lavori mirano ad analizzare l'andamento della carica virale su campioni ripetuti nel corso del tempo, e sempre e solo nei pazienti ospedalizzati (anche in studi che arruolano anche pazienti che non vengono ospedalizzati).

Tra i parametri selezionati per misurare indirettamente la severità clinica dell'infezione figurano spesso score clinici (7 lavori), che tuttavia cambiano di studio in studio, rendendo difficile valutare se la relazione osservata con la carica virale (spesso lineare, ma in rari casi inversa o addirittura assente) sia attendibile, variando di fatto il parametro analizzato di studio in studio. Altri misuratori ricorrenti sono l'ospedalizzazione (in 3 lavori, 2 dei quali che arruolano anche pazienti che non vengono ricoverati), la durata di degenza ospedaliera in generale (10 studi), la necessità di ricovero in TIP (6 lavori, più raramente viene utilizzata come variabile anche la durata di degenza in TIP), la necessità di supporto respiratorio (nello specifico, la necessità di ossigenoterapia – 2 studi – e talvolta la sua durata – 2 studi –) o ventilatorio (in particolare la necessità di ventilazione invasiva – 5 lavori–).

Tutte queste differenze potrebbero rendere ragione della variabilità dei risultati ottenuti. Di seguito la panoramica della letteratura precedentemente esposta è riassunta in apposite tabelle (tabelle 2–4).

Autore e anno, Paese, Periodo di arruolamento	Tipologia di studio, Popolazione campione dello studio, Materiale biologico collezionato ed analizzato Criteri di esclusione	Dimensioni del campione, Frequenze sottogruppi	Outcome analizzati	Risultati (valore p)
Hall et al., 1976, ⁵⁸ USA, Bimestre invernale 1975	Studio prospettico, Bambini (10 giorni – 4 anni, età media 4 mesi) con sottogruppo sottoposto ai lavaggi nasali per colturale VRS costituito da lattanti < 11 mesi ospedalizzati per infezione respiratoria acuta da VRS, Liquido da lavaggio nasale collezionato all'ingresso ed ogni 1-3 giorni durante il ricovero, con coltura VRS e titolo colturale espresso come log ₁₀ TCID ₅₀ /mL Nessun criterio di esclusione	59 pazienti, 39/59 polmonite ± bronchiolite, 5/59 bronchiolite, 15/59 infezione alte vie aeree 19/59 lattanti con lavaggio nasale e coltura VRS 17/19 polmonite ± bronchiolite, 2/19 bronchiolite	Presenza di addensamento polmonare all'Rx torace, Ipossia, Durata ricovero	Correlazione significativa tra maggior titolo colturale VRS e presenza di addensamento polmonare all'Rx torace (p < 0.025), Nessuna correlazione significativa tra maggior titolo colturale VRS e ipossia e/o maggiore durata di ricovero (p > 0.05)
Buckingham et al., 2000, ⁵⁹ USA, ND	Studio prospettico, Bambini < 2 anni ospedalizzati per infezione da VRS, Aspirato nasale all'ingresso con quantitativo colturale VRS espresso come log ₁₀ PFU/mL Criteri di esclusione: BDP, CC emodinamicamente significativa, ID, terapia con Ig anti-VRS nei 3 mesi precedenti al ricovero, terapia con CSS nelle 3 settimane precedenti al ricovero, terapia con Ribavirina durante il ricovero, necessità di VM per apnea	39 pazienti, 15/39 bronchiolite severa (= necessità VM durante ricovero) 24/39 bronchiolite non severa	Severità (= necessità VM durante ricovero)	Correlazione significativa tra elevato quantitativo colturale VRS e pazienti con bronchiolite severa (p = 0.022)
DeVincenzo et al., 2005, ⁶¹ USA, 4 stagioni invernali (1997-2001)	Studio osservazionale prospettico, Bambini sani < 2 anni ospedalizzati per infezione da VRS Aspirato nasale all'ingresso con quantitativo colturale VRS espresso come log ₁₀ PFU/mL Criteri di esclusione: BDP, CC emodinamicamente significativa, ID, terapia con CSS, Ig anti-VRS, ribavirina nel mese precedente al ricovero, emocoltura positiva	141 pazienti	Durata ricovero, Ricovero in TIP, necessità di VM	Correlazione significativa tra elevato quantitativo colturale VRS e maggiore durata di ricovero (p = 0.008), Ricovero in TIP (p = 0.0049), Necessità di VM (p = 0.0048), L'aumento di 1 log ₁₀ PFU/mL di quantitativo colturale VRS è associato a +0.8 giorni di ricovero

<p>Fodha et al., 2007,⁶² Tunisia, ND</p>	<p>Studio prospettico, Lattanti sani < 1 anno ricoverati per bronchiolite da VRS, AFN (1 volta per paziente) con carica virale VRS calcolata con RT-PCR (copie VRS-RNA/μL)</p> <p>Criteri di esclusione: BDP, CC emodinamicamente significativa, ID, terapia con Ig anti-VRS nei 3 mesi precedenti al ricovero, terapia con CSS nelle 3 settimane precedenti al ricovero, terapia con Ribavirina durante il ricovero</p>	<p>81 pazienti, 28/81 con fattori di rischio per bronchiolite severa (prematurit� e/o LBW), 53/81 senza fattori di rischio</p>	<p>Bronchiolite severa definita come: - FR > 60 apm, - ricovero > 7 giorni, - ricovero in TIP, - necessit� VM</p>	<p>Correlazione significativa tra bronchiolite severa e elevata carica virale VRS sia nei pazienti con fattori di rischio (p = 0.024) che nei pazienti senza fattori di rischio (p = 0.027)</p>
<p>Houben et al., 2010,⁶³ Paesi Bassi, Apr 2006 – Feb 2008</p>	<p>Studio osservazionale prospettico, Lattanti sani < 6 mesi valutati in ambulatorio per 1° episodio di infezione respiratoria, AFN all'arruolamento, carica virale espressa dal valore di PCR-CT (correlazione inversa tra carica virale e valore CT)</p> <p>Criteri di esclusione: ND</p>	<p>82 lattanti, 30/82 infezione VRS, 11/82 mono-infezione VRS</p>	<p>Score clinico specificato dallo studio</p>	<p>Correlazione significativa tra carica virale e severit� clinica nei lattanti con infezione da VRS (p = 0.003) Ed in quelli con mono-infezione da VRS (p = 0.02)</p>
<p>El Saleeby, 2011,⁶⁴ USA, 5 stagioni invernali</p>	<p>Studio monocentrico prospettico, Bambini sani \leq 2 anni ricoverati per infezione da VRS, AFN o aspirato tracheale all'ingresso e (per i ricoverati) ogni giorno fino alla dimissione, carica virale espressa come log₁₀ PFU/mL</p> <p>Criteri di esclusione: BDP, CC emodinamicamente significativa, ID, terapia con CSS nel mese precedente al ricovero, emocoltura positiva</p>	<p>219 pazienti, 192/219 ricoverati, 218/219 campioni giorno 1, 102/219 campioni giorno 2, 41/219 campioni giorno 3</p>	<p>Durata ricovero, Ricovero in TIP, Necessit� VM</p>	<p>Correlazione significativa tra elevata carica virale e maggiore durata ricovero (p < 0.001), tra elevata carica virale in giorno 3 e ricovero in TIP (p = 0.009), tra ridotta clearance (Δ carica giorni 1-3) e maggiore durata ricovero (p = 0.035) L'aumento di 1 log PFU/mL di carica virale VRS in giorno 1 � associato a +1 giorno di durata ricovero</p>
<p>Scagnolari et al., 2012,⁶⁶ Italia, 4 stagioni invernali (2006 – 2010)</p>	<p>Studio prospettico, Bambini < 3 anni (et� media 2.2 mesi) ricoverati per bronchiolite da VRS, Liquido da lavaggio nasofaringeo all'ingresso con carica virale VRS espressa come VRS-RNA copie/mL</p> <p>Criteri di esclusione:</p>	<p>132 pazienti</p>	<p>Score clinico specificato dallo studio, Durata ricovero</p>	<p>Correlazione significativa tra carica VRS elevata e maggior punteggio allo score di severit� clinica (p = 0.024) e tra carica VRS e maggior durata di ricovero</p>

	Condizioni croniche sottostanti (prematùrità, BDP, CC, FC, ID) ed episodi di wheezing ricorrenti (> 1 episodio)			(p = 0.038)
Zhou et al., 2015, ⁶⁷ Cina, 2 stagioni invernali (2012 – 2014)	Studio prospettico, Bambini sani ≤ 2 anni ospedalizzati per bronchiolite, AFN all'ingresso e ai giorni 3, 5, 7 con carica virale VRS espressa come log ₁₀ VRS-RNA copie/mL Criteri di esclusione: Wheezing ricorrente, Terapia con CSS nelle 2 settimane precedenti, Terapia con Ribavirina durante il ricovero	60 pazienti, 40/60 con infezione VRS, 18/40 bronchiolite severa, 18/40 bronchiolite media, 4/40 bronchiolite lieve	Score clinico specificato dallo studio	Correlazione significativa tra elevata carica virale e maggiore punteggio di severità clinica (p < 0.001), Elevata carica virale al giorno 3 fattore di rischio significativo per maggiore punteggio di severità clinica (OR 8.993, p = 0.048), Differenza significativa tra la media dei valori di carica virale nei pazienti con bronchiolite lieve e nei pazienti con bronchiolite severa (p = 0.014)
Hasegawa et al., 2015, ⁶⁸ USA (2007 – 2010) Finlandia (2008 – 2010)	Studio prospettico multicentrico, Bambini < 2 anni ospedalizzati per bronchiolite, AFN all'ingresso con carica virale VRS espressa dal valore PCR-CT (correlazione inversa tra carica virale e valore CT) Criteri di esclusione: Arruolamento in altri studi, Arruolamento > 48 ore dopo l'ingresso in reparto	2615 pazienti, 1764/2615 con infezione da VRS, 587/1764 carica VRS bassa, 598/1764 carica VRS media, 579/1764 carica VRS alta 1223/1764 pazienti rispondenti ai criteri di definizione più "stringente" di bronchiolite (nati a termine con età < 1 anno)	Durata ricovero, Ricovero in TIP	Correlazione significativa tra carica virale elevata e rischio di durata ricovero ≥ 3 giorni (OR 1.58, p < 0.001), anche nel sottogruppo di pazienti inclusi nella definizione più "stringente" di bronchiolite (OR 1.46, p = 0.01), Correlazione significativa tra carica virale elevata e ricovero in TIP (OR 1.43, p = 0.03), ma perdita di significatività nel sottogruppo di pazienti inclusi nella definizione più "stringente" di bronchiolite (p > 0.05)

<p>Skjerven et al., 2016,⁶⁹ Norvegia, 2 stagioni invernali (2010 – 2011)</p>	<p>Trial randomizzato controllato in doppio cieco (adrenalina racemica nebulizzata vs soluzione fisiologica), Lattanti < 1 anno ospedalizzati per bronchiolite moderata-severa secondo score clinico specificato dallo studio con punteggio $\geq 4/10$, AFN all'ingresso con carica virale VRS espressa dal valore PCR-CT (correlazione inversa tra carica virale e valore CT)</p> <p>Criteri di esclusione: Patologie gravi sottostanti di tipo cardiaco, immunologico, neurologico, oncologico, polmonare, > 1 pregresso episodio di ostruzione delle vie aeree, sintomi di infezione a carico delle basse vie aeree (es. tosse) presenti da > 4 settimane, terapia con CSS nelle precedenti 4 settimane</p>	<p>404 pazienti 363/404 pazienti con AFN, 300/363 infezione da VRS, 200/363 alta carica VRS, 89/363 monoinfezione VRS</p>	<p>Durata ricovero, Necessità ossigenoterapia, Necessità SNG, Necessità supporto ventilatorio</p>	<p>Correlazione significativa tra elevata carica virale e aumento durata ricovero ($p = 0.042$), tra elevata carica virale e necessità di supporto ventilatorio ($p = 0.004$)</p>
<p>Espinosa et al., 2017,⁷³ Cile, 2 stagioni epidemiche (2013 – 2014)</p>	<p>Studio osservazionale cross-sectional, Lattanti < 1 anno ospedalizzati per infezione delle basse vie aeree da VRS, AFN < 3 giorni o ≥ 3 giorni dall'esordio dei sintomi con carica virale VRS espressa dal valore PCR-CT (correlazione inversa tra carica virale e valore CT)</p> <p>Criteri di esclusione: Prematurità, ID, documentata pneumopatia o cardiopatia cronica, possibile infezione batterica</p>	<p>86 pazienti Suddivisione secondo gravità clinica misurata con score specificato dallo studio: 49/86 patologia moderata, 37/86 patologia severa</p>	<p>Severità clinica misurata tramite score clinico specificato dallo studio</p>	<p>Correlazione significativa tra elevata carica VRS e infezione delle basse vie aeree severa negli AFN collezionati a ≥ 3 giorni dall'esordio dei sintomi ($p = 0.04$)</p>
<p>De Paulis et al., 2021,⁷⁷ Brasile, Gen 2013 – Nov 2015</p>	<p>Studio prospettico, Lattanti < 6 mesi ricoverati per bronchiolite da VRS±RV, AFN all'ingresso con carica virale VRS espressa dal valore PCR-CT (correlazione inversa tra carica virale e valore CT)</p> <p>Criteri di esclusione: Terapia con CSS durante ricovero o nei 30 giorni precedenti, Terapia con antibiotico durante ricovero o nei 15 giorni precedenti, Precedente episodio di wheezing, CC, BDP</p>	<p>70 pazienti, 61/70 infezione da VRS, 49/61 mono-infezione VRS 12/61 coinfezione VRS+RV</p>	<p>Durata ricovero, Durata TIP, Durata ossigenoterapia, Durata supporto respiratorio</p>	<p>Nei pazienti con monoinfezione da VRS l'elevata carica VRS è fattore di rischio per aumentata durata ricovero (OR 3.23, $p = 0.012$), aumentata durata ricovero TIP (OR 2.03, $p = 0.036$), aumentata durata ossigenoterapia (OR 2.96, $p = 0.011$), aumentata durata supporto respiratorio (OR 1.84, $p = 0.021$), Nei pazienti con co-infezione VRS+RV</p>

				l'elevata carica VRS è fattore di rischio per aumentata durata ossigenoterapia (OR 4.78, p = 0.017)
--	--	--	--	---

Tabella 2: riassunto dei lavori con risultati a favore di una correlazione diretta tra carica del VRS e severità clinica dell'infezione.

Autore e anno, Paese, Periodo di arruolamento	Tipologia di studio, Popolazione campione dello studio, Materiale biologico collezionato ed analizzato Criteri di esclusione	Dimensioni del campione, Frequenze sottogruppi	Outcome analizzati	Risultati (valore p)
Piedra et al., 2017, ⁷⁴ USA, Ott 2010 – Apr 2011	Studio prospettico, cross-sectional, Bambini ≤ 2 anni con diagnosi di bronchiolite in PS, Liquido da lavaggio nasale all'ingresso con analisi quantitativa del numero di copie espresso di 5 diversi geni del VRS (NS1, NS2, N, F e G) Nessun criterio di esclusione	112 pazienti, 79/112 infezione da VRS, 41/79 ospedalizzati, 38/79 non ospedalizzati	Ospedalizzazione, SatO ₂	Correlazione significativa tra elevata carica genomica VRS (tranne che gene F) e non-ospedalizzazione (p = 0.01 – 0.04), Correlazione significativa tra elevata carica genomica VRS (geni NS1, NS2, N) e valori maggiori di SatO ₂ (p = 0.03)
Thwaites et al., 2018, ⁷⁵ Gran Bretagna, Ott 2016 – Mar 2017	ND tipologia dello studio (supposto prospettico), Bambini 2 settimane – 2 anni e peso > 2 Kg ricoverati con bronchiolite virale (conferma con ricerche PCR), AFN fino a due volte al giorno durante ricovero con carica virale VRS espressa come VRS-RNA copie/mL Criteri di esclusione: Qualunque fattore influenzante la sicurezza dell'aspirato e del risultato (es. epistassi), presenza di nasocannule, cure palliative, altre patologie respiratorie	55 pazienti 30/55 con VRS, 12/30 bronchiolite severa (ricovero TIP), 18/30 bronchiolite moderata (ricovero degenza ordinaria)	Severità definite dalla tipologia di ricovero (TIP o degenza ordinaria)	Carica VRS significativamente più elevata nei casi moderati, rispetto che nei casi severi (P = 0.001), con significativo decremento della carica VRS nei pazienti severi rispetto ai pazienti moderati (P = 0.001)
Garcia-Mauriño et al., 2019, ⁷⁶ USA, 2015 – 2017	Studio prospettico, Bambini sani < 2 anni ricoverati o valutati in ambulatorio per infezione da VRS, Tampone nasale solo alla diagnosi nei pazienti ambulatoriali, all'ingresso e quotidianamente durante ricovero fino alla dimissione, con carica virale VRS espressa come log ₁₀ VRS- RNA copie/mL Criteri di esclusione: Durata patologia > 7 giorni, prematurità, patologie croniche sottostanti (es. BDP, CC, ID), terapia con immunomodulatori (compresi CSS) > 5 giorni nelle 2 settimane precedenti, precedente storia di wheezing, pregresso ricovero per bronchiolite da VRS	150 pazienti con infezione da VRS, 111/150 ospedalizzati 39/150 ambulatoriali	Ospedalizzazione, Score clinico specificato dallo studio, Necessità di ossigenoterapia	Correlazione significativa tra elevata carica VRS e pazienti ambulatoriali (= non-ospedalizzazione) (p = 0.003), e valori inferiori di score clinico (= minor severità) nei pazienti ambulatoriali (p = 0.0002), tra elevata carica VRS e minore necessità di ossigenoterapia negli ospedalizzati (p = 0.04)

Tabella 3: riassunto degli studi con risultati a favore di una correlazione inversa tra carica del VRS e severità clinica dell'infezione.

Autore e anno, Paese, Periodo di arruolamento	Tipologia di studio, Popolazione campione dello studio, Materiale biologico collezionato ed analizzato Criteri di esclusione	Dimensioni del campione, Frequenze sottogruppi	Outcome analizzati	Risultati (valore p)
Wright et al., 2002, ⁶⁰ USA, 1990 – 1994	Studio prospettico multicentrico, trial randomizzato controllato in doppio cieco, Bambini ≤ 2 anni ricoverati per bronchiolite da VRS, Liquido da lavaggio nasale o aspirato endotracheale all'ingresso e quotidianamente durante ricovero con quantitativo colturale VRS espresso come \log_{10} PFU/mL Criteri di esclusione: CC scompensata, FC, ID, insufficienza renale, wheezing ricorrente, pazienti ventilatore-dipendenti, aspettativa di vita < 6 mesi, apnea in assenza di infezione delle basse vie aeree, terapia con Ig endovena nei 2 mesi precedenti, terapia con Ribavirina nel mese precedente	77 pazienti, 33/77 bambini sani, 18/77 bambini con CC \pm BDP \pm prematurità, 11/77 bambini con BDP \pm prematurità, 15/77 bambini con prematurità (nati < 32 settimane)	Score relativo a patologie respiratorie non specificato dallo studio	Nessuna correlazione tra severità clinica (misurata con score non specificato) e quantitativo colturale VRS ($p > 0.05$)
Van Leeuwen et al., 2012, ⁶⁵ Paesi Bassi, 2006 – 2007	Studio cross-sectional, Bambini ≤ 2 anni ospedalizzati per infezione delle basse vie aeree, AFN all'ingresso con carica virale VRS espressa dal valore PCR-CT (correlazione inversa tra carica virale e valore CT)	120 pazienti, 98/120 con AFN positivo, 58/98 infezione da VRS, 27/98 infezione da RV, 11/98 infezione da VRS+RV	Durata ricovero	Correlazione ai limiti della significatività tra elevata carica virale e maggiore durata ricovero ($p = 0.05$)
de Souza et al., 2016, ⁷⁰ Brasile, Set 2010 – Ago 2011	Studio cross-sectional, Lattanti ≤ 1 anno ospedalizzati per bronchiolite da VRS, Liquido da lavaggio nasofaringeo all'ingresso con carica virale VRS espressa come VRS-RNA copie/mL Criteri di esclusione: BDP, CC, FC, bronchiolite obliterante, infezione da Bordetella pertussis, pregressa terapia con macrolidi	110 pazienti, 56/110 campioni con analisi carica virale VRS	Durata wheezing, Durata ricovero, Durata ossigenoterapia	Nessuna correlazione tra carica VRS e durata wheezing ($p > 0.05$), durata ricovero ($p > 0.05$), durata ossigenoterapia ($p > 0.05$)
Yan et al., 2017, ⁷¹ Cina, Dic 2011 – Nov 2012	Studio prospettico, Bambini ospedalizzati per infezione delle basse vie aeree, AFN all'ingresso con carica virale VRS espressa come VRS-RNA copie/mL Nessun criterio di esclusione	387 pazienti, 160/387 con bronchiolite, VRS 1° patogeno causa di bronchiolite (ND frequenza casi)	Score clinico specificato dallo studio	Nessuna correlazione tra carica virale VRS e severità clinica definita dagli elementi clinici specificati dallo studio ($p > 0.05$)

<p>Watanabe et al., 2022,⁷⁸ Brasile, Mar – Ago 2019</p>	<p>Studio prospettico, Bambini < 2 anni ospedalizzati per bronchiolite da VRS, Tampone nasofaringeo all'ingresso e quotidianamente durante ricovero fino alla dimissione, poi 1 volta/settimana fino a negativizzazione, con carica virale VRS espressa come VRS-RNA copie/mL</p> <p>Criteri di esclusione: Uso di Palivizumab, mancata adesione al follow-up</p>	<p>38 pazienti, 247 tamponi in totale (tra arruolamento e follow-up, media di 4.4 tamponi a paziente)</p>	<p>Ricovero in TIP, Necessità di intubazione, durata ricovero</p>	<p>Nessuna correlazione significativa, né alcuna differenza significativa dei valori ai vari time- point dei tamponi, tra carica virale VRS e ricovero in TIP ($p > 0.05$) né tra carica virale VRS e necessità di intubazione ($p > 0.05$), né tra carica virale VRS e durata ricovero ($p > 0.05$)</p>
--	--	---	---	--

Tabella 4: riassunto degli studi i cui risultati evidenziano assenza di correlazione tra carica del VRS e severità clinica dell'infezione.

1.2.2 Interazione VRS-ospite: ruolo della risposta immunitaria ed infiammatoria dell'ospite

Risultati così variegati in merito all'associazione tra carica virale e severità clinica della bronchiolite da VRS lasciano facilmente intuire che questo fattore non sia l'unico coinvolto nel determinare il decorso di questa patologia. Negli anni è emersa la consapevolezza che a giocare un ruolo determinante sulla severità dell'infezione è anche l'interazione tra il VRS e l'ospite, a causa dell'attivazione in quest'ultimo dell'immunità cellulare ed umorale, nonché della cascata di citochine infiammatorie coinvolte in un delicato quanto complesso meccanismo atto a contenere e rimuovere la replicazione virale senza esplodere in una risposta citotossica incontrollata. I dettagli dei pathway immunologici ed infiammatori coinvolti nell'infezione da VRS non sono ancora ben del tutto chiariti, così come non è del tutto chiaro in che modo essi possano contribuire a diversi gradi di severità clinica dell'ospite nel corso dell'infezione da VRS.

Una volta che il VRS infetta le cellule dell'epitelio respiratorio, nell'ospite si attiva come iniziale difesa l'immunità cellulare innata, costituita in primis da macrofagi alveolari, cellule dendritiche, monociti, granulociti neutrofili, linfociti natural killer (NK) che si accumulano nello spazio peribronchiale con lo scopo di eliminare le cellule colpite dal virus per contenere e rimuovere l'infezione, determinando al tempo stesso la produzione e l'accumulo di materiale infiammatorio e citonecrosi con rischio di ostruzione meccanica delle vie aeree.

Ad influire sull'equilibrio tra contenimento dell'infezione e sviluppo di danno infiammatorio è la bilancia immunologica costituita da due piatti: la risposta immunitaria ed infiammatoria di tipo "Th1" e quella di tipo "Th2". Gli elementi cellulari e molecolari che costituiscono la risposta Th1 determinano una risposta pro-infiammatoria che mira a rimuovere il virus, ma al costo della citonecrosi della cellula ospite. La risposta Th2 rappresenta il "freno" regolatore per la Th1, essendo costituita da elementi cellulari e molecolari di tipo regolatorio, che mirano ad inibire la risposta Th1 e favorire la riparazione cellulare, col rischio tuttavia di ritardare la clearance virale e determinare indirettamente un'estensione del danno prima della rimozione definitiva.^{79,80}

Studi recenti stanno portando alla comprensione di una prevalenza di un tipo di risposta piuttosto che dell'altra per predisposizione individuale, nonché per fisiologica preponderanza di una tipologia di risposta a seconda dell'epoca di vita considerata. E' del 2019 (Vu et al.) uno studio prospettico condotto su 93 lattanti affetti da bronchiolite VRS (30 ricoverati in TIP, pertanto considerati affetti da infezione severa, i rimanenti 63 considerati con infezione moderata) che documenta come a quest'età prevalga la risposta Th2 in corso di infezione da VRS e come questa sia paradossalmente associata a decorso clinico severo tanto più sono presenti in circolo i mediatori di questo pathway a causa di una ritardata clearance virale che provoca inevitabilmente un'estensione del danno.^{80,81}

I macrofagi alveolari sono tra i protagonisti della fase iniziale della risposta all'infezione respiratoria da parte del VRS. A seconda dei markers espressi e delle funzioni svolte, queste cellule possono esprimere diversi fenotipi, classicamente ne vengono riconosciuti due che ne rappresentano gli estremi: il fenotipo M1, o pro-infiammatorio, i cui elementi sono deputati alla fagocitosi delle cellule infette ed al rilascio di citochine infiammatorie quali TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, ed il fenotipo M2, costituito da macrofagi con funzioni regolatorie, che inibiscono l'infiammazione e stimolano la riparazione cellulare mediante produzione di IL-4, IL-10, IL-13. Questa suddivisione riflette i profili immunologici Th1 e Th2 precedentemente descritti, ed anzi il fenotipo M1 è attivato nel contesto della prevalenza del profilo Th1, il fenotipo M2 nel contesto del Th2. Ne consegue che la mancata stimolazione di risposta Th1 e la prevalenza del profilo Th2 nel lattante con infezione da VRS possa esplicitarsi anche nella prevalenza del fenotipo M2 a livello delle vie respiratorie (sebbene ancora non siano stati condotti studi in merito).⁸⁰

Altra popolazione cellulare immunitaria che risiede nelle vie aeree e si attiva a fronte dell'infezione da VRS è quella delle cellule dendritiche (suddivisa a sua volta in cellule dendritiche mieloidi –

mDC, e plasmacitoidi – pDC) che in uno studio condotto su bambini < 3 anni ospedalizzati per infezione da VRS si presentano con livelli di questa popolazione cellulare significativamente aumentati all'aspirato nasale rispetto a controlli sani di pari età (valori medi di mDC e di pDC su aspirato pari rispettivamente a 3040 mDC e 628 pDC per campione nei soggetti con bronchiolite e di 177 mDC e 101 pDC nei controlli sani; $p < 0.05$ per entrambi i confronti). Non solo, ma dall'analisi dei livelli di dendriti nel sangue emerge invece una riduzione significativa rispetto ai controlli sani (valori medi di 5320 mDC/mL e 4900 pDC/mL nei soggetti con bronchiolite e di 22780 mDC/mL e 15980 pDC/mL nei controlli sani; $p < 0.003$ per entrambi i confronti). Questi dati documentano il passaggio che avviene dal circolo ematico alle vie aeree a protezione di queste ultime in risposta all'infezione da VRS.^{80,82}

Protagonista della risposta all'infezione da VRS assieme agli elementi appena citati è la popolazione costituita dalle cellule linfoide innate del gruppo 2 (ILC2). Il loro ruolo è cruciale nell'attivazione della risposta di tipo Th2, e non è un caso se la presenza di ILC2 risulta significativamente aumentata nei campioni di aspirato nasale dei 30 lattanti ricoverati in TIP (bronchiolite da VRS severa) rispetto ai 63 non ricoverati in TIP (bronchiolite moderata) nello studio già citato del Dr. Vu ($p = 0.004$).⁸¹ Rilasciando in circolo l'interleuchina IL-13, le cellule ILC2 danno l'avvio alla risposta immunitaria di tipo Th2, richiamando in situ gli altri elementi come le cellule dendritiche e promuovendo la differenziazione e l'arrivo di linfociti T e B specifici di tale pattern di risposta immunitaria (i T e B regolatori, o Treg e Breg).⁸⁰

I linfociti Treg (suddivisi in Treg attivati – aTreg e Treg a riposo – rTreg) rappresentano la branca cellulare principale della risposta immunosoppressiva Th2, che mira a ridurre la risposta infiammatoria Th1 e favorire la rigenerazione cellulare. La loro presenza risulta fondamentale sin dalla gravidanza perché inibisce il rigetto del feto da parte dell'organismo materno ed è provato l'aumento quantitativo di questa popolazione cellulare all'interno del feto nel corso dei mesi di gestazione (di fatto, è noto che i neonati pretermine abbiano livelli meno significativi dei nati a termine di linfociti Treg). Nel corso dell'infezione da VRS il livello di questi linfociti nel sangue diminuisce, probabilmente per traslocazione degli stessi nelle vie aeree.

Analogamente ai Treg, anche i linfociti Breg inibiscono la risposta infiammatoria tramite il rilascio di citochine quali IL-10 e IL-35, che favoriscono la differenziazione dei macrofagi alveolari in tipologia soppressiva (M2), ostacolano il reclutamento delle cellule dendritiche ed inibiscono il rilascio di altre molecole pro-infiammatorie quali IFN- γ . Questo tipo di cellule tende a ridursi con l'aumento dell'età e potrebbe giustificare almeno in parte perché ad essere a rischio di infezione grave da VRS siano i soggetti più giovani.⁸⁰

I granulociti neutrofili rappresentano la popolazione cellulare maggiormente riscontrata già nei primi studi specificatamente condotti su secrezioni respiratorie ottenute da lattanti con infezione da VRS ed è documentata la loro associazione con il danno meccanico alle vie aeree conseguente all'infezione grave e la verosimile associazione con il successivo sviluppo di wheezing, così come è altrettanto consolidato nel tempo il riscontro dell'attivazione degli eosinofili nelle vie aeree nelle fasi successive all'infezione da VRS.⁷⁹

Dagli studi che hanno focalizzato l'attenzione sulle citochine infiammatorie, ancora una volta emerge come uno sbilanciamento della risposta Th2, caratterizzato da un aumentato rapporto IL-4/IFN- γ o IL-10/IL-12 sia presente non solo quando viene effettuato il confronto tra soggetti con infezione da VRS e controlli sani, ma anche quando si vanno ad analizzare i casi maggiormente severi dal punto di vista clinico all'interno dei soggetti infetti.⁸⁰

Per quanto riguarda l'analisi su sangue è dimostrato l'aumento significativo di citochine tipiche della risposta Th2 quali IL-6, IL-10, IL-12, IL-13 e IL-35 nei pazienti con infezione da VRS rispetto ai controlli sani, mentre nel già citato studio di Vu et al., il quantitativo di citochine tipiche

della risposta Th2 quali IL-1 β IL-4, IL-6, IL-10, IL-13 ed IL-33 risulta significativamente maggiore nell'aspirato ottenuto dai 30 pazienti ricoverati in TIP (bronchiolite severa) rispetto ai 63 non ricoverati in TIP (bronchiolite moderata). In particolare, i lattanti con maggiori livelli di IL-4 e IL-1 β sono quelli risultati a maggior rischio di infezione severa da VRS (rispettivamente con OR 6.71, IC 95% 2.06-21.89; $p = 0.002$ e OR 2.23, IC 95% 1.24-4.00, $p = 0.007$).^{80,81,83}

Risultati interessanti emergono inoltre da uno studio già citato (Thwaites et al.) in cui vengono collezionati gli aspirati faringonasali di 55 pazienti ricoverati per bronchiolite di origine virale, 30 dei quali con infezione da VRS, 12 dei quali con infezione severa perché necessitanti di ventilazione meccanica (i rimanenti 18 classificati come infezione moderata). Più che sui risultati già riportati in termini di analisi della carica virale, sorprendentemente meno elevata nei casi più severi, questo studio lavora focalizza l'attenzione sul riscontro di una maggiore espressione di mucina-5AC – MUC5AC e di IL-17A (livelli significativamente maggiore nei pazienti con bronchiolite severa, rispettivamente $p = 0.04$ e $p = 0.03$). Sebbene il ruolo principale delle mucine sia essenzialmente protettivo al fine di garantire una clearance mucociliare efficace nelle alte e basse vie aeree con pronta rimozione dei patogeni respiratori, sembra che l'infezione da VRS, associandosi alla maggior espressione di sottotipi di mucine specifici come MUC5AC, determini una maggiore viscosità delle secrezioni, che potrebbe paradossalmente inficiare la clearance mucociliare e provocare un maggior impegno respiratorio e peggior decorso clinico del paziente. Il riscontro di elevati livelli di un sottotipo di IL-17, interleuchina associata alla produzione di muco, corroborerebbe questa ipotesi.^{75,80}

Non solo: l'attivazione dell'IL-17A sembra essere associata, oltre che allo stimolo di produzione di muco, anche all'attivazione di un altro profilo immunologico-infiammatorio, il Th17 (anche detto "Th3"), che sembra avere un ruolo chiave nell'asma e nella broncoreattività asmatiche di origine virale. Questo dato potrebbe essere alla base, almeno in parte, della relazione spesso osservata tra bronchiolite da VRS e successivo sviluppo di wheezing.⁷⁹

Infine, l'attivazione infiammatoria nel corso dell'infezione da VRS sembra essere correlata ed influenzata dalla popolazione microbica già presente nell'ospite (microbioma).

In uno studio condotto su 74 lattanti ricoverati per bronchiolite severa, incrociando l'analisi del microbioma presente e delle citochine infiammatorie rilasciate negli aspirati nasotracheali raccolti si evidenzia la preponderanza di specie batteriche come Haemophilus, associata ad elevati livelli di CXCL8 negli aspirati ($r = 0.246$, $p = 0.037$), e Moraxella, associata ad elevati livelli di IL-6 ($r = 0.236$, $p = 0.046$) e IL-10 ($r = 0.266$, $P = 0.024$). Nello stesso studio elevati livelli di lipopolisaccaride – LPS risultano correlati con aumento dei livelli di IL-17A ($r = 0.260$, $p = 0.028$).⁸³

Anche il microbioma sembra dunque rivestire un ruolo chiave nella complessa interazione tra VRS ed ospite nel corso dell'infezione, e tale argomento verrà trattato nel dettaglio nei prossimi paragrafi.

1.3 Microbiota

Il microbiota commensale del cavo orale, delle vie aeree e gastrointestinale si sviluppa fin dal periodo perinatale ed evolve nel corso della vita del soggetto, influenzato da molteplici fattori ambientali, in primis il passaggio o meno dal canale del parto materno alla nascita.⁸⁰

Studi recenti hanno evidenziato che il microbiota del lattante sano è composto sostanzialmente da 6 generi di batteri: 2 Gram-negativi (Moraxella e Haemophilus) e 4 Gram-positivi (Staphylococcus, Corynebacterium, Streptococcus e Alloiococcus). La composizione relativa del microbiota cambia nel corso dell'età: se ai 2 mesi di vita circa il microbiota del lattante risulta composto prevalentemente da batteri dei generi Staphylococcus e Corynebacterium, verso l'anno di vita si assiste ad un fisiologico incremento di Moraxella e Alloiococcus.⁸⁴

Altri lavori hanno documentato che l'allattamento al seno materno contribuisce ad arricchire il microbiota del lattante, con un conseguente aumento dei generi Dolosigranulum e Corynebacterium, che è stato ipotizzato svolgano un ruolo protettivo nei confronti di infezioni respiratorie.⁸⁰

Fondamentali sono inoltre i cambiamenti che il microbiota subisce a causa dell'esposizione ad antibiotici, che vede l'incremento di batteri potenziali patogeni delle vie aeree quali Haemophilus, Streptococcus e Moraxella ed una riduzione di generi associati a ruolo protettivo quali Corynebacterium e Alloiococcus. Proprio la colonizzazione nel lattante sano da parte di batteri quali Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae e Moraxella catarrhalis correla in alcuni lavori con lo sviluppo di wheezing ricorrente in età prescolare ed asma in età scolare. D'altronde, l'incremento di queste popolazioni batteriche è risultato associato ad uno sbilanciamento verso la risposta Th2 nelle analisi delle cellule e citochine protagoniste della risposta immunologica nei soggetti studiati, e tale sbilanciamento è notoriamente legato allo sviluppo di wheezing e asma. La colonizzazione da parte di queste popolazioni batteriche è favorita non solo dall'esposizione ad antibiotici, ma si verifica anche (transitoriamente) in corso di infezioni a carico delle vie respiratorie.⁸⁴

In anni recenti si è sviluppata una branca della ricerca volta ad analizzare le peculiarità del microbiota nel lattante con bronchiolite e a studiare l'associazione con il successivo sviluppo di wheezing ed asma.

1.3.1 Microbiota e bronchiolite

La maggior parte dei lavori relativi a questo ambito di ricerca derivano ancora una volta dall'ampio studio prospettico multicentrico (il cosiddetto 35th Multicenter Airway Research Collaboration – MARC-35) sviluppato successivamente al MARC-30 già citato nell'analisi della correlazione tra carica del VRS e decorso clinico della bronchiolite. La nuova versione dello studio è stata condotta in 235 ospedali di 17 siti cittadini di 14 Stati del continente nordamericano e ha visto l'arruolamento tra il 2011 ed il 2014 di più di 2000 bambini di età inferiore ai 2 anni ospedalizzati per bronchiolite (con diagnosi clinica posta secondo i criteri dell'AAP). Sono esclusi dallo studio lattanti arruolati in versioni precedenti dello studio o arruolati dopo più di 24 ore dall'ospedalizzazione, nonché pazienti nati < 32 settimane di EG o con cardiopatia o pneumopatia o immunodeficit o stato di immunosoppressione noti.

Il primo lavoro è del 2014 (Hyde et al.) e consiste nell'analisi, mediante amplificazione delle regioni ipervariabili V3, V4 e V5, del DNA batterico rinvenuto dall'aspirato nasofaringeo di 100 pazienti della coorte MARC-35 per testare l'ipotesi di un'associazione tra prevalenza nel microbiota delle alte vie aeree di batteri appartenenti al phylum dei Proteobacteria, il tipo di patogeno alla base della bronchiolite presentata dai pazienti (VRS, RV, entrambi) e la presenza di wheezing al momento del ricovero.

Per la prima associazione, i dati sembrano essere a favore di una correlazione tra presenza nel microbiota di alcuni proteobatteri (*H. influenzae* e *M. catarrhalis*) e bronchiolite da VRS o da RV. In particolare, viene riferita un'associazione tra presenza di *H. influenzae* nel microbiota e bronchiolite da VRS (in mono- o in co-infezione con VRS, mentre *H. influenzae* non risulta associato a mono-infezione da RV). Tuttavia, il lavoro non riporta analisi statistiche in merito a questa prima osservazione, di cui gli Autori suggeriscono un'ambivalenza di direzione causale, non potendo discriminare se sia la bronchiolite virale a promuovere la presenza di questi batteri nel microbiota o se viceversa sia un microbiota così peculiare a predisporre il soggetto allo sviluppo di bronchiolite in corso di infezione virale.

Più interessante è il confronto delle popolazioni microbiche tra pazienti con wheezing all'ospedalizzazione, in cui emerge un significativo incremento di *M. catarrhalis* rispetto ai pazienti senza wheezing al ricovero (10.3% vs. 3.64%, $P=0.009$).⁸⁵

Forti di queste prime evidenze, gli Autori ritornano sull'argomento con l'analisi del sottogruppo di 1005 lattanti di età inferiore a 1 anno appartenenti alla coorte MARC-35 ed ospedalizzati per bronchiolite. Di questo campione di popolazione analizzano la composizione del microbiota ottenuto dall'amplificazione della regione V4 del DNA batterico da aspirato nasofaringeo raccolto entro 24 ore dall'ospedalizzazione. Dall'analisi emergono due phyla batterici prevalenti: quello dei Firmicutes, i cui generi prevalenti sono rappresentati da *Streptococcus* (84%) e *Staphylococcus* (6%, alla luce di questa bassa prevalenza gli Autori considerano solo il genere *Streptococcus* come dominante il phylum dei Firmicutes), e quello dei Proteobacteria, di cui prevalgono i generi *Haemophilus* (55%) e *Moraxella* (37%). Tra i lattanti inclusi nello studio ve ne sono 740 di cui viene identificato il patogeno della bronchiolite: VRS (580 casi), RV (60 casi), co-infezione da VRS+RV (100 casi). Gli Autori valutano l'eventuale associazione tra queste 3 categorie di patogeni e l'abbondanza relativa di determinati genera batterici del microbiota.

Dall'analisi emerge che i lattanti con infezione da VRS presentano un'elevata abbondanza del genus *Streptococcus* ed una ridotta presenza dei genera *Haemophilus* e *Moraxella* ($p < 0.001$), al contrario i lattanti con bronchiolite da RV hanno un'elevata abbondanza dei genera *Haemophilus* e *Moraxella* ed una ridotta presenza del genus *Streptococcus* ($p < 0.001$), mentre i casi con coinfezione VRS+RV presentano livelli intermedi di tutti i genera considerati.

Valore aggiunto di questo studio consiste nella decisione degli Autori di provare a replicare i risultati per ottenere una validazione esterna analizzando il materiale ottenuto da 307 lattanti di età < 1 anno arruolati nello studio MARC-30 già citato precedentemente, riscontrando riproducibilità delle associazioni tra patogeno virale e microbiota osservate nel lavoro principale. La riproducibilità dei risultati in differenti coorti avvalorata la solidità dei dati, secondo gli Autori, che non sanno tuttavia assegnare una direzionalità nel rapporto ambivalente di causalità tra batteri e virus nello sviluppo del fenotipo clinico della bronchiolite in corso di infezione.⁸⁶

Lo stesso gruppo di lavoro pubblica dopo pochi mesi una nuova analisi del microbiota del sottogruppo di 1005 lattanti del MARC-35 (sempre da amplificazione della regione V4 del DNA batterico rinvenuto da aspirato nasofaringeo raccolto entro 24 ore dall'ospedalizzazione), effettuando questa volta la clusterizzazione dei generi batterici riscontrati e distinguendo 4 profili di microbiota: quello *Haemophilus*-dominante (19.2% dei casi), quello *Moraxella*-dominante (21.9%), quello *Streptococcus*-dominante (28.2%) ed infine un profilo misto (30.7%) ove manca la predominanza di uno dei 3 generi citati, mentre risultano presenti anche altri generi batterici quali *Prevotella*, *Alloprevotella* e *Veillonella*. Questa volta, lo studio va ad analizzare l'associazione tra i 4 profili e specifici outcome clinici quali la necessità di cure intensive (intesa come bisogno di ricovero in TIP o di supporto ventilatorio non invasivo o meccanico e che rappresenta un evento che coinvolge 161 lattanti della coorte considerata) e la durata di degenza ≥ 3 giorni.

Appurato che la prevalenza di entrambi gli outcome considerati è maggiore per i pazienti con profilo *Haemophilus*-dominante e minore per quelli con profilo *Moraxella*-dominante, gli Autori utilizzano quest'ultimo come riferimento per calcolare OR di rischio per gli outcome dello studio. Conducono poi diverse analisi, tra cui di nostro interesse è la multivariata stratificata per patogeno virale causativo della bronchiolite (693 lattanti con infezione da VRS) corretta per 10 variabili confondenti paziente-relate (tra cui età, genere, etnia, ma anche utilizzo di terapia antibiotica o steroidea). Da questa analisi emerge un rischio significativamente maggiore di ricorso a cure intensive per i lattanti con profilo *Haemophilus*-dominante (OR 2.60; IC 95% 1.15–5.86; $p = 0.02$), così come significativamente maggiore è il rischio di durata di degenza ≥ 3 giorni per lo stesso profilo (OR 3.56; IC 95% 2.02–6.29; $p < 0.001$).

Anche in questo lavoro viene ottenuta una validazione esterna dei risultati mediante riproduzione degli stessi sul materiale ottenuto dai 307 lattanti dello studio MARC-30.⁸⁷

Lo stesso gruppo di lavoro pubblica poi un altro studio che prende in esame, per la prima volta nella letteratura relativa alla bronchiolite, il microbiota intestinale. Gli Autori conducono uno studio caso-controllo arruolando come casi 40 lattanti < 1 anno ospedalizzati per bronchiolite (26 dei quali con infezione da VRS, 9 con infezione da RV) ed associando 115 controlli sani età-relati. Di questa coorte analizzano il microbiota intestinale mediante amplificazione della regione V4 di DNA batterico da tampone fecale ottenuto all'arruolamento.

Dalla clusterizzazione del microbiota emergono 4 distinti profili di generi batterici: *Escherichia*-dominante (30%), *Bifidobacterium*-dominante (21%), *Enterobacter/Veillonella*-dominante (22%) e *Bacteroides*-dominante (28%). Esaminando la prevalenza di questi profili nel gruppo dei casi (bronchiolite), il profilo *Enterobacter/Veillonella*-dominante risulta essere quello con prevalenza minore in assoluto (15%) e viene pertanto utilizzato come profilo di riferimento per le analisi successive. Il profilo *Bacteroides*-dominante figura invece come quello con prevalenza maggiore nel gruppo dei casi e risulta essere significativamente associato al rischio di bronchiolite (OR 4.59; IC 95% 1.58–15.5; $p = 0.008$). Tale associazione rimane significativa anche all'analisi multivariata corretta per fattori legati all'ospite (OR 3.89; IC 95% 1.19–14.6; $p = 0.03$) ed anche all'analisi di sensibilità corretta per numerose co-variabili (tra cui l'età del paziente, il genere, ma anche l'esposizione a terapia corticosteroidica; OR 4.12; IC 95% 1.28–15.2, $p = 0.02$). Infine, all'analisi del metodo lineare discriminante effect size il genere *Bacteroides* continua a risultare positivamente associato alla probabilità di sviluppo di bronchiolite ($p < 0.05$), mentre il genere *Veillonella* (utilizzato come riferimento per le precedenti analisi) si conferma essere negativamente associato a tale probabilità ($p < 0.05$).

Gli Autori avanzano diverse ipotesi per spiegare i risultati ottenuti: la prevalenza del genere *Bacteroides* nel microbiota intestinale potrebbe semplicemente rappresentare un marker del lattante

predisposto allo sviluppo di bronchiolite in corso di infezione da parte di patogeni respiratori, ma potrebbe anche svolgere un ruolo attivo in tale predisposizione, inibendo lo sviluppo di un adeguato sistema immunitario, non solo a livello intestinale, ma anche in altri siti mucosali, come quello respiratorio. Questa ipotesi trova riscontro nei lavori in letteratura che affermano la possibilità di una “risposta mucosale comune” per cui l’esposizione ad antigeni in un sito mucosale (ad esempio quello intestinale), tramite l’attivazione del sistema immunitario circolante potrebbe arrivare ad influire anche su altre mucose (ad esempio quelle dell’apparato respiratorio). Da ultimo, gli Autori non possono escludere che sia invece l’infezione respiratoria scatenante l’evento bronchiolite ad influire sulla composizione del microbiota intestinale, favorendo la prevalenza del genere *Bacteroides*.

Ultima osservazione interessante consiste nel fatto che proprio il profilo *Bacteroides*-dominante si associa ad elevata ricchezza di specie batteriche e di α -diversity ($p < 0.001$). Alla luce di questo dato, gli Autori mettono in discussione la nota idea che un’elevata ricchezza di specie batteriche sia sempre protettiva nei confronti di sviluppo di patologie, suggerendo invece che in alcuni casi una deplezione batterica, con predominanza di specifici genera (microbiota resiliente), potrebbe giocare un ruolo protettivo nei confronti dello sviluppo di alcune patologie.⁸⁸

Sempre nel 2016 vengono invece pubblicati tre lavori che analizzano coorti di pazienti non appartenenti allo studio MARC-35.

Il primo dei tre (Rosas-Salazar et al.) è uno studio osservazionale prospettico condotto su 132 lattanti di età inferiore ai 6 mesi estrapolati da una più ampia coorte di bambini sani nati tra giugno e dicembre, arruolati nel periodo perinatale, e considerati in questo lavoro in occasione della prima infezione accertata da VRS, confrontata con controlli sani. Dei 99 lattanti con infezione da VRS confermata con PCR il microbiota viene analizzato (mediante amplificazione delle regioni V1-V3 del DNA batterico) da lavaggio nasale, mentre per i rimanenti 33 controlli sani il campione biologico di riferimento consiste in un tampone a secco raccolto all’arruolamento.

Dal confronto emerge che il microbiota dei lattanti con infezione da VRS è caratterizzato da un’abbondanza relativa significativamente maggiore rispetto ai controlli sani per 3 genera batterici: *Haemophilus* (base mean = 1384; q-value = 1.96×10^{-27}), *Moraxella* (base mean = 2075; q-value = 4.77×10^{-7}) e *Streptococcus* (base mean = 2991; q-value = 7.15×10^{-5}). Nei controlli sani, risultano significativamente più abbondanti altri 2 genera batterici: *Staphylococcus* (base mean = 265.1; q-value = 2.14×10^{-3}) e *Corynebacterium* (base mean = 1694; q-value = 1.39×10^{-3}). Questi risultati si confermano all’analisi del sottogruppo di lattanti di età compresa tra le 3 e le 20 settimane (37 pazienti con infezione da VRS, 21 controlli sani), dimostrando che le differenze osservate in termini di composizione del microbiota non sono influenzate dall’età dei pazienti.

Nelle conclusioni, gli Autori osservano che i generi batterici predominanti nei lattanti con infezione da VRS (*Haemophilus*, *Moraxella* e *Streptococcus*) sono quelli che in letteratura risultano associati ad aumentato rischio di insorgenza di asma durante l’infanzia e suggeriscono che il VRS potrebbe correlare con l’aumentato rischio di asma proprio attraverso queste specifiche modifiche di composizione del microbiota nei lattanti che sperimentano l’infezione.⁸⁹

Lo stesso gruppo di lavoro pubblica sempre nel 2016 un altro studio volto a testare l’ipotesi che infezioni respiratorie causate da determinati patogeni si accompagnino a specifiche modifiche nel microbiota nasofaringeo. Conducono quindi uno studio prospettico osservazionale che consiste nell’analisi di un sottogruppo di 135 bambini estrapolati da una più ampia coorte arruolata all’interno dello studio INSPIRE (Infant Susceptibility to Pulmonary Infections and Asthma Following RSV Exposure), soggetti nati a termine, arruolati nel periodo perinatale e valutati ogni 2 settimane durante tutta la loro prima stagione invernale della vita. I 135 lattanti considerati in questo studio ricevono diagnosi di prima infezione delle vie aeree e presentano mono-infezione da VRS

(83 casi) o da RV (52 casi). L'analisi del microbiota nasofaringeo viene condotta mediante amplificazione della regione V4 del DNA batterico da lavaggio nasale.

Dal confronto del microbiota tra i due gruppi considerati (infezione da VRS vs RV) emerge che in corso di infezione da VRS i lattanti dello studio presentano un'abbondanza significativamente maggiore del genere *Staphylococcus* (adjusted base mean 264.32; $q < 0.001$) ed una tendenza, sebbene non statisticamente significativa, ad un'abbondanza maggiore del genere *Haemophilus* (adjusted base mean 3907.14; $q = 0.06$).

Gli Autori sottolineano come quest'ultima tendenza, per quanto non significativa, vada a corroborare i dati riscontrati da Hyde et al. e rafforzi il concetto di specifiche alterazioni a carico del microbiota (in questo caso l'aumento del genere *Haemophilus*) in corso di infezione da determinati patogeni virali (quale il VRS).⁹⁰

Ultimo lavoro pubblicato nel 2016 (de Steenhuijsen Piters et al.) consiste in uno studio osservazionale prospettico monocentrico condotto su 106 bambini di età inferiore ai 2 anni con diagnosi di prima infezione da VRS e 26 controlli sani. Dei 106 con infezione da VRS, 84 sono ospedalizzati, i rimanenti 22 no. Novità principale di questo lavoro consiste nel volere analizzare non solo correlazioni con specifica composizione del microbiota nasofaringeo (analizzato mediante amplificazione delle regioni V5-V7 del DNA batterico rinvenuto su tampone nasofaringeo), ma anche con eventuali modifiche a carico delle componenti infiammatorie e immunitarie dell'ospite, analizzate su sangue ottenuto dai pazienti. Dall'analisi dei pazienti con infezione da VRS emerge un microbiota principalmente costituito da *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus* (principalmente *pneumoniae*), *Moraxella* (principalmente *catarrhalis*) e *Staphylococcus aureus*.

In primo luogo, gli autori analizzano l'associazione tra l'abbondanza di queste popolazioni microbiche ed outcome utili per definire la severità dell'infezione da VRS, in primis la necessità di ospedalizzazione, ma anche la durata di degenza, la necessità di ricovero in TIP, la necessità di ossigenoterapia, la correlazione con uno score clinico definito nello studio (il CDSS già citato in precedenza). Da tale analisi emerge che l'abbondanza di *H. influenzae* e *Streptococcus* correla significativamente con ospedalizzazione per infezione da VRS (rispettivamente $p = 0.005$ e $p = 0.004$), mentre l'abbondanza di *S. aureus* è inversamente associata a tale outcome ($p = 0.025$) e l'abbondanza di *Moraxella* si osserva principalmente nei pazienti con infezione da VRS non ospedalizzati (i cosiddetti "outpatients", $p = 0.034$). Non si osservano differenze significative per nessuno degli altri outcome di severità clinica, sebbene gli Autori riportino, per quanto riguarda il tasso di necessità di TIP e la durata di degenza, la tendenza a valori inferiori nei pazienti con abbondanza di *Moraxella* a differenza che per tutti gli altri (rispettivamente 18% vs 40–60% per il tasso di ricovero in TIP e 2.0 vs 3.3–3.9 giorni per la durata di degenza).

Elemento davvero interessante di questo lavoro consiste nell'analisi, per la prima volta in letteratura, del trascrittoma infiammatorio dell'ospite e della correlazione con il microbiota. All'analisi generale del trascrittoma infiammatorio si evidenzia in tutti i pazienti con infezione da VRS una sovra-espressione dei geni IFN-relati. Stratificata l'analisi per i cluster di microbiota nasofaringeo, ancora una volta emerge come sia significativamente aumentata nei pazienti con preponderanza di *H. influenzae* e *Streptococcus* rispetto agli altri cluster di microbiota l'espressione di geni legati al segnale toll-like receptor (TLR, $p = 0.005$ e $p = 0.008$ a seconda del modulo di geni analizzato), ma anche di geni legati ai granulociti neutrofili ($p = 0.042$). Quando si vanno a considerare i geni relativi agli altri elementi immuno-infiammatori dell'ospite (linfociti B, T, NK) le differenze tra cluster di microbiota non raggiungono valori statisticamente significativi, ma si osserva una generale sotto-espressione di questi moduli genetici a carico di *H. influenzae* e *Streptococcus*.

In conclusione, gli Autori ipotizzano quindi che sia proprio la presenza di determinate popolazioni microbiche quali *H. influenzae* e *Streptococcus* nel microbiota dell'ospite a favorire, in corso di infezione da VRS, una risposta pro-infiammatoria che si estrinseca nell'attivazione di citochine del

gruppo IL-6 e che contribuisce al richiamo ed attivazione dei granulociti neutrofili, esitando in una maggiore severità clinica.⁹¹

Nel corso del 2017 vengono pubblicati 5 lavori in merito all'argomento microbiota e bronchiolite, tutti relativi a studi nell'ambito della coorte MARC-35.

In un primo lavoro, Hasegawa e Colleghi conducono uno studio caso-controllo includendo 40 lattanti di età inferiore ad 1 anno ospedalizzati per bronchiolite (conseguentemente definita come "bronchiolite severa" e con campione costituito da 26 pazienti con infezione da VRS, 9 con infezione da RV, 5 con co-infezione VRS+RV) ed utilizzano come coorte di controllo un campione di 110 controlli sani età-correlati. Dal tampone nasale collezionato all'arruolamento viene effettuata l'analisi del microbiota mediante amplificazione della regione ipervariabile V4 del DNA batterico. Lo scopo dello studio consiste nel determinare eventuali associazioni tra specifiche composizioni del microbiota nasofaringeo e rischio di insorgenza di bronchiolite severa nei lattanti.

Una volta effettuata la clusterizzazione del microbiota analizzato, gli Autori identificano 4 profili: Moraxella-dominante (37%), Corynebacterium/Dolosigranulum-dominante (27%), Staphylococcus-dominante (15%) ed infine un profilo misto (20%). Dalla correlazione di prevalenza tra questi profili ed i casi di bronchiolite risulta come frequenza inferiore in assoluto quella Moraxella-dominante (14% dei casi), mentre la più elevata è quella del profilo Staphylococcus-dominante (57%), corrispondente ad un rischio di bronchiolite severa significativo (OR 7.80, IC 95% 2.64–24.9; $p < 0.001$). La significatività è mantenuta anche all'analisi multivariata ed aggiustata per patogeno virale (mono-infezione da VRS o da RV o co-infezione VRS+RV), con il profilo Staphylococcus-dominante che continua a risultare significativamente correlato al rischio di bronchiolite severa (OR 9.60; IC 95% 2.17–52.0; $p = 0.004$). All'analisi discriminante lineare effect size emerge infine che il genere Staphylococcus è positivamente associato al rischio di bronchiolite severa ($p < 0.05$), mentre i generi Moraxella, Corynebacterium, Dolosigranulum, Streptococcus e Tumblebacillus sono negativamente associati a tale rischio (per tutti i generi $p < 0.05$).

Gli Autori avanzano molteplici interpretazioni per questi risultati, ipotizzando che il genere Staphylococcus possa avere un effetto causativo diretto nella predisposizione a sviluppo di bronchiolite severa durante infezione da patogeni respiratori, ma non potendo escludere anche il contrario, ovvero che sia l'evento infettivo respiratorio a determinare un incremento dell'abbondanza di questi batteri. In maniera analoga, è possibile ipotizzare che generi quali Moraxella, Corynebacterium e Dolosigranulum potrebbero rappresentare un "microbiota di resilienza", risultando in questo studio associati a basso rischio di sviluppo di bronchiolite severa, nonché presenti in percentuali significativamente ridotte nei pazienti con profilo Staphylococcus-dominante, associato invece ad elevato rischio di gravità clinica.⁹²

Lo stesso gruppo di lavoro pubblica poi i risultati relativi all'applicazione, per la prima volta in letteratura, di un approccio multiomico alla loro coorte di studio, mirando ad integrare tra loro i dati microbiomici con quelli metabolomici nasofaringei di pazienti con bronchiolite per verificare eventuali associazioni con la severità clinica della patologia. Per fare ciò, gli Autori selezionano un sottogruppo di 144 lattanti di età < 1 anno dalla coorte MARC-35 (108 dei quali con bronchiolite da VRS, 40 con identificazione di RV come patogeno) e selezionano come outcome clinico primario di severità clinica il ricorso o meno a ventilazione a pressione positiva (VPP) durante la degenza (25 lattanti necessitano di tale supporto, i rimanenti 119 no).

Per prima cosa viene analizzato il profilo metabolomico in relazione all'outcome di severità clinica e si rende evidente che 25 metaboliti sono significativamente associati alla necessità di VPP. 20 di questi metaboliti appartengono al pathway del metabolismo sfingolipidico, che è anche quello più significativamente associato al rischio di necessità di VPP ($p < 0.001$). La significatività persiste per 19 dei 20 metaboliti di questo pathway anche dopo aver corretto l'analisi per fattori confondenti

($p < 0.05$) e ripetendo l'analisi utilizzando un altro outcome di severità clinica quale una durata di degenza ≥ 3 giorni (per 17 dei 20 metaboliti $p < 0.05$). Sebbene questo sia il primo lavoro a produrre risultati metabolomici sulla bronchiolite, questi dati trovano riscontro in letteratura, ove alcuni studi riportano significative associazioni tra aumentato metabolismo sfingolipidico ed asma nell'infanzia, suggerendo un'origine comune per l'infiammazione che sta alla base di queste patologie.

Dall'analisi del profilo microbiomico, in questa coorte di lattanti con bronchiolite si osserva la prevalenza di 3 generi batterici: *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* e *Streptococcus pneumoniae*. Incrociando i dati metabolomici con quelli microbiomici, gli Autori osservano che l'abbondanza relativa di *S. pneumoniae* correla positivamente con l'aumento dei metaboliti del pathway sfingolipidico, mentre l'abbondanza relativa di *M. catarrhalis* e *H. influenzae* si associa negativamente a questi metaboliti. Anche queste osservazioni trovano conferma in letteratura, ove precedenti lavori hanno rilevato una relazione tra abbondanza nel microbiota di *Moraxella* e ridotta severità clinica nei lattanti ospedalizzati per bronchiolite, al contrario del genere *Streptococcus* (ma anche *Haemophilus*, che invece in questo lavoro presenta risultati analoghi a *Moraxella*), spesso associato ad aumentata severità clinica.

All'analisi dei dati metagenomici non emerge alcuna correlazione significativa tra l'abbondanza metagenomica e l'intensità dei metaboliti associati a necessità di VPP, suggerendo che queste molecole siano originate dall'ospite, e non dai batteri del microbiota, durante l'evento bronchiolite. Tuttavia, gli Autori osservano una peculiare abbondanza di seril-tRNA sintetasi originata da *S. pneumoniae* e correlata con aumentata intensità di serina, substrato della sfingosina, proteina fondamentale per tutto il metabolismo sfingolipidico. Appare quindi ipotizzabile per gli Autori un ruolo di induzione da parte di *S. pneumoniae*, prevalente nel microbiota durante la bronchiolite, nell'attivazione del pathway sfingolipidico dell'ospite, con ricadute sulla severità clinica del paziente.⁹³

Lo stesso gruppo di lavoro decide poi di condurre analisi multiomiche simili a quelle appena esposte in uno studio caso-controllo che riprende, in maniera analoga ad un precedente lavoro focalizzato sul microbiota fecale, una coorte di 40 lattanti < 1 anno con bronchiolite e di 115 controlli sani età -relati. L'obiettivo questa volta è integrare per la prima volta in letteratura le analisi metabolomiche proprio con il microbiota fecale tra casi con bronchiolite e controlli sani. Dall'analisi del microbiota gli Autori individuano gli stessi 4 profili del precedente studio: *Escherichia*-dominante (22%), *Bifidobacterium*-dominante (19%), *Enterobacter/Veilonella*-dominante (15%) e *Bacteroides*-dominante (13%). La distribuzione di questi profili appare differente tra casi e controlli, avendo i primi ancora una volta maggiore predominanza del profilo *Bacteroides*-dominante e minore prevalenza del profilo *Enterobacter/Veilonella*-dominante rispetto ai controlli sani ($p = 0.01$).

Procedendo poi con l'analisi del metaboloma fecale, gli Autori individuano differenze tra casi e controlli a carico di 37 pathway ($q < 0.05$). Focalizzano l'attenzione su 3 di questi (uno sfingolipidico e 2 glicosfingolipidici), la cui espressione rimane significativamente più elevata nei casi di bronchiolite rispetto ai controlli sani anche all'analisi multivariata corretta per 9 variabili paziente-relate (per tutti e 3 $p < 0.05$). Inoltre, questi pathway risultano maggiormente espressi nei lattanti con profilo *Bacteroides*-dominante quando vengono comparati con tutti gli altri profili ($q < 0.001$), e l'abbondanza del genere *Bacteroides* risulta positivamente correlata a ciascuno dei 3 pathway considerati ($p < 0.001$).

Gli Autori sottolineano che questi risultati confermano le precedenti osservazioni che correlavano la predominanza del genere *Bacteroides* con lo sviluppo di bronchiolite nel lattante, dimostrando che i meccanismi metabolici con cui si estrinseca questa associazione risiedono nei pathway sfingolipidici, peraltro in letteratura già associati all'insorgenza di patologie respiratorie, tra cui la bronchiolite. Rimane ancora una volta non esplicitabile la direzionalità della causa nella relazione microbiota-metaboloma-bronchiolite, non potendosi affermare con certezza se sia l'evento

bronchiolite a determinare modifiche al microbiota intestinale o se la presenza in partenza di un profilo *Bacteroides*-dominante, influenzando sul metabolismo sfingolipidico, possa predisporre alla bronchiolite nel lattante.⁹⁴

Riprendendo poi il precedente lavoro di analisi tra l'intera coorte di 1005 lattanti < 1 anno ospedalizzati per bronchiolite e stratificati per profilo batterico nasofaringeo dominante da cui emergeva associazione tra profilo *Haemophilus*-dominante e necessità di cure intensive, Hasegawa e Colleghi rianalizzano lo stesso campione incrociando questa volta non solo i dati relativi ai profili del microbiota, ma anche quelli relativi alla risposta immunitaria. Per farlo, scelgono di concentrarsi sull'analisi della molecola catelicidina (o LL-73, un'importante componente del sistema immunitario innato) che in letteratura è nota essere inversamente associata alla severità clinica della bronchiolite. I 1005 lattanti della popolazione di studio vengono perciò suddivisi in due gruppi sulla base del valore di LL-37 riscontrato dall'analisi di campione di sangue ottenuto all'arruolamento (515 lattanti con bassi valori di LL-37, \leq al cut-off stabilito di 46 ng/ml, i rimanenti 490 con LL-37 > 46 ng/ml). Dal punto di vista infettivologico, la popolazione risulta costituita da infezione da VRS in 436 lattanti con bassi valori di LL-37 e da 377 pazienti con alti valori di LL-37. Dal punto di vista del microbiota, la stratificazione per profilo dominante già effettuata nel precedente lavoro viene riproposta anche in questo e vede la presenza rispettivamente di 95/515 e 98/490 lattanti con microbiota *Haemophilus*-dominante, 110/515 e 110/490 con profilo *Moraxella*-dominante, 142/515 e 141/490 con microbiota *Streptococcus*-dominante, infine 168/515 e 141/490 con profilo misto. Come outcome clinico di interesse gli Autori ripropongono il ricorso a cure intensive, inteso come necessità di ricovero in TIP e/o di ventilazione meccanica (outcome che si verifica in 92 casi nel gruppo con bassi livelli di LL-37 ed in 69 pazienti del gruppo con alti livelli di LL-37).

Analizzando il gruppo di lattanti con bassi livelli di LL-37 (e quindi con maggiore severità clinica, sulla base di quanto noto in letteratura), emerge che il sottogruppo con profilo *Haemophilus*-dominante si associa ad elevato rischio di ricorso a cure intensive se confrontato con il profilo *Moraxella*-dominante (OR 4.14; IC 95% 1.63–10.5; $p = 0.003$). Dall'analisi del sottogruppo di lattanti con elevati livelli di LL-37 non si ottiene alcuna correlazione significativa tra microbiota e rischio di ricorso a cure intensive ($p > 0.05$).

Nelle conclusioni dello studio, gli Autori si limitano a ribadire l'associazione osservata, non sapendone discriminare la causalità nel contesto di questa relazione: LL-37 potrebbe influire su specifiche alterazioni del microbiota e di conseguenza sulla severità clinica della bronchiolite, o viceversa potrebbero essere specifiche prevalenze di genera batterici ad elicitare o inibire molecole chiave della risposta immunitaria dell'ospite come LL-37, con conseguenze sulla clinica della bronchiolite.⁹⁵

A questa osservazione, lo stesso gruppo di lavoro aggiunge i dati ottenuti rianalizzando la stessa coorte stratificando i pazienti questa volta sulla base dei valori di una citochina infiammatoria nasofaringea, la chemochina-ligando 5 (CCL5). La coorte dei 1005 lattanti viene pertanto suddivisa in 2 gruppi sulla base del cut-off di CCL5 di 42.0 pg/mL (498 pazienti con valori ridotti di CCL5, 507 con elevati livelli di CCL5 nasofaringea). Dal punto di vista infettivologico, sono 408 i lattanti con infezione da VRS appartenenti al primo gruppo, 405 quelli appartenenti al secondo. Alla stratificazione dei due gruppi per profili di microbiota dominante la coorte risulta così suddivisa: 97/498 e 96/507 lattanti con profilo *Haemophilus*-dominante, 111/498 e 109/507 casi con microbiota *Moraxella*-dominante, 139/498 e 144/507 pazienti con genere *Streptococcus*-dominante, ed infine 151/498 e 158/507 casi con profilo misto.

Ancora una volta gli Autori ripropongono come outcome clinico di interesse il ricorso a cure intensive, inteso come necessità di ricovero in TIP e/o di ventilazione meccanica (outcome che si verifica in 89 casi nel gruppo con bassi livelli di CCL5 e 72 casi nel gruppo con alti livelli di CCL5), aggiungendo come outcome secondario la durata di degenza ≥ 3 giorni (evento registrato per 202 pazienti del primo gruppo e 193 del secondo).

All'analisi aggiustata per 14 fattori confondenti legati all'ospite e scegliendo di utilizzare il profilo Moraxella-dominante come riferimento, sebbene non emerga in primo luogo una correlazione significativa tra i livelli di CCL5 nasofaringeo e quelli di LL-37 sierico ($p = 0.76$) gli Autori riportano alcune evidenze. In particolare tra i lattanti con elevati livelli di CCL5, all'analisi multivariata emerge che il profilo Haemophilus-dominante risulta significativamente associato ad elevato rischio di ricorso a cure intensive (OR 3.20; IC 95% 1.18–8.68; $p = 0.02$) e a durata di degenza ≥ 3 giorni (OR 4.14; IC 95% 2.08–8.24; $p < 0.001$). Viceversa, per i profili Streptococcus-dominante e misto all'interno di entrambi i gruppi, così come per il gruppo di lattanti con elevati livelli di CCL5, dalle analisi non emerge alcuna correlazione significativa con gli outcome di interesse clinico.

Ancora una volta, gli Autori si limitano a sottolineare le evidenze osservate, senza poter identificare una relazione causale tra CCL5 e microbiota, potendo la prima influire su modifiche della composizione del microbiota a seguito dell'attivazione del sistema immunitario e della flogosi che si verifica durante l'evento bronchiolite, ma potendo in alternativa il microbiota nasofaringeo stesso agire sull'espressione di CCL5 a livello locale durante la bronchiolite.⁹⁶

L'unico lavoro pubblicato nel 2017 che non attinge dalla coorte MARC-35 focalizza l'attenzione sia sul microbiota orofaringeo che su quello intestinale. Si tratta infatti di uno studio caso-controllo monocentrico che arruola 27 lattanti < 1 anno ricoverati per bronchiolite da VRS e 22 controlli sani età-relati. Dei pazienti ricoverati viene tenuto conto delle terapie a cui vengono sottoposti in corso di ricovero (in particolare esposizione a terapia antibiotica, orale in 2 casi, parenterale in 9 casi, esposizione a terapia inalatoria con Budesonide ed un farmaco broncodilatatore – Salbutamolo o Ipratropio o Terbutalina in 25 lattanti, somministrazione di Magnesio Solfato in 6 casi, di Metilprednisolone in 2 pazienti). L'analisi del microbiota viene condotta su tamponi orale e fecale prelevati all'arruolamento e, per i casi di bronchiolite a distanza di 7-10 giorni dalla fine delle terapie.

In primo luogo, gli Autori effettuano un'analisi comparativa del microbiota orofaringeo e di quello fecale tra i casi ed i controlli.

All'analisi del microbiota orofaringeo emerge che, pur essendo sia i casi che i controlli dominati dal genere Streptococcus, i primi differiscono dai controlli sani caratterizzandosi per una maggior prevalenza dei Firmicutes (q -value < 0.01) e per una riduzione significativa di Bacteroides (q -value < 0.01) e Proteobacteria (q -value < 0.05).

A livello del microbiota fecale, invece, i casi di bronchiolite presentano una significativa maggior presenza rispetto ai controlli sani dei generi Bacteroides (16.44% vs 4.26%, q -value < 0.05) e Streptococcus (6.54% vs 2.60%, q -value < 0.05), mentre sono significativamente più poveri dei generi Collinsella (0.03% vs 13.09%, q -value < 0.01), Veillonella (1.46% vs 16.51%, q -value < 0.001), Blautia (0.08% vs 1.78%, q -value < 0.01) e Erysipelatoclostridium (0.77% vs 2.04%, q -value < 0.05). Questi risultati trovano in parte riscontro in altri lavori della letteratura, dove il genere Veillonella nel microbiota intestinale sembra avere effetto protettivo nei confronti dello sviluppo di patologie respiratorie (proprio questo genere appare depleto nei pazienti con bronchiolite).

Gli Autori passano poi ad analizzare il microbiota orofaringeo e quello fecale nei soli casi, alla ricerca di differenze tra prima e dopo l'esposizione alle varie terapie. Da questa analisi emerge una sostanziale stabilità per entrambe le tipologie di microbiota.

Per quanto riguarda il microbiota orofaringeo, non si riscontra alcuna differenza significativa all'analisi della diversity per nessun trattamento subito dai casi, nemmeno dopo esposizione a terapia antibiotica orale (2 casi). Quest'ultimo intervento sembra determinare una significativa riduzione nella diversity del microbiota fecale, che invece non risente di cambiamenti nei casi esposti ad antibiotico parenterale, dato che permette agli Autori di suggerire di evitare il ricorso a trattamenti antibiotici orali per non condizionare il microbiota intestinale nei mesi a venire.⁹⁷

L'anno successivo, dalla coorte MARC-35 vengono analizzati nuovi dati, questa volta stratificando i pazienti sulla base dei livelli circolanti di vitamina D-25OH, nota in letteratura per gli effetti protettivi nei confronti dello sviluppo di patologie infiammatorie quali l'asma. I 1005 lattanti della solita coorte vengono pertanto suddivisi in due gruppi, sulla base del cut-off di 26.5 ng/mL stabilito per la vitamina D-25OH quantificata da sangue ottenuto all'arruolamento (498 pazienti con vitamina D-25OH < 26.5 ng/mL, 507 con vitamina D-25OH \geq 26.5 ng/ml). Dal punto di vista infettivologico si osservano 400 casi di infezione da VRS nel primo gruppo, 413 casi nel secondo gruppo. Alla stratificazione dei due gruppi per profili di microbiota dominante la coorte risulta così suddivisa: 94/498 e 99/507 lattanti con profilo Haemophilus-dominante, 96/498 e 124/507 casi con microbiota Moraxella-dominante, 159/498 e 124/507 pazienti con genere Streptococcus-dominante, ed infine 149/498 e 160/507 casi con profilo misto.

L'outcome di interesse clinico è rappresentato ancora una volta dal ricorso a cure intensive, inteso come necessità di ricovero in TIP e/o di ventilazione meccanica (outcome che si verifica in 102 casi nel gruppo con bassi livelli di vitamina D-25OH e 59 casi nel gruppo con alti livelli di vitamina D-25OH).

Utilizzando il profilo Moraxella-dominante come riferimento, tra i lattanti con bassi livelli di vitamina D-25OH emerge come il profilo Haemophilus-dominante sia associato a rischio significativamente elevato di ricorso a cure intensive (OR 3.08; IC 95% 1.31–7.25; $p = 0.01$), mentre non si osserva alcuna associazione significativa tra microbiota e severità clinica nei lattanti con elevati livelli di vitamina D-25OH ($p > 0.20$).

Nelle conclusioni, ancora una volta gli Autori si limitano a ribadire il risultato ottenuto, senza potersi esprimere su una relazione causale tra le peculiarità del microbiota, i livelli di vitamina D-25OH circolante e la severità clinica.⁹⁸

Gli Autori dello stesso gruppo utilizzano poi la coorte MARC-35 per uno studio collaterale volto a rispondere ad un quesito: il microbiota nasale, esplorabile mediante tampone delle narici, e quello nasofaringeo, analizzabile su campioni di aspirato nasofaringeo, sono sovrapponibili o viceversa molto diversi tra loro?

Per rispondere a questa domanda gli Autori estrapolano dalla loro coorte un sottogruppo di 815 lattanti sottoposti non solo ad aspirato faringonasale, ma anche a tampone nasale all'arruolamento. All'analisi del microbiota su tampone nasale emerge una forte prevalenza del genere Staphylococcus (40.8%), seguita da Corynebacterium (10.4%), Moraxella (9.3%), Haemophilus (7.4%), Dolosigranulum (5.2%), Streptococcus (5.0%), ed Enterobacter (4.7%). Dall'analisi degli aspirati faringonasali emergono invece le già note prevalenze di 3 genera batterici: Moraxella (30.7%), Streptococcus (30.5%), ed Haemophilus (19.7%). Gli Autori effettuano quindi una clusterizzazione dei generi predominanti ed ottengono 6 differenti profili per il microbiota analizzato da tampone nasale (Haemophilus-dominante – 7.2% dei casi, Moraxella-dominante – 13.0%, Staphylococcus-dominante – 44.5%, Corynebacterium-dominante – 13.4%, Enterobacter-dominante – 7.5%, ed infine un profilo misto – 14.4%). Da aspirato faringonasale emergono invece i già noti 4 profili (Haemophilus-dominante, Moraxella-dominante, Streptococcus-dominante). Gli Autori provano poi a replicare, dall'analisi di microbiota da tampone nasale, i risultati precedentemente ottenuti dall'analisi del microbiota nasofaringeo di associazione tra specifici profili dominanti (nella fattispecie, il profilo Haemophilus-dominante) e gli outcome di severità clinica di ricorso a cure intensive (inteso come necessità di ricovero in TIP e/o di ventilazione meccanica) e di durata di degenza, stavolta ≥ 5 giorni.

Dall'analisi del microbiota da tampone nasale emergono gli stessi risultati che per microbiota da aspirato faringonasale, con valori di OR addirittura maggiori: il profilo Haemophilus-dominante risulta infatti fortemente associato a necessità di cure intensive (OR 6.43, $P < 0.001$) e di degenza ≥ 5 giorni (OR 4.31, $P = 0.002$).

Gli Autori concludono pertanto che le analisi condotte su entrambi i tipi di campionamento del microbiota delle alte vie aeree sono sovrapponibili e possono dare luogo a risultati simili, pur non

potendo negare la differente presenza del genus *Staphylococcus*, particolarmente rappresentato nei campioni ottenuti da tampone nasale, che peraltro non riescono a tipizzare, non capendo quindi se si tratti di *S. aureus* o di altro *Staphylococcus*, e non riuscendosi ad esprimere in merito.⁹⁹

Lo stesso anno il gruppo di lavoro torna a pubblicare uno studio contenente analisi multiomiche, questa volta con l'obiettivo di descrivere le differenze microbiomiche e metabolomiche in pazienti con bronchiolite da VRS piuttosto che causata da RV. Per fare ciò, gli Autori mettono a punto uno studio cross-sectional, analizzando i dati di 58 lattanti < 1 anno della coorte MARC-35, 39 dei quali con bronchiolite da VRS, 19 con bronchiolite da RV.

Per prima cosa, gli Autori si concentrano sull'analisi del metaboloma, riscontrando significative differenze nei profili metabolomici dei lattanti con infezione da VRS rispetto a quelli con bronchiolite da RV, differenze che persistono anche all'esclusione dei 9 casi che necessitano di VPP e che sono a carico esclusivamente del gruppo di lattanti con infezione da VRS ($p < 0.001$). In particolare, i metaboliti associati all'infezione da VRS appartengono ad un ampio range di pathways metabolici, incluso il metabolismo dei carboidrati (N-acetilglucosamina-N-acetilgalattosamina), quello lipidico (mevalonolattone), quello amminoacidico (5-oxoprolina) e quello energetico (2-metilcitrate-omocitrato). I metaboliti associati ad infezione da RV appartengono invece principalmente ad un unico pathway metabolico, quello amminoacidico (N-acetil-treonina, N-acetil-leucina, N-acetil-isoleucina, N-acetil-fenilalanina, N-acetil-valina, N-acetil-glutammato, N-acetil-tirosina, N-acetil-lisina).

Procedendo poi ad esaminare l'associazione tra microbiota e patogeno virale, emerge che i lattanti con infezione da VRS presentano elevata abbondanza relativa di *S. pneumoniae*, mentre quelli con infezione da RV correlano con elevata abbondanza relativa di *H. influenzae*. L'abbondanza relativa di *S. pneumoniae* correla positivamente con elevata intensità di metaboliti del metabolismo sfingolipidico. Tuttavia, in questo studio gli Autori riescono a riprodurre una associazione debolmente positiva, non significativa tra elevati metaboliti sfingolipidici e infezione da VRS. Ultimo dato di rilievo: nessuno dei metaboliti che differiscono significativamente tra i due gruppi (infezione da VRS, infezione da RV) sono di origine batterica, bensì di produzione da parte dell'ospite.¹⁰⁰

L'ultimo lavoro pubblicato nel 2018 consiste in uno studio retrospettivo osservazionale condotto su una coorte diversa da quella dello studio MARC-35 e che è costituita da 54 lattanti < 6 mesi ospedalizzati per infezione da VRS e 21 controlli sani. I lattanti ricoverati vengono stratificati sulla base di parametri specificati allo studio in infezione lieve (9 casi), moderata (27 pazienti), severa (18 lattanti). Le analisi vengono condotte su aspirato nasofaringeo collezionato all'arruolamento per tutti i pazienti, con la ripetizione di un secondo aspirato dopo 4-6 settimane dalla dimissione nei lattanti ricoverati. Da tutti questi campioni viene analizzato il microbiota mediante amplificazione delle regioni V3 e V4 del DNA batterico, nonché i livelli di CCL5, CXCL10, MMP9, IL6 e CXCL8, quantificati mediante ELISA.

Dal confronto tra pazienti con infezione da VRS e controlli sani emerge, all'analisi dell' α -diversity, una generale significativa diminuzione della ricchezza di specie microbiche nei pazienti con VRS ($p = 0.006$), differenza che si rende ancor più evidente se ad essere confrontati con i controlli sani sono i pazienti con patologia moderata o severa ($p = 0.016$ e $p = 0.024$ rispettivamente).

All'analisi dei vari genera batterici tra i pazienti con VRS ed i controlli sani emerge poi la presenza di profili di microbiota significativamente differenti ($p = 0.001$) e caratterizzati, per quanto riguarda i lattanti con VRS, da prevalenza dei genera *Haemophilus* ($p = 0.011$) e *Achromobacter* ($p = 0.001$). Questo dato conferma quanto già riportato da altri lavori per quanto riguarda il genere *Haemophilus*, mentre lo studio è il primo a riportare evidenze in merito ad un genere poco conosciuto come *Achromobacter* e riportato in letteratura in relazione a polmoniti in epoca neonatale o nei primi mesi di vita.

L'analisi delle ridondanze condotta tra i due gruppi dimostra inoltre che i generi del microbiota sono significativamente separati tra di loro sulla base dei livelli della chemochina CXCL8 ($p = 0.036$), ma non per le altre molecole infiammatorie analizzate nello studio. È proprio il genere *Haemophilus* risulta essere quello che maggiormente contribuisce a questa differenziazione nei due gruppi (infezione da VRS e controlli sani) stratificati sulla base dei livelli di CXCL8, evidenziando per questo genere batterico una forte associazione tra l'attivazione della risposta immune mediata da CXCL8. Tuttavia, questo studio non riesce a dimostrare una correlazione tra profili di microbiota e severità clinica dell'infezione da VRS.

Osservazione interessante dello studio è che i livelli di *Haemophilus* nei campioni ottenuti a distanza di settimane dalla dimissione risultano simili a quelli dei controlli sani, e che sempre in questi campioni torna ad essere presente il genere *Moraxella*.

All'analisi delle citochine e chemochine risulta che, sui campioni ottenuti dai lattanti con VRS, CCL5, CXCL10 e MMP9 correlano negativamente con la severità dell'infezione, mentre CXCL8 e IL6 presentano una correlazione positiva (rispettivamente $p = 0.0001$ e $p = 0.0009$). Inoltre, al campione di controllo settimane dopo la dimissione, CXCL8 e IL6 presentano livelli di normalità e risultano significativamente ridotte rispetto al momento dell'infezione ($p = 0.005$ e $p = 0.02$ rispettivamente).

Tutti questi dati appaiono associati alla severità clinica dell'infezione da VRS da un lato, a profili peculiari del microbiota con prevalenza di *Haemophilus* dall'altro, pur non riuscendo lo studio a dimostrare formalmente l'associazione tra questo genere batterico e la severità dell'infezione.¹⁰¹

Sempre relativi al genere *Haemophilus* sono i risultati pubblicati di una nuova analisi di pazienti estrapolati dalla coorte MARC-35 (Mansbach et al., 2019). Gli Autori questa volta focalizzano l'attenzione sulla ritardata clearance del VRS ed elaborano una sotto-analisi di 557 lattanti < 6 mesi della coorte MARC-35, tutti con bronchiolite da VRS (405 con mono-infezione da VRS, i rimanenti 152 con co-infezione VRS+RV), di cui dispongono, oltre che dell'aspirato nasofaringeo all'arruolamento, anche di un tampone nasale collezionato a domicilio dai genitori a 3 settimane dalla data del ricovero. Dall'analisi di questo tampone identificano un gruppo di 106 lattanti che, a distanza di 3 settimane, presentano ancora lo stesso sottotipo di VRS al tampone nasale, e che vanno a costituire il gruppo dei pazienti con ritardata clearance virale. Gli Autori effettuano quindi la solita clusterizzazione del microbiota, identificando sui campioni analizzati i già noti profili batterici: *Haemophilus*-dominante, *Moraxella*-dominante, *Streptococcus*-dominante e profilo misto. All'analisi multivariata aggiustata per 11 caratteristiche confondenti a carico dell'ospite (tra cui età, carica virale, esposizione ad antibiotico-terapia e ricorso a cure intensive), utilizzando il profilo misto come riferimento, emerge una significativa associazione tra il profilo *Haemophilus*-dominante ed il rischio di ritardata clearance virale (OR 2.77; IC 95% 1.35–5.71; $p = 0.006$). Tale associazione rimane significativamente elevata anche all'analisi di sensibilità condotta escludendo i casi con co-infezione VRS+RV, focalizzata quindi sui soli 405 lattanti con mono-infezione da VRS (OR 4.27; IC 95% 1.77–10.29; $p = 0.001$).

Ancora una volta, gli Autori non sanno spiegarsi in maniera univoca i risultati ottenuti, suggerendo che l'associazione osservata possa essere frutto di una relazione causale bidirezionale in cui da un lato l'evento infezione da VRS favorirebbe la predominanza di generi batterici peculiari come *Haemophilus*, come già osservato in precedenti lavori, mentre dall'altro la presenza di questi batteri potrebbe interagire con il sistema immunitario dell'ospite, condizionandone la risposta contro il virus ed influenzando, tra le altre cose, sulla sua clearance.¹⁰²

Lo stesso gruppo di lavoro torna poi ad esaminare le associazioni tra microbiota nasofaringeo e metaboloma, questa volta sierico, nei lattanti della coorte MARC-35 affetti da bronchiolite. La ragione di quest'analisi muove dall'aver precedentemente dimostrato l'associazione tra un microbiota *Streptococcus*-dominante ed un'aumentata intensità del metabolismo sfingolipidico, entrambi a livello nasofaringeo, ed una maggior severità clinica della bronchiolite. Alla luce del

successivo lavoro di de Steenhuijsen Piters e Colleghi in cui lo stesso profilo batterico Streptococcus-dominante (ma anche Haemophilus-dominante) nasofaringeo risulta associato a specifiche attivazioni del sistema immunitario circolante (sovraespressione di geni legati al Toll-like receptor ed attivazione dei granulociti neutrofili), il gruppo di Autori legati alla coorte MARC-35 decide di analizzarne i pazienti per verificare la relazione tra due elementi apparentemente distanti (il microbiota nasofaringeo ed il metaboloma sierico circolante) con la severità della bronchiolite. Obiettivo dell'analisi consiste quindi nel testare l'associazione tra metaboliti sierici e rischio di necessità di VPP (espressione di severità clinica della bronchiolite) e tra microbiota nasofaringeo ed i metaboliti risultati associati alla severità clinica. Della coorte di 1005 lattanti < 1 anno viene quindi identificato un sottogruppo di 140 pazienti ≤ 6 mesi di cui si dispone anche di campione ematico prelevato all'arruolamento su cui poter effettuare le analisi metabolomiche. Tale sottogruppo non differisce significativamente dal resto della coorte per nessuna variabile clinica, ma presenta una significativa riduzione di casi di infezione da VRS (63 con mono-infezione, 18 con co-infezione con RV) ed una maggiore prevalenza di infezione da RV (26 casi con mono-infezione). Per le analisi, i 140 pazienti vengono suddivisi in 2 ulteriori sottogruppi (70 nel training data set, che serve per verificare se le analisi possono essere condotte, 70 nel test data set, che serve per ottenere i risultati veri e propri).

Utilizzando come outcome di interesse il ricorso a VPP, dall'analisi metabolomica emergono profili metabolici significativamente differenti tra i pazienti che necessitano e quelli che non necessitano di VPP ($p < 0.001$). In particolare, dall'analisi nel test data set emerge un solo metabolita (1-palmitoil-2-palmitoleoil-GPC 16:0/16:1) significativamente associato ad elevato rischio di VPP (adjusted FDR = 0.005) e 6 metaboliti (3 dei quali – 1-(1-enil-palmitoil)-2-linoleoil- GPE P-16:0/18:1, 1-(1-enil-palmitoil)-2-oleoil- GPE P-16:0/18:2, 1-(1-enil-stearoil)-2-linoleoil- GPE P-18:0/18:2 appartenenti al pathway dei plasmalogeni, la vitamina A, la tiroxina e l'amminoacido triptofano) associati invece a ridotto rischio di VPP (per tutti adjusted FDR < 0.05).

All'analisi del microbiota nasofaringeo, come nei precedenti lavori i genera Streptococcus, Moraxella ed Haemophilus appaiono come quelli dominanti. In particolare, l'abbondanza relativa di Streptococcus risulta positivamente associata al metabolita 1-palmitoil-2-palmitoleoil-GPC 16:0/16:1 sierico, che correla con maggior rischio di VPP, e negativamente associata con i metaboliti sierici che correlano con un ridotto rischio di questo outcome, mentre il genus Moraxella presenta pattern di correlazione opposti. Per gli Autori, la correlazione tra Streptococcus e metaboliti associati ad outcome di maggiore severità clinica di bronchiolite vanno a corroborare ed espandere i precedenti riscontri di de Steenhuijsen Piters e Colleghi.¹⁰³

L'ultimo lavoro pubblicato nel 2019 consiste in uno studio osservazionale prospettico, focalizzato su 58 lattanti con infezione da VRS non appartenenti alla coorte MARC-35 (35 ricoverati e quindi identificati come infezione severa, 23 con infezione lieve) e che mira all'analisi del microbiota e del trascrittoma dei linfociti T CD4+ nasali nella fase acuta dell'infezione (all'arruolamento) e al controllo a distanza (12-16 giorni dopo l'arruolamento per le analisi di controllo del trascrittoma dei linfociti T CD4+, 1 mese dopo l'arruolamento per il controllo del microbiota nasale).

All'analisi del microbiota emerge che il genere *H. influenzae* correla positivamente con la severità dell'infezione, mentre genera come *Ralstonia* e *Streptococcus* presentano un'associazione negativa ($p < 0.05$). Tali osservazioni, in particolare la prima, relativa a *H. influenzae*, trovano conferma in letteratura. In generale, poi, gli Autori osservano elevati valori di α -diversity nei lattanti con infezione severa rispetto a lieve durante la fase acuta ($p = 0.011$), così come una maggiore α -diversity al controllo dopo 1 mese ($p = 0.0057$), a conferma di quanto supposto in altri lavori in cui una elevata ricchezza di specie microbiche risulta contro-intuitivamente associata a decorso clinico più severo (forse per mancata predominanza di un microbiota di resilienza).

Alle analisi del trascrittoma dei linfociti T CD4+ ai due differenti timepoint (fase acuta e controllo dopo 12-16 giorni) emergono differenze in merito all'espressione di ben 27 geni (FDR < 0.05). Tra

questi figurano IFITM1 e IFITM2, di cui è nota l'associazione all'inibizione della replicazione del VRS; IRF7, associato alla soppressione della risposta immunitaria innata; MS4A1, che codifica per la proteina CD20 che caratterizza i linfociti B CD20+, che in lavori condotti su casi di infezione pediatrica fatale da VRS sono stati individuati come popolazione linfocitaria predominante nei polmoni dei soggetti deceduti; MCOLN1, gene implicato nel pathway del toll-like receptor e con attività regolatrice a carico dell'autofagia cellulare, fondamentale nella fase di convalescenza di un'infezione. Altro aspetto interessante è che la maggior parte dei geni identificati dall'analisi sono associati con l'attività mitocondriale dell'ospite, a sua volta fondamentale per l'attivazione dell'immunità innata volta alla soppressione virale.

Gli Autori effettuano poi una clusterizzazione del microbiota e del trascrittoma ed ottengono dall'analisi integrativa l'associazione tra alcuni raggruppamenti specifici. In queste analisi, ancora una volta i geni IFITM1 e IFITM2 risultano diversamente espressi in fase acuta rispetto al controllo, ma non tra casi con infezione lieve e severa. Da queste analisi emerge inoltre una downregolazione del gene CCR7, fondamentale per esprimere una chemochina implicata nella risposta immunitaria contro il VRS. Altri geni particolarmente rappresentati all'analisi integrativa sono geni mitocondriali dell'NADH (MT-ND4L e MT-ND5), della citocromo c ossidasi (MT-CO1, MT-CO2, e MT-CO3), dell'ATP sintetasi (MT-ATP6 e MT-ATP8), a dimostrazione, ancora una volta, della fondamentale attivazione del genoma mitocondriale dell'ospite, sul cui ruolo chiave gli Autori insistono per l'attivazione della risposta immune per la soppressione del patogeno virale in corso di infezione.¹⁰⁴

Nel 2020 il gruppo di lavoro della coorte MARC-35 pubblica i dati relativi ad uno studio pilota in cui gli Autori effettuano l'analisi simultanea del metatrasrittoma microbico e dell'ospite in corso di bronchiolite da differenti agenti virali. Selezionano pertanto dalla già nota coorte 10 pazienti (5 con bronchiolite da VRS, 5 con bronchiolite da mono-infezione da RV) per verificare se emergono differenze in termini di composizione e funzioni del microbiota nasofaringeo e della risposta immune dell'ospite. Nel complesso, il microbiota nasofaringeo di questi pazienti appare dominato dalle specie *M. catarrhalis* (32%), *S. mitis* (7%), *S. pneumoniae* (6%), *Prevotella* spp. (5%), *P. melaninogenica* (5%) e *H. influenzae* (4%).

Confrontando il microbiota dei due gruppi emergono differenze nella composizione nei pazienti con infezione da VRS rispetto a quelli con infezione da RV, come ad esempio per quanto riguarda il genus *Moraxella*, con abbondanza relativa significativamente maggiore nel primo gruppo, e *Staphylococcus*, con abbondanza relativa significativamente maggiore nel secondo (per entrambi q -value < 0.05).

Dall'analisi del metatrasrittoma emergono inoltre differenti profili funzionali tra i due gruppi, in particolare a carico di 18 geni espressi con intensità differente (q < 0.05): nel gruppo dell'infezione da VRS appaiono sovra-regolati i 2 geni *coaA* (associato all'enzima della pantotenato chinasi) e *mazF* (implicato nelle attività del metabolismo degli acidi nucleici), mentre nel gruppo dell'infezione da RV ben 16 geni sono sovra-regolati (coinvolti principalmente nell'attività carbossiliasica).

Dall'analisi del trascrittoma dell'ospite, infine, emergono risultati interessanti a carico del gruppo di pazienti con bronchiolite da RV, che differentemente dall'altro gruppo presenta maggiori livelli di espressione dei geni *DEFA1* e *MAP3K14*, entrambi coinvolti nell'immunità innata, e di pathway quali quelli del Toll-like receptor, NOD-like receptor, RIG-I-like receptor, T cell receptor e della cascata di segnali JAK-STAT, che suggeriscono un'attivazione virus-specifica differenziale dell'immunità innata, con successiva transizione all'immunità acquisita, nei lattanti con bronchiolite da RV. Sebbene si tratti di uno studio pilota, per gli Autori i risultati forniscono spunti interessanti in merito ai differenti percorsi patobiologici attivati dai diversi patogeni virali nell'ospite.¹⁰⁵

Un ultimo lavoro pubblicato nel 2020 concentra l'attenzione sul microbiota intestinale. Si tratta di uno studio osservazionale prospettico estraneo alla coorte MARC-35 che arruola 95 lattanti

< 6 mesi con infezione da VRS, classificata come lieve se il paziente non viene ricoverato (37 casi), moderata se il lattante viene ricoverato in reparto generale (53 casi), severa se il piccolo necessita di ricovero o trasferimento in TIP (5 casi). Di questa coorte viene condotta l'analisi del microbioma mediante amplificazione della regione V4 del DNA batterico ottenuto da campioni fecali raccolti all'arruolamento. Gli Autori effettuano poi il confronto del microbiota tra pazienti con infezione lieve (considerati gruppo di controllo) e quelli con infezione moderata/severa, ma anche tra infezione moderata e severa.

Dall'analisi dell' α -diversity non emergono alterazioni significative del microbiota intestinale tra nessuno dei gruppi esaminati, mentre all'analisi della β -diversity emerge una significativa differenza di distanza filogenetica tra le popolazioni batteriche del microbiota dei controlli e quelli con infezione da VRS moderata/severa ($p < 0.0001$), ma anche tra infezione moderata e severa ($p = 0.031$). In particolare, il genere batterico S24_7 (anche chiamato Muribaculaceae o Candidatus Homeothermaceae) appare aumentato nei pazienti con infezione severa rispetto ai controlli, viceversa le Moraxellaceae e la specie *Tissierella Soehngenia* sono diminuite. Dal confronto tra pazienti con infezione moderata e quelli con infezione severa, inoltre, emerge un'associazione dei generi S24_7, *Odoribacter* e *Oribacterium* con infezione severa da VRS e dei generi Clostridiales e Coriobacteriaceae con l'infezione moderata (sempre $p < 0.05$).

Essendo il genere S24_7 risultato associato ai casi di infezione severa rispetto ai casi moderati e rispetto ai controlli ed essendo in letteratura riportata, all'analisi del genoma di questi batteri, la presenza di peptidasi IgA-degradanti, gli Autori suggeriscono che proprio in questa peculiarità genomica di S24_7 potrebbe risiedere la spiegazione dell'associazione con la severità clinica dell'infezione da VRS nei pazienti che ospitano tale batterio nel proprio microbiota.¹⁰⁶

Unico lavoro pubblicato nel 2021 consiste in uno studio caso-controllo spagnolo in cui vengono arruolati 75 lattanti < 2 anni, 58 dei quali con bronchiolite da VRS, 17 controlli sani. Su tutti all'arruolamento viene effettuata la raccolta di tampone nasale e fecale ed effettuata l'analisi del microbiota e delle citochine infiammatorie su entrambi i tipi di campione. Il microbiota nasale risulta globalmente composto da 5 generi: *Haemophilus* (24% dei campioni), *Staphylococcus* (22%), *Corynebacterium* (13%), *Streptococcus* in associazione o meno con *Haemophilus* o *Staphylococcus* (26%) e *Moraxella/Streptococcus* (15%). È interessante notare che il profilo *Haemophilus*-dominante viene riscontrato solo su campioni ottenuti da pazienti con bronchiolite da VRS, non da controlli sani, a conferma dei precedenti lavori che hanno documentato l'associazione tra profilo *Haemophilus*-dominante e bronchiolite (severa) da VRS.

Dal confronto del microbiota nasale tra casi di bronchiolite e controlli sani emergono differenze significative: in particolare, all'analisi del phylum, tra i casi di bronchiolite ed i controlli sani si osserva un'abbondanza relativa significativamente maggiore di Proteobacteria ($p < 0.001$) e significativamente minore di Firmicutes e Actinobacteria (rispettivamente $p = 0.010$ e $p = 0.019$). All'analisi dei generi batterici, inoltre, si osserva un'abbondanza relativa significativamente maggiore di *Haemophilus* e *Mannheimia* ($p = 0.004$ e $p = 0.011$) e significativamente minore di *Staphylococcus* e *Corynebacterium* ($p = 0.023$ e $p = 0.007$). Questo è il primo lavoro, sottolineano gli Autori, a riportare un'associazione significativa tra la presenza del genere *Mannheimia* (ex *Pasteurella*) e la bronchiolite da VRS.

Ulteriori differenze emergono all'analisi del microbiota nasale stratificando il campione di popolazione per alcune variabili cliniche. Il genere *Haemophilus* appare influenzato dall'età, essendo significativamente maggiore nei lattanti di età > 4 mesi rispetto a quelli più giovani ($p = 0.012$) e nei pazienti che hanno almeno 1 fratello rispetto ai figli unici ($p = 0.043$). Il genere *Haemophilus*, ma anche *Mannheimia* e *Corynebacterium* risultano inoltre significativamente associati ad una degenza ≥ 1 settimana rispetto al gruppo di pazienti con degenza < 1 settimana nei casi ospedalizzati ($p = 0.013$, $p = 0.045$ e $p = 0.048$, rispettivamente). Focalizzando l'attenzione sulla necessità di ricovero in TIP e/o di supporto respiratorio, è l'abbondanza relativa di *Acinetobacter* ad essere significativamente maggiore tra chi necessita e chi non necessita di questi

due eventi ($p = 0.019$ e $p = 0.028$ rispettivamente), nonché in chi presenta o non presenta polmonite come complicanza della bronchiolite ($p = 0.036$). Infine, i pazienti con wheezing presentano abbondanza relativa di *Moraxella* significativamente maggiore rispetto ai pazienti che non sperimentano wheezing durante il ricovero ($p = 0.038$). Questi stessi pazienti presentano anche più elevati livelli di *Haemophilus* e *Mannheimia*.

Dal confronto del microbiota fecale, invece, non emergono differenze particolari tra i casi ed i controlli, specie riguardo i generi maggiormente rappresentati. Soltanto *Staphylococcus* appare significativamente più presente nei controlli rispetto ai casi con bronchiolite ($p = 0.046$).

Poche sono le differenze all'analisi delle citochine nasali: soltanto le concentrazioni di BAFF/TNFSF13B e sTNF-R1 appaiono significativamente maggiori nei casi di bronchiolite rispetto ai controlli ($p < 0.010$). Al contrario, la maggior parte delle citochine su feci (APRIL/TNFSF13, IFN- β , IFN- γ , IL-19, IL-20, IL-29/IFN λ , IL-32, LIGHT/TNFSF14, MMP3, osteocalcina, pentraxina3, TSLP) appaiono più presenti nei controlli sani rispetto ai casi di bronchiolite (per tutte $p < 0.05$), mentre soltanto BAFF/TNFSF13B e IL-35 risultano significativamente più presenti nei casi di bronchiolite. Proprio BAFF/TNFSF13B cattura l'attenzione degli Autori perché citochina già nota in letteratura per l'associazione con stati infiammatori intestinali, e che secondo loro potrebbe riflettere in questo caso l'infiammazione causata a livello respiratorio dall'infezione da VRS e che a seguire compare a livello intestinale.¹⁰⁷

È di quest'anno il più recente lavoro condotto dal gruppo della coorte MARC-35 che propone una sotto-analisi della stessa con l'obiettivo questa volta di analizzare simultaneamente il microbiota nasofaringeo, il metatrascrittoma microbico ed il trascrittoma dell'ospite alla ricerca della visione più complessiva possibile dei pazienti con bronchiolite. Dei 1005 lattanti già noti ne vengono pertanto selezionati 244 su cui condurre tutte queste analisi. Vengono identificati come outcome di interesse clinico primario la severità clinica della patologia bronchiolite (intesa come ricorso a VPP), come outcome secondario la necessità di ricorso a cure intensive (intesa come ricorso a VPP e/o trasferimento in TIP).

All'analisi del microbiota nasofaringeo, tutte e 10 le specie microbiche maggiormente espresse sui campioni analizzati (e che costituiscono complessivamente il 93% del microbiota esaminato) risultano significativamente associate al rischio di VPP (per tutte le associazioni FDR < 0.001): nella fattispecie, un'aumentata abbondanza relativa di *S. pneumoniae*, così come di *Cutibacterium acnes*, *H. influenzae*, *Corynebacterium simulans* e *S. mitis* sono associati a tale rischio, ma anche una ridotta abbondanza di *M. catarrhalis*, *E. coli*, *Prevotella melaninogenica* e *Prevotella nanceiensis*. Differenze significative emergono anche all'analisi del microbiota fungino: infatti, una maggior abbondanza di *Malassezia restricta*, *Sugiyamaella lignohabitans*, *Aspergillus heteromorphus*, *Melampsora larici-populina* e *Penicillium rubens*, così come una ridotta abbondanza di *Malassezia globosa*, *Ramularia collo-cygni*, *Trametes versicolor*, *Pseudogymnoascus destructans* e *Phycomyces blankesleeianus* risultano significativamente associate a rischio di VPP (per tutte FDR < 0.001).

A livello metagenomico, il gruppo di lattanti sottoposti a VPP presenta attivazione significativamente maggiore di 5 pathways, appartenenti principalmente al metabolismo lipidico e antiossidante (per tutti FDR < 0.05).

All'analisi del trascrittoma dell'ospite, gli stessi pazienti presentano molti più pathways, ben 102, significativamente alterati (ad esempio una downregolazione di IFN-I, IFN- γ , dell'attivazione del sistema T-linfocitario, così come una sovraregolazione dei neutrofili).

Dalla network analysis che combina tutti i dati, poi, gli Autori identificano 7 distinti profili microbiomici, 8 moduli di funzione microbica e 9 profili di risposta dell'ospite particolarmente ricorrenti. Integrano poi tra loro i dati dei profili e dei moduli maggiormente associati alla VPP e con elevato significato biologico.

Da questa analisi integrata e focalizzata sull'outcome primario della VPP emerge che, a livello microbico, il modulo *S. pneumoniae*/*S. aureus* si associa positivamente a rischio di VPP (OR 2.55;

IC 95% 1.18–5.78; $p < 0.05$). Per quanto riguarda i moduli metatrascrittomici, emergono numerose associazioni significative negative (per tutte $p < 0.05$) con il rischio di PPV (modulo di membrana plasmatica OR 0.30, IC 95% 0.16–0.50; modulo del metabolismo mRNA OR 0.35, IC 95% 0.20–0.64; modulo degli amminoacidi ramificati OR 0.73, IC 95% 0.05–0.88; modulo del metabolismo dello stress ossidativo OR 0.57, IC 95% 0.07–0.78; modulo NADH OR 0.59, IC 95% 0.06–0.80). Infine, relativamente ai moduli della risposta dell'ospite, solamente il modulo IL-1/attivazione neutrofila si associa positivamente al rischio di VPP (OR 3.94, IC 95% 1.70–10.1), mentre i rimanenti presentano correlazione negativa con tale rischio (modulo della regolazione T-linfocitaria OR 0.24, IC 95% 0.11–0.53; modulo del recettore della proteina G OR 0.38, IC 95% 0.15–0.78; modulo dell'IFN tipo I OR 0.37, IC 95% 0.14–0.75; modulo risposta dell'ospite I OR 0.43, IC 95% 0.17–0.98).

Questo lavoro rappresenta il primo studio in letteratura capace di fornire una panoramica così ampia e dettagliata della complessa interazione tra patogeno, ospite e microbiota commensale, in particolare in relazione ad outcome di interesse clinico ed efficace misura di severità dell'infezione.¹⁰⁸

L'ultimo lavoro ad oggi pubblicato relativo al microbiota nasofaringeo in corso di bronchiolite analizza una coorte di lattanti che attinge dal "Infant Susceptibility to Pulmonary Infections and Asthma Following RSV Infection in Infancy (INSPIRE) study", uno studio multicentrico americano che vede arruolati 1949 soggetti nati a termine, non low birth weight, senza comorbidità. Gli Autori selezionano da questa coorte 357 lattanti ≤ 6 mesi che, in corso della prima stagione epidemica di VRS della loro vita, sperimentano l'infezione da parte di questo patogeno, e ne analizzano il microbiota e le citochine nasofaringeo da lavaggio nasale ottenuto al momento della diagnosi di infezione da VRS. Di questi 357 lattanti, 302 presentano mono-infezione da VRS, 50 co-infezione VRS+RV, 1 co-infezione VRS+enterovirus, 4 co-infezione VRS+RV+enterovirus. 53 lattanti vengono ospedalizzati in corso di infezione: 25 di questi arrivano a necessitare di ossigenoterapia, 4 del ricovero/trasferimento in TIP. Gli Autori analizzano la composizione del microbiota nasofaringeo in associazione prima agli outcome clinici a breve (severità clinica espressa dallo score RSS e rischio di sviluppo di infezione a carico delle basse vie aeree) e lungo (wheezing al controllo al 4° anno) termine, in associazione poi al sistema immune nasofaringeo. Dopo aver sottoposto i numerosi elementi infiammatori a clusterizzazione per componenti principali, gli Autori costruiscono infine dei modelli di relazione causale includendo il microbiota e i primi due componenti principali derivati dal raggruppamento delle citochine ed integrano questa analisi ancora una volta con gli outcome a breve e lungo termine sopra riportati.

All'analisi del microbiota nasofaringeo in relazione agli outcome clinici emerge che l' α -diversity microbica correla con aumentato valore di RSS ($p = 0.02$) e con aumentata prevalenza di infezione a carico delle basse vie aeree ($p = 0.02$), nonché con più elevato numero di episodi di wheezing al controllo al 4° anno di vita ($p < 0.001$). Non emergono invece relazioni significative con gli outcome clinici all'analisi della β -diversity o di genera batterici particolari ($p > 0.05$).

Per l'analisi della relazione tra microbiota nasofaringeo ed il sistema immune locale, gli Autori effettuano lo studio di regressione, da cui emerge che l'abbondanza di genera quali Klebsiella e Moraxella correla positivamente con elevati livelli di citochine del sistema immune di tipo 2 (IL-13 e IL-4 rispettivamente), di tipo 3 (IL-17A) e citochine pro-infiammatorie (TNF- α , IL-1b, IL-6, IL-8, e MCP-1). Relazioni positive, ma meno consistenti dal punto di vista statistico emergono anche tra l'abbondanza di Haemophilus ed i livelli di IL-17A, TNF- α , IL-1b, IL-6, e MCP-1, nonché tra Streptococcus ed i livelli di TNF- α and IL-8. L'abbondanza di Metilobacterium risulta invece negativamente associata ai livelli di citochine di tipo 1 (IFN- γ , IL-2, IL-12), di tipo 2 (IL-4, IL-5, IL-13), di tipo 3 (IL-17A), e pro-infiammatorio (TNF- α , IL-1b, IL-6, IL-8, MCP-1, and MIP-1 α). Dall'analisi integrata tra microbiota e componenti principali del sistema immune, emerge associazione significativa tra l'indice Shannon applicato al microbiota ed il componente principale 1, che racchiude le citochine IL-2, IL-4, IL-2R, IL-17A, IL-12 ($p = 0.048$). Una volta che questo

componente principale viene messo in relazione con gli outcome clinici, si osserva una significatività soltanto nella relazione causale con i valori dello score clinico RSS: in particolare, si osserva una direzione di associazione positiva tra le citochine e lo score RSS ad elevati valori dell'indice di Shannon del microbiota, negativa per ridotti valori di tale indice. Questo lavoro rappresenta il primo studio che tenta non solo di descrivere relazioni esposizione-outcome, ma che riporta anche analisi di mediazione e causalità.¹⁰⁹

Da ultimo, 2 lavori sono stati pubblicati finora nel corso di quest'anno in merito ad analisi del microbiota fecale in corso di bronchiolite.

Il primo di questi è uno studio italiano che arruola 37 lattanti < 6 mesi ospedalizzati per bronchiolite: 25 pazienti presentano infezione da VRS (4 dei quali con co-infezione VRS+RV) e rappresentano il gruppo 1, confrontato con il gruppo 2, costituito da 12 lattanti con infezione da agente patogeno che non sia VRS. In generale, il gruppo di lattanti con infezione da VRS presenta decorso clinico più severo rispetto ai lattanti con bronchiolite non causata da VRS (ad esempio, 24 casi del primo gruppo presentano al momento del ricovero valori di SpO₂ < 90% contro 1 solo lattante del gruppo 2, $p < 0.01$; inoltre 4 lattanti del gruppo 1 necessitano di cure intensive contro nessun lattante del gruppo 2, differenza quest'ultima non statisticamente significativa). Questi dati confermano quanto già riscontrato in precedenti studi italiani.

All'analisi del microbiota, condotta su materiale fecale ottenuto all'arruolamento dei pazienti, sebbene si noti una ridotta α -diversity nel gruppo 1 rispetto al gruppo 2, non emerge alcuna differenza statisticamente significativa all'analisi degli indici di valutazione della α -diversity, così come della β -diversity (per tutte le analisi $p > 0.05$). Sebbene in assenza di significatività, gli Autori riportano un trend di lieve maggior prevalenza dei generi *Escherichia/Shigella*, *Bifidobacterium* e *Bacteroides* nei pazienti con bronchiolite da VRS (così come riportato anche dai lavori di Hasegawa et al.) e di maggior prevalenza dei generi *Actinobacteria* e *Firmicutes* nei lattanti con infezione da patogeno non VRS.

Gli Autori effettuano poi l'analisi della relazione tra il microbiota nei due gruppi e variabili cliniche come il valore di SpO₂ < 90% al momento del ricovero, osservando ancora una volta una differenza a carico dei generi *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, maggiormente rappresentati nei lattanti con SpO₂ < 90%. Gli Autori tuttavia insistono sul fatto che, anche in questa analisi, le differenze riscontrate non siano statisticamente significative ($p > 0.05$), mettendo quindi in dubbio che la relazione tra microbiota intestinale e decorso clinico della bronchiolite sia così forte da poter beneficiare di interventi modulatori (es. pre- o post-biotici).¹¹⁰

L'ultimo lavoro ad oggi pubblicato in merito a microbiota fecale e bronchiolite spalanca la porta su possibili interventi medici e modifiche degli outcome clinici della bronchiolite. Si tratta di uno studio composto da più fasi e focalizzato sugli acidi grassi a catena corta (SCFA). In un primo momento, gli Autori dimostrano in vitro l'azione protettiva da parte degli SCFA riguardo la replicazione del VRS mediante meccanismi che implicano la proteina RIG-I. Successivamente, gli Autori dimostrano effetti clinici in modelli animali (topi) infettati da VRS e sottoposti a somministrazione intranasale di SCFA-acetato, osservando una diminuzione dell'infiltrato infiammatorio nelle vie aeree ed una significativa riduzione della carica virale di VRS a seguito della somministrazione di questi acidi grassi.

A questo punto, gli Autori passano ad analizzare i 17 campioni fecali ottenuti dai 30 lattanti ricoverati per bronchiolite.

All'analisi sulla relazione tra microbiota ed outcome clinici di interesse dello studio emerge che la famiglia delle *Bacteroidaceae* è positivamente associata a prolungata durata di degenza e di ossigenoterapia ($p < 0.05$), a conferma di quanto già noto in letteratura, mentre il genere *Mollicutes* F39, appartenente al phylum dei *Tenericutes*, risulta essere negativamente associata a prolungata durata di degenza ($p < 0.05$).

Spostando l'attenzione sui vari SCFA, dall'analisi comparativa tra le varie tipologie nelle feci dei lattanti con bronchiolite emergono livelli fecali di acetato significativamente più elevati di propionato e butirato ($p = 0.0008$). All'analisi dell'associazione tra SCFA ed outcome clinici, invece, emerge che aumentati livelli di acetato sono significativamente associati ad aumentati livelli di SpO₂ al momento del ricovero. Infine, dall'analisi del microbiota fecale emergono significative associazioni tra la famiglia Dysgonomonadaceae, ed i livelli di acetato nelle feci ($p < 0.01$). Tutti questi dati sembrano indicare, sostengono gli Autori, che il microbiota intestinale ed i livelli di acetato da esso prodotti sono associati con una minore severità clinica della bronchiolite da VRS. A questo punto, gli Autori esplorano una fase interventistica preclinica (ex-vivo) dello studio, sottoponendo a somministrazione di SCFA-acetato le cellule della mucosa respiratoria ottenute dall'aspirato nasofaringeo dei lattanti arruolati nello studio per verificare effetti relativi alla carica virale e all'espressione di geni antivirali da parte di queste cellule. Dall'analisi emerge che il trattamento con SCFA-acetato riduce significativamente la carica del VRS rispetto alle cellule di lattanti infetti non trattati con SCFA ($p = 0.0156$). Inoltre, si osserva un incremento significativo dei geni OAS1, ISG15, MAVS, RIG-I e del recettore specifico degli SCFA FFAR2 (rispettivamente ($p = 0.002$, $p = 0.0008$, $p = 0.032$, $p = 0.008$ e $p = 0.0016$). Infine, non si osservano differenze significative nell'espressione di IFBN1 e TLR4 ($p > 0.05$). Alla somministrazione di SCFA-acetato su cellule ottenute da aspirati analoghi su pazienti adulti con infezione da SARS-CoV-2 viene dimostrato che gli effetti antivirali protettivi di SCFA-acetato sono propri solo nei confronti del VRS e non del SARS-CoV-2. Tutti questi dati indicano, in conclusione, che la chiave per la modulazione della severità clinica dell'infezione da VRS potrebbe risiedere in proteine fondamentali per la replicazione virale come RIG-I e che il controllo della produzione di sostanze come l'acetato e la presenza intestinale di batteri che ne promuovono tale produzione potrebbero essere fondamentali per determinare consistenti miglioramenti della clinica della bronchiolite da VRS.¹¹¹

Riassumendo, i risultati presenti finora in letteratura riguardo al microbiota nasale, nasofaringeo, orofaringeo ed intestinale in relazione all'evento bronchiolite sono molteplici, variegati, talora contrastanti a seconda dei lavori considerati, dove risultati successivi integrano, modificano, smentiscono osservazioni precedenti.

Di seguito è esposta la panoramica della letteratura riassunta in apposita tabella (Tabella 5). Seguono poi figure riassuntive (Figura 1-4).

Autore e anno, Paese, Periodo di arruolamento	Tipologia di studio, Popolazione campione dello studio, Materiale biologico collezionato ed analizzato	Dimensioni del campione, Frequenze sottogruppi	Outcome analizzati	Risultati (valore p)
Hyde et al., 2014, ⁸⁵ USA, 3 stagioni epidemiologiche consecutive (Nov-Apr 2011-2014)	<p>Studio di coorte prospettico multicentrico (MARC-35), Bambini < 2 anni ospedalizzati con diagnosi clinica secondo AAP di bronchiolite, AFN all'arruolamento ed analisi del microbiota da amplificazione delle regioni ipervariabili V3-V5 del DNA batterico estratto</p> <p>Criteri di esclusione: Arruolamento in precedenti versioni dello studio o > 24 ore dopo il ricovero, CC, pneumopatie, ID, prematurità (EG < 32 settimane)</p>	<p>100 bambini, 71/100 infezione da VRS, 16/100 infezione da RV, 5/100 co-infezione VRS+RV</p>	<p>Associazione tra genera batterici, patogeno virale della bronchiolite (VRS, RV, entrambi), wheezing al ricovero (presente/assente)</p>	<p>Aumentata prevalenza di H.influenzae nei pazienti con bronchiolite da VRS±RV (non nei casi di mono-infezione da RV, nessun risultato statistico riportato).</p> <p>M. catarrhalis Significativamente più comune nei pazienti con wheezing al momento del ricovero rispetto ai pazienti senza wheezing (p = 0.009)</p>
Mansbach et al., 2016, ⁸⁶ USA, 3 stagioni epidemiologiche consecutive (Nov-Apr 2011-2014)	<p>Studio di coorte prospettico multicentrico (MARC-35), Bambini < 2 anni ospedalizzati con diagnosi clinica secondo AAP di bronchiolite, AFN all'arruolamento ed analisi del microbiota da amplificazione della regione ipervariabile V4 del DNA batterico estratto</p> <p>Criteri di esclusione: Arruolamento in precedenti versioni dello studio o > 24 ore dopo il ricovero, CC, pneumopatie, ID, prematurità (EG < 32 settimane)</p>	<p>1005 lattanti < 1 anno, 580/1005 infezione VRS, 100/1005 co-infezione VRS+RV, 60 infezione RV</p>	<p>Associazione tra abbondanza relativa di genera batterici e patogeno virale (VRS, RV, VRS+RV)</p>	<p>Significativa maggiore abbondanza relativa del genus Streptococcus e significativa e ridotta abbondanza relativa dei genera Haemophilus e Moraxella nei lattanti con mono-infezione VRS (p < 0.001)</p>
Hasegawa et al., 2016, ⁸⁷ USA, 3 stagioni epidemiologiche consecutive (Nov-Apr 2011-2014)	<p>Studio di coorte prospettico multicentrico (MARC-35), Bambini < 2 anni ospedalizzati con diagnosi clinica secondo AAP di bronchiolite, AFN all'arruolamento ed analisi del microbiota da amplificazione della regione ipervariabile V4 del DNA batterico estratto</p> <p>Criteri di esclusione: Arruolamento in precedenti versioni dello studio o > 24 ore dopo il ricovero, CC, pneumopatie, ID,</p>	<p>1005 lattanti < 1 anno, 693/1005 infezione VRS</p> <p>4 profili di genera batterici dominanti nel microbiota: 1) Haemophilus (19.2%), 2) Moraxella (21.9%), 3) Streptococcus (28.2%), 4) profilo misto (30.7%)</p>	<p>Necessità di cure intensive (intesa come bisogno di ricovero in TIP e/o ventilazione), LOS ≥ 3 giorni</p>	<p>Nei pazienti con infezione da VRS, utilizzando il profilo Moraxella-dominante come riferimento e nel modello corretto per 10 fattori confondenti paziente-relati, rischio significativamente elevato di necessità di</p>

	prematùrità (EG < 32 settimane)			cure intensive e di LOS \geq 3 giorni nei pazienti con profilo Haemophilus-dominante. (OR 2.60, p = 0.02 e OR 3.56, p < 0.001 rispettivamente)
Hasegawa et al., 2016, ⁸⁸ USA, 3 stagioni epidemiologiche consecutive (Nov-Apr 2011-2014)	<p>Studio di coorte prospettico multicentrico (MARC-35), Bambini < 2 anni ospedalizzati con diagnosi clinica secondo AAP di bronchiolite e controlli sani età-combinati appaiati per età 1.5 mesi con i casi, Tampone fecale all'arruolamento ed analisi del microbiota da amplificazione della regione ipervariabile V4 del DNA batterico estratto</p> <p>Criteri di esclusione</p> <p>Per i pazienti con bronchiolite (casi): arruolamento in precedenti versioni dello studio o > 24 ore dopo il ricovero, CC, pneumopatie, ID, prematurità (EG < 32 settimane),</p> <p>Per i controlli sani: febbre, patologie respiratorie o gastrointestinali all'arruolamento o terapia antibiotica nei 7 giorni precedenti l'arruolamento</p>	<p>155 lattanti < 1 anno, 40/155 bronchioliti (casi), 115/155 controlli sani, 26/40 infezione VRS, 9/40 infezione RV</p> <p>4 profili di genera batterici dominanti nel microbiota fecale:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Escherichia (30%), 2) Bifidobacterium (21%), 3) Enterobacter/Veillonella (22%), 4) Bacteroides (28%) 	Confronto dei genera batterici dominanti tra i pazienti con bronchiolite (casi) ed i controlli sani	<p>All'analisi di sensibilità corretta per co-variabili dell'ospite (tra cui età, genere, trattamento steroideo prima dell'arruolamento) rischio significativamente più elevato di bronchiolite nei pazienti con profilo Bacteroides-dominante rispetto al profilo Enterobacter/Veillonella-dominante (OR, 4.12, p = 0.02).</p> <p>All'analisi di metodo lineare discriminante effect size, il genus Bacteroides risulta positivamente associato, ed il genus Veillonella risulta negativamente correlato con il rischio di bronchiolite (per entrambi p < 0.05)</p>
Rosas-Salazar et al., 2016, ⁸⁹ USA, N.D.	<p>Studio caso-controllo, Lattanti \leq 6 precedentemente sani con prima infezione da VRS (casi) e controlli sani asintomatici, Lavaggio nasale all'arruolamento (casi) e tampone nasale a secco (controlli) con analisi del microbiota da amplificazione delle regioni V1-V3 del DNA batterico estratto</p> <p>Criteri di esclusione:</p>	132 lattanti < 6 mesi, 99/132 infezione VRS, 33/132 controlli sani	Confronto dei genera batterici tra lattanti con infezione da VRS (casi) e controlli sani	<p>Significativamente più elevata abbondanza dei genera Haemophilus, Moraxella e Streptococcus nei casi con infezione da VRS rispetto ai controlli sani (q-value = 1.96×10^{-27}, q-value = 4.55×10^{-7},</p>

	Per casi e controlli: patologie croniche			q-value = 7.15×10^{-5} rispettivamente), e dei genera <i>Staphylococcus</i> e <i>Corynebacterium</i> nei controlli sani rispetto ai casi con infezione da VRS (q-value = 2.14×10^{-3} , q-value = 1.39×10^{-3} rispettivamente)
Rosas-Salazar et al., 2016, ⁹⁰ USA, N.D.	<p>Studio prospettico osservazionale monocentrico, Lattanti ≤ 7 mesi precedentemente sani con prima infezione delle vie aeree da VRS o RV, Lavaggio nasale all'arruolamento ed analisi del microbiota da amplificazione della regione ipervariabile V4 del DNA batterico estratto</p> <p>Criteri di esclusione: Patologie croniche, co-infezione VRS+RV</p>	135 lattanti ≤ 7 mesi, 83/135 infezione VRS, 52/135 infezione RV	Confronto dei genera batterici tra lattanti con infezione da VRS e lattanti con infezione da RV	<p>Abbondanza relativa del genus <i>Staphylococcus</i> significativamente più elevate nei lattanti con infezione da VRS rispetto ad infezione da RV (q<0.001),</p> <p>trend verso abbondanza più elevata del genus <i>Haemophilus</i> in infezione da VRS (q = 0.06)</p>
de Steenhuijsen Piters et al., 2016, ⁹¹ USA, 4 stagioni epidemiologiche di VRS consecutive (2010-2014)	<p>Studio osservazionale prospettico monocentrico, Bambini < 2 anni ospedalizzati o meno per prima infezione da VRS e controlli sani asintomatici, Tampone batterico nasofaringeo (con analisi del microbiota da amplificazione delle regioni V5-V7 del DNA batterico estratto) e campione di sangue all'arruolamento (con analisi del trascrittoma dell'ospite)</p> <p>Criteri di esclusione: Patologie sottostanti (prematùrità con nascita < 35 settimane di EG, CC, pneumopatie croniche, ID), storia di wheezing, terapia corticosteroidica o immunomodulatoria o antibiotica nelle 2 settimane precedenti, documentata co-infezione batterica</p>	132 bambini < 2 anni, 106/132 infezione VRS, 84/106 ospedalizzati, 22/106 non ricoverati, 26/132 controlli sani	<p>Severità clinica intesa come: Ospedalizzazione, LOS, Score clinico specificato dallo studio, necessità TIP, necessità ossigenoterapia</p> <p>Intensità espressione geni associate con segnale TLR, attivazione/reclutamento neutrofili, attivazione linfociti B, T e NK</p>	<p>Abbondanza relativa dei genera <i>H. influenzae</i> e <i>Streptococcus</i> positivamente associata a ospedalizzazione per infezione da VRS (p = 0.005 e p = 0.004 rispettivamente), abbondanza relativa del genus <i>S. aureus</i> negativamente associato alla necessità di ospedalizzazione per infezione da VRS (p = 0.025), ed abbondanza relativa di <i>Moraxella</i></p>

				<p>significativamente associata a non ospedalizzazione per infezione da VRS (p = 0.034).</p> <p>Nessuna differenza significativa osservabile in relazione a LOS, score clinico, necessità di TIP, necessità di ossigenoterapia nei pazienti ospedalizzati.</p> <p>Espressione dei geni correlate al segnale TLR ed alla attivazione/reclutamento dei neutrofilii significativamente più intensa nei cluster di H. influenzae e Streptococcus rispetto agli altri cluster (per il segnale TLR p = 0.005 and p = 0.008 rispettivamente, per l'attivazione/reclutamento dei neutrofilii p = 0.042 per entrambi i genera).</p> <p>Nessuna differenza significativa relativamente ai geni dei linfociti B, T, NK ed ai genera batterici.</p>
Hasegawa et al., 2017, ⁹² USA,	Studio di coorte prospettico multicentrico (MARC-35),	150 lattanti < 1 anno, 40/150 con bronchiolite severa,	Confronto dei genera batterici tra casi con	Prevalenza di casi di bronchiolite severa minima nei lattanti con

<p>3 stagioni epidemiologiche consecutive (Nov-Apr 2011-2014)</p>	<p>Bambini < 2 anni ospedalizzati con diagnosi clinica secondo AAP di bronchiolite (= bronchiolite severa) e controlli sani età- appaiati per età entro 1.5 mesi con i casi, Tampone nasale all'arruolamento ed analisi del microbiota da amplificazione della regione ipervariabile V4 del DNA batterico estratto</p> <p>Criteri di esclusione: Per i pazienti con bronchiolite (casi): arruolamento in precedenti versioni dello studio o > 24 ore dopo il ricovero, CC, pneumopatie, ID, prematurità (EG < 32 settimane), Per i controlli sani: prematurità (EG < 32 settimane), comorbidità, precedenti infezioni basse vie aeree necessitanti di visita medica urgente, accesso in PS o ricovero, febbre o patologia respiratoria o gastrointestinale intercorrente, terapia antibiotica nei 7 giorni precedenti l'arruolamento</p>	<p>26/40 infezione VRS, 9/40 infezione RV, 5/40 co-infezione VRS+RV 110/150 controlli sani</p> <p>4 profili di genera batterici dominanti nel microbiota: 1) Moraxella (37%), 2) Corynebacterium/ Dolosigranulum (27%) 3) Staphylococcus (15%) 4) profilo misto (20%)</p>	<p>bronchiolite severa e controlli sani</p>	<p>profilo Moraxella-dominante (14%) e massima nei lattanti con profilo Staphylococcus-dominante (57%) (OR 7.80; p < 0.001).</p> <p>All'analisi di sensibilità corretta per i patogeni virali (mono-infezione da VRS o RV, co-infezione VRS+RV) persiste significativa associazione tra profilo Staphylococcus-dominante e rischio più elevato di bronchiolite severa (OR 9.60; p = 0.004).</p> <p>All'analisi con metodo lineare discriminante effect size persiste associazione positiva tra genus Staphylococcus e rischio di bronchiolite severa (p < 0.05), mentre i genera Moraxella, Corynebacterium, Dolosigranulum, Streptococcus e Tumebacillus sono negativamente associati al rischio di bronchiolite severa (per tutti p < 0.05)</p>
<p>Stewart et al., 2017,⁹³ USA,</p>	<p>Studio di coorte prospettico multicentrico (MARC-35), Bambini < 2 anni ospedalizzati con diagnosi clinica secondo AAP di bronchiolite,</p>	<p>144 lattanti < 1 anno, 108/144 infezione VRS, 40/144 infezione RV,</p>	<p>Associazione tra</p>	<p>Il metabolismo sfingolipidico (20 metaboliti)</p>

<p>3 stagioni epidemiologiche consecutive (Nov-Apr 2011-2014)</p>	<p>AFN all'arruolamento ed analisi del microbiota da amplificazione della regione ipervariabile V4 del DNA batterico estratto</p> <p>Criteri di esclusione: Arruolamento in precedenti versioni dello studio o > 24 ore dopo il ricovero, CC, pneumopatie, ID, prematurità (EG < 32 settimane)</p>	<p>119/144 no VPP, 25/144 VPP</p>	<p>microbiota nasofaringeo, metaboloma nasofaringeo e severità della bronchiolite intesa come ricorso a VPP (LOS ≥ 3 giorni utilizzato come outcome di conferma)</p>	<p>è il sub pathway significativamente più associato al rischio di VPP ($p < 0.001$), dopo correzione dell'analisi per potenziali fattori confondenti 19 dei 20 metaboliti rimangono significativamente associati al rischio di VPP (per tutti e 19 $p < 0.05$), ripetendo l'analisi con outcome LOS ≥ 3 giorni e dopo correzione dell'analisi per potenziali fattori confondenti 17 dei 20 metaboliti rimangono significativamente associati al rischio di VPP (per tutti e 17 $p < 0.05$).</p> <p>I generi H. influenzae, M. catarrhalis, and S. pneumoniae dominano il microbiota nasofaringeo dei lattanti con bronchiolite severa: il genere S. pneumoniae è positivamente correlato con l'intensità di tutti i metaboliti sfingolipidici, mentre M. catarrhalis e H. influenzae sono negativamente correlati all'intensità di questi metaboliti (statistica N.D.).</p>
---	--	-----------------------------------	--	--

				<p>Nessuna correlazione significativa tra l'abbondanza di dati metagenomici del microbiota e l'intensità di metaboliti correlati con VPP (tale dato suggerisce che questi metaboliti siano di verosimile origine dell'ospite, non del microbiota), ma abbondanza di seril-tRNA sintetasi derivata da <i>S. pneumoniae</i> correla con intensità di amminoacido serina, substrato del metabolismo sfingolipidico (dato che suggerisce enhancement di tale metabolismo da parte di <i>S. pneumoniae</i>)</p>
<p>Hasegawa et al., 2017,⁹⁴ USA, 3 stagioni epidemiologiche consecutive (Nov-Apr 2011-2014)</p>	<p>Studio di coorte prospettico multicentrico (MARC-35), Bambini < 2 anni ospedalizzati con diagnosi clinica secondo AAP di bronchiolite (casi) e controlli sani appaiati per età entro 1.5 mesi con i casi, Tampone fecale all'arruolamento ed analisi del microbiota da amplificazione della regione ipervariabile V4 del DNA batterico estratto</p> <p>Criteri di esclusione Per i pazienti con bronchiolite (casi): arruolamento in precedenti versioni dello studio o > 24 ore dopo il ricovero, CC, pneumopatie, ID, prematurità (EG < 32 settimane), Per i controlli sani: febbre, patologie respiratorie o gastrointestinali all'arruolamento o terapia antibiotica nei 7 giorni precedenti l'arruolamento</p>	<p>155 lattanti < 1 anno, 40/155 bronchioliti (casi), 115/155 controlli sani, 4 profili di genera batterici dominanti nel microbiota fecale: 1) Escherichia (22%), 2) Bifidobacterium (19%), 3) Enterobacter/ Veillonella (15%), 4) Bacteroides (13%)</p>	<p>Confronto tra microbiota fecale, metaboloma fecale, attivazione genetica a livello intestinale nei casi di bronchiolite e nei controlli sani</p>	<p>Prevalenza di profilo Bacteroides-dominante significativamente maggiore e di profilo Enterobacter/Veillonella-dominante significativamente minore nei casi di bronchiolite paragonati ai controlli sani (p = 0.01).</p> <p>All'analisi metabolomica multivariata corretta per 9 fattori confondenti paziente-relati abbondanza di pathway metabolici sfingolipidico e glicosfingolipidico significativamente</p>

				<p>maggiore nei casi di bronchiolite rispetto ai controlli sani ($p < 0.05$), gli stessi pathway sono anche significativamente più intensi nei lattanti con profilo fecale Bacteroides-dominante in confronto con gli altri profili di microbiota fecale ($q < 0.001$).</p> <p>Correlazione positiva tra abbondanza relativa del genus Bacteroides e pathway metabolici sfingolipidici ($p < 0.001$)</p>
<p>Hasegawa et al., 2017,⁹⁵ USA, 3 stagioni epidemiologiche consecutive (Nov-Apr 2011-2014)</p>	<p>Studio di coorte prospettico multicentrico (MARC-35), Bambini < 2 anni ospedalizzati con diagnosi clinica secondo AAP di bronchiolite, AFN (con analisi del microbiota da amplificazione della regione ipervariabile V4 del DNA batterico estratto) e campione di sangue (con quantificazione dei livelli di catelicidina – LL-37 sierica mediante ELISA) all'arruolamento</p> <p>Criteria di esclusione: Arruolamento in precedenti versioni dello studio o > 24 ore dopo il ricovero, CC, pneumopatie, ID, prematurità (EG < 32 settimane)</p>	<p>1005 lattanti < 1 anno, 515/1005 con bassi livelli di LL-37 (≤ 46 ng/ml), 490/1005 con alti livelli di LL-37 (> 46 ng/ml), 92/515 e 69/490 con necessità di cure intensive, 436/515 e 377/490 con infezione da VRS, 95/515 e 98/490 con profilo Haemophilus-dominante, 110/515 e 110/490 con profilo Moraxella-dominante, 142/515 e 141/490 con profilo Streptococcus-dominante, 168/515 e 141/490 con profilo misto</p>	<p>Necessità di cure intensive (intesa come necessità di ricovero in TIP o di VM)</p>	<p>Tra I lattanti con bassi livelli di LL-37, quelli con profilo Haemophilus-dominante presentano rischio significativamente maggiore di necessità di cure intensive rispetto al profilo Moraxella-dominante (OR 4.14, $p = 0.003$), nessuna associazione significativa tra profili di microbiota dominante e necessità di cure intensive nei lattanti con elevati livelli di LL-37 ($p > 0.05$)</p>
<p>Hasegawa et al., 2017,⁹⁶</p>	<p>Studio di coorte prospettico multicentrico (MARC-35),</p>	<p>1005 lattanti < 1 anno,</p>	<p>Necessità di cure intensive (definite come</p>	<p>Tra i lattanti con bassi livelli di CCL5, quelli con</p>

<p>USA, 3 stagioni epidemiologiche consecutive (Nov-Apr 2011-2014)</p>	<p>Bambini < 2 anni ospedalizzati con diagnosi clinica secondo AAP di bronchiolite, AFN (con analisi del microbiota da amplificazione della regione ipervariabile V4 del DNA batterico estratto) e campione di sangue (con quantificazione dei livelli di chemochina-ligando 5 – CCL5 sierica mediante ELISA) all'arruolamento</p> <p>Criteri di esclusione: Arruolamento in precedenti versioni dello studio o > 24 ore dopo il ricovero, CC, pneumopatie, ID, prematurità (EG < 32 settimane)</p>	<p>498/1005 bassi livelli CCL5 (≤ 42 pg/ml), 507/1005 alti livelli CCL5 (> 42 pg/ml), 89/498 e 72/507 con necessità di cure intensive, 202/498 e 193/507 con LOS ≥ 3 giorni, 408/498 e 405/507 con infezione da VRS, 97/498 e 96/507 con profilo Haemophilus-dominante, 111/498 e 109/507 con profilo Moraxella-dominante, 139/498 e 144/507 con profilo Streptococcus-dominante, 151/498 e 158/507 con profilo misto</p>	<p>necessità di ricovero in TIP o di VM), LOS ≥ 3 giorni</p>	<p>profilo Haemophilus-dominante presentano rischio significativamente maggiore di necessità di cure intensive e di LOS ≥ 3 giorni rispetto al profilo Moraxella-dominante (OR 3.20, $p = 0.02$ e OR 4.14, $p < 0.001$ rispettivamente).</p> <p>Nessuna associazione significativa per i profili Streptococcus-dominante e profilo misto, né per i lattanti con elevati livelli sierici di CCL5, con aumentato rischio di necessità di cure intensive, né di LOS ≥ 3 giorni (per tutti $p > 0.05$)</p>
<p>Hu et al. 2017,⁹⁷ China, N.A.</p>	<p>Studio caso-controllo, Lattanti ≤ 1 anno ospedalizzati per bronchiolite lieve da infezione da VRS e controlli sani appaiati per età con i casi, Tampone orale e fecale all'arruolamento (e 7-10 giorni dopo le terapie per i casi di bronchiolite)</p> <p>Criteri di esclusione: Pazienti con bronchiolite (casi): N.D. Controlli sani: wheezing, febbre, tosse o altri sintomi respiratori/allergici o terapia antibiotica al campionamento e nelle 2 settimane precedenti l'arruolamento</p>	<p>49 lattanti ≤ 1 anno, 27/49 bronchioliti (casi), 22/49 controlli sani</p> <p>Terapie mediche: 11/27 antibiotici, 9/11 antibiotici ev, 2/11 antibiotici orali, 25/27 Budesonide + Salbutamolo/Ipratropio/ Terbutalina aerosol, 6/27 Magnesio Solfato, 2/27 MPD</p>	<p>Confronto del microbiota orofaringeo e fecale nei casi di bronchiolite e nei controlli sani.</p> <p>Confronto del microbiota orofaringeo e fecale prima e dopo i trattamenti medici nei casi di bronchiolite</p>	<p>Ridotto microbiota orofaringeo e fecale nei casi di bronchiolite rispetto ai controlli sani.</p> <p>Microbiota orofaringeo: profilo Streptococcus-dominante sia nei casi che nei controlli. Abbondanza di Firmicutes significativamente maggiore e di Bacteroides e Proteobacteria significativamente minore nei casi di bronchiolite rispetto ai controlli sani (q-value < 0.01, q-value < 0.01 e</p>

				<p>q-value < 0.05 rispettivamente).</p> <p>Microbiota fecale: Abbondanza di Bacteroides e Streptococcus significativamente maggiore e di Collinsella, Veilonella, Blautia and Erysipelaclostridium significativamente minore nei casi di bronchiolite rispetto ai controlli sani. (q-value < 0.05, q-value < 0.05, q-value < 0.01, q-value < 0.001 q-value < 0.01 e q-value < 0.05 rispettivamente).</p> <p>Nessuna differenza significative nella composizione del microbiota orofaringeo e fecale prima e dopo i trattamenti medici, eccetto che per cambiamenti nella diversity del microbiota fecale, minore dopo terapia antibiotica orale, uguale o maggiore dopo terapia antibiotica ev o assenza di terapia antibiotica (statistica N.D.)</p>
Toivonen et al., 2018, ⁹⁸ USA,	Studio di coorte prospettico multicentrico (MARC-35), Bambini < 2 anni ospedalizzati con diagnosi clinica secondo AAP di bronchiolite,	1005 lattanti < 1 anno, 498/1005 con bassi livelli vit. D25OH	Necessità di cure intensive (definite come	Tra i lattanti con bassi livelli di vitamina D25OH, profilo

<p>3 stagioni epidemiologiche consecutive (Nov-Apr 2011-2014)</p>	<p>AFN (con analisi del microbiota da amplificazione della regione ipervariabile V4 del DNA batterico estratto) e campione di sangue (con quantificazione dei livelli di vitamina D25OH) all'arruolamento</p> <p>Criteri di esclusione: Arruolamento in precedenti versioni dello studio o > 24 ore dopo il ricovero, CC, pneumopatie, ID, prematurità (EG < 32 settimane)</p>	<p>(< 26.5 ng/ml), 507/1005 con alti livelli vit. D25OH (> 26.5 pg/ml), 102/498 and 59/507 con necessità cure intensive, 400/498 and 413/507 con infezione da VRS, 94/498 and 99/507 con profilo Haemophilus-dominante, 96/498 and 124/507 con profilo Moraxella-dominante, 159/498 and 124/507 con profilo Streptococcus-dominante, 149/498 and 160/507 con profilo misto</p>	<p>necessità di ricovero in TIP o di VM)</p>	<p>Haemophilus-dominante significativamente associato ad elevato rischio di necessità di cure intensive rispetto al profilo Moraxella-dominante (OR 3.08, p = 0.01).</p> <p>Nessuna associazione significativa tra microbiota ed outcome di severità nei lattanti con elevati livelli di vitamina D 25OH (per tutte le analisi p > 0.20).</p>
<p>Luna et al., 2018,⁹⁹ USA, 3 stagioni epidemiologiche consecutive (Nov-Apr 2011-2014)</p>	<p>Studio di coorte prospettico multicentrico (MARC-35), Bambini < 2 anni ospedalizzati con diagnosi clinica secondo AAP di bronchiolite, TN e AFN all'arruolamento con analisi del microbiota da amplificazione della regione ipervariabile V4 del DNA batterico estratto</p> <p>Criteri di esclusione: Arruolamento in precedenti versioni dello studio o > 24 ore dopo il ricovero, CC, pneumopatie, ID, prematurità (EG < 32 settimane)</p>	<p>815 lattanti < 1 anno</p> <p>6 profili di genera batterici dominanti nel microbiota: 1) Haemophilus (7.2%), 2) Moraxella (13.0%), 3) Streptococcus (44.5%), 4) Corynebacterium (13.4%), 5) Enterobacter (7.5%), 6) profilo misto (14.4%)</p>	<p>Necessità di cure intensive (definite come necessità di ricovero in TIP o di VM), LOS ≥ 5 giorni</p>	<p>Confermate per microbiota da TN le associazioni significative microbiota-severità clinica già note per il microbiota da AFN, co OR ancora maggiori: elevato rischio di necessità di cure intensive e di LOS ≥ 5 giorni per il profilo Haemophilus-dominante rispetto a tutti gli altri profili (OR 6.43, p < 0.001 e OR 4.31, p = 0.002 rispettivamente)</p>
<p>Stewart et al., 2018,¹⁰⁰ USA, 3 stagioni epidemiologiche consecutive (Nov-Apr</p>	<p>Studio di coorte prospettico multicentrico (MARC-35), Studio cross-sectional su bambini < 2 anni ospedalizzati con diagnosi clinica secondo AAP di bronchiolite da VRS o RV, AFN all'arruolamento con analisi del microbiota da amplificazione della regione ipervariabile V4 del DNA batterico estratto e del metaboloma</p>	<p>58 lattanti < 1 anno, 39 infezione da VRS, 19 infezione da RV</p>	<p>Associazione tra patogeno virale ed abbondanza relativa di genera batterici ed analisi metabolomica</p>	<p>I metaboliti associati all'infezione da VRS appartengono ad un ampio range di pathways, incluso il metabolismo dei carboidrati</p>

2011-2014)	<p> Criteri di esclusione: Arruolamento in precedenti versioni dello studio o > 24 ore dopo il ricovero, CC, pneumopatie, ID, prematurità (EG < 32 settimane) </p>			<p> (N-acetilglucosamina-N-acetilgalattosamina), quello lipidico (mevalonolattone), quello amminoacidico (5-oxoprolina) e quello energetico (2-metilcittrato-omocitrato). I metaboliti associati ad infezione da RV appartengono invece ad un unico pathway, quello amminoacidico (N-acetil-treonina, N-acetil-leucina, N-acetil-isoleucina, N-acetil-fenilalanina, N-acetil-valina, N-acetil-glutamato, N-acetil-tirosina, N-acetil-lisina). </p> <p> I lattanti con infezione da VRS presentano elevata abbondanza relativa di <i>S. pneumoniae</i>, mentre l'infezione da RV correla con elevata abbondanza relativa di <i>H. influenzae</i>. </p> <p> L'abbondanza relativa di <i>S. pneumoniae</i> correla positivamente con elevata intensità di metaboliti sfingolipidici, ma associazione debolmente positiva, non significativa, tra elevati metaboliti sfingolipidici ed infezione da VRS. </p>
------------	---	--	--	---

				Nessuno dei metaboliti che differiscono significativamente tra i due gruppi (infezione da VRS, infezione da RV) sono di origine batterica, bensì di produzione da parte dell'ospite.
Ederveen et al., 2018, ¹⁰¹ Paesi Bassi, 3 stagioni invernali consecutive (2010-2013)	Studio osservazionale retrospettivo, Lattanti < 6 mesi ospedalizzati per infezione da VRS e controlli sani appaiati per età ai casi, AFN all'arruolamento (e 4-6 settimane dopo la dimissione per i pazienti ospedalizzati), analisi del microbiota da amplificazione delle regioni V3-V4 del DNA batterico estratto e quantificazione mediante ELISA delle molecole CCL5, CXCL10, MMP9, IL6 e CXCL8	75 lattanti < 6 mesi, 54/75 infezione da VRS, 9/54 infezione lieve, 27/54 infezione media, 18/54 infezione severa, 21/75 controlli sani	Confronto dei genera batterici tra i lattanti con infezione da VRS ed i controlli sani. Confronto dei genera batterici nei lattanti con infezione da VRS tra il campione ottenuto all'arruolamento e quello al controllo 4-6 settimane dopo la dimissione. Associazione tra microbiota e sistema infiammatorio durante infezione acuta da VRS e al controllo 4-6 settimane dopo la dimissione.	All'analisi dell' α -diversity emerge una significativa riduzione della ricchezza delle specie batteriche nei lattanti con infezione da VRS rispetto ai controlli (p = 0.006), più pronunciata al confronto tra casi con infezione moderata e severa rispetto ai controlli (p = 0.016 e p = 0.024 rispettivamente). All'analisi dei genera, prevalenza significativamente maggiore di Haemophilus e Achromobacter nei lattanti con infezione da VRS rispetto ai controlli (p = 0.011 e p = 0.001 rispettivamente), nessuna differenza di specie al confronto tra il campione ottenuto 4-6

				<p>settimane dopo la dimissione ed i controlli.</p> <p>All'analisi RDA i genera batterici sono significativamente separati tra loro solo alla stratificazione della coorte per livelli di CXCL8 (p = 0.036).</p> <p>All'analisi della correlazione di Spearman, CXCL8 e IL6 correlano positivamente con infezione da VRS (p = 0.0009/rho = 0.39 e p = 0.0001/rho = 0.51 rispettivamente), ritornando a livelli normali dopo guarigione da VRS e con livelli significativamente ridotti al confronto tra fase acuta e controllo 4-6 settimane dopo dimissione (CXCL8 p = 0.005, IL6 p = 0.02).</p>
<p>Mansbach et al., 2019,¹⁰² USA, 3 stagioni epidemiologiche consecutive (Nov-Apr 2011-2014)</p>	<p>Studio di coorte prospettico multicentrico (MARC-35), Bambini < 2 anni ospedalizzati con diagnosi clinica secondo AAP di bronchiolite, AFN all'arruolamento e TN 3 settimane dopo la dimissione con analisi del microbiota da amplificazione della regione ipervariabile V4 del DNA batterico estratto</p> <p>Criteria di esclusione: Arruolamento in precedenti versioni dello studio o > 24 ore dopo il ricovero, CC, pneumopatie, ID, prematurità (EG < 32 settimane)</p>	<p>557 lattanti ≤ 6 mesi, 405/557 mono-infezione VRS, 152/557 co-infezione VRS+RV, 451/557 senza ritardata clearance VRS, 106/557 con ritardata clearance VRS</p> <p>4 profili di genera batterici dominanti nel microbiota: 1) Haemophilus (16.5%),</p>	<p>Associazione tra profili di microbiota e ritarda clearance del VRS</p>	<p>All'analisi multivariata corretta per 11 caratteristiche del paziente, rischio significativamente più elevato di ritardata clearance VRS per il profilo Haemophilus-dominante rispetto al profilo misto, usato come riferimento (OR 2.77, p = 0.006).</p>

		2) Moraxella (20.7%), 3) Streptococcus (32.5%), 4) profilo misto (30.3%)		All'analisi di sensibilità con esclusione dei pazienti con co-infezione virale (405 pazienti con mono-infezione da VRS) persiste il rischio significativamente più elevato di ritardata clearance VRS per il profilo Haemophilus-dominante rispetto al profilo misto, usato come riferimento (OR 4.27, p = 0.001)
Stewart et al., 2019, ¹⁰³ USA, 3 stagioni epidemiologiche consecutive (Nov-Apr 2011-2014)	Studio di coorte prospettico multicentrico (MARC-35), Bambini < 2 anni ospedalizzati con diagnosi clinica secondo AAP di bronchiolite, AFN (con analisi del microbiota da amplificazione della regione ipervariabile V4 del DNA batterico estratto) e campione di sangue (con analisi metabolica) all'arruolamento Criteri di esclusione: Arruolamento in precedenti versioni dello studio o > 24 ore dopo il ricovero, CC, pneumopatie, ID, prematurità (EG < 32 settimane)	140 lattanti ≤ 6 mesi, 63/140 mono-infezione VRS, 26/140 mono-infezione RV, 18/140 co-infezione VRS+RV, 33/140 infezione da altro patogeno virale	Necessità di VPP	Profili metabolomici significativamente differenti tra i lattanti che necessitano e quelli che non necessitano di VPP (p < 0.001), con 1-palmitoil-2-palmitoleoil-GPC (16:0/16:1) significativamente associato ad aumentato rischio di necessità di VPP (adjusted FDR = 0.005), 3 metaboliti del pathway del plasmalogeno, vitamina A, tiroxina e triptofano significativamente associati a ridotto rischio di necessità di VPP (adjusted FDR < 0.05). Abbondanza relativa del genus Streptococcus positivamente associata ai metaboliti correlati con

				<p>aumentato rischio di necessità di VPP e negativamente associata ai metaboliti correlati con ridotto rischio di necessità di VPP,</p> <p>abbondanza relativa del genus Moraxella con associazioni opposte a quelle del genus Streptococcus.</p> <p>(per tutti sPLS 0.84)</p>
<p>Sonawane et al., 2019,¹⁰⁴ USA, 2 stagioni invernali (2012-2014)</p>	<p>Studio osservazionale prospettico, Lattanti < 10 mesi con infezione da VRS, TN all'arruolamento (fase acuta) e dopo 1 mese (fase follow-up) con analisi del microbiota da amplificazione della regione V3-V4 del DNA batterico estratto, campione di sangue all'arruolamento (fase acuta) e 12-16 giorni dopo (fase follow-up) con analisi del trascrittoma cellulare dei linfociti T CD4+</p> <p>Criteri di esclusione: Prematurità (≤ 36 settimane di EG), comorbidità</p>	<p>58 lattanti < 10 mesi, 35/58 infezione severa (pazienti ospedalizzati), 23/58 infezione lieve (pazienti ambulatoriali)</p>	<p>Confronto tra genera batterici del microbiota nasofaringeo nella fase acuta ed in follow-up e nei pazienti con infezione severa e lieve,</p> <p>Confronto tra profili trascrittomici dei linfociti T CD4+ nella fase acuta ed in follow-up e nei pazienti con infezione severa e lieve,</p> <p>Associazione tra composizione del microbiota nasofaringeo e profili trascrittomici dei linfociti T CD4+</p>	<p>Il genus <i>H. influenzae</i> risulta positivamente associato ad infezione severa, mentre i genera <i>Ralstonia</i> e <i>Streptococcus</i> risultano negativamente associati ad infezione severa ($p < 0.05$).</p> <p>α-diversity significativamente più elevata nei lattanti con infezione severa rispetto a quelli con infezione lieve in fase acuta ($p = 0.011$), ma anche al confronto tra fase acuta e fase follow-up nei lattanti con infezione severa ($p = 0.0057$)</p> <p>All'analisi del trascrittoma dei linfociti T CD4+ 27 geni risultano differentemente espressi al confronto tra fase acuta e</p>

				fase follow-up (FDR < 0.05)
Fujiogi et al., 2020, ¹⁰⁵ USA, 3 stagioni epidemiologiche consecutive (Nov-Apr 2011-2014)	<p>Studio di coorte prospettico multicentrico (MARC-35), Bambini < 2 anni ospedalizzati con diagnosi clinica secondo AAP di bronchiolite, AFN all'arruolamento con analisi del microbiota da amplificazione della regione ipervariabile V4 del DNA batterico estratto</p> <p>Criteri di esclusione: Arruolamento in precedenti versioni dello studio o > 24 ore dopo il ricovero, CC, pneumopatie, ID, prematurità (EG < 32 settimane)</p>	<p>10 lattanti < 10 mesi, 5/10 infezione da VRS, 5/10 infezione da RV</p> <p>Composizione generale microbiota nasofaringeo: 1) M. catarrhalis (32%), 2) S. mitis (7%), 3) S. pneumoniae (6%), 4) Prevotella spp. (5%), 5) P. melaninogenica (5%), 6) H. influenzae (4%)</p>	<p>Confronto tra composizione e funzioni (metatrascrittoma) del microbiota nasofaringeo nei lattanti con infezione da VRS e in quelli con RV,</p> <p>Confronto dell'espressione genetica (trascrittoma) dell'ospite nelle alte vie aeree nei lattanti con infezione da VRS e in quelli con RV</p>	<p>Abbondanza relativa del genus Moraxella significativamente elevata e del genus Streptococcus significativamente ridotta nei lattanti con infezione da VRS rispetto a quelli con infezione da RV (q-value < 0.05).</p> <p>All'analisi del metatrascrittoma, profili di espressione genetica microbica significativamente differenti tra i due gruppi di infezione virale, con i geni coaA e mazF sovra-regolati nei lattanti con infezione da VRS e altri 16 geni sovra- regolati nei lattanti con infezione da RV (q < 0.05).</p>
Harding et al., 2020, ¹⁰⁶ USA, 2 stagioni epidemiologiche VRS consecutive (2014-2016)	<p>Studio osservazionale prospettico, Lattanti con infezione da VRS, Campione fecale raccolto all'arruolamento con analisi del microbiota da amplificazione della regione ipervariabile V4 del DNA batterico estratto</p> <p>Criteri di esclusione: CC, ID, terapia antivirale o immunomodulante durante il ricovero, antibioticoterapia nelle 4 settimane precedenti l'arruolamento, ossigenoterapia > 7 giorni nei 3 mesi precedenti l'arruolamento</p>	<p>95 lattanti < 6 mesi, 37/95 infezione da VRS lieve (pazienti ambulatoriali), 53/95 infezione da VRS moderata (reparto generale), 5/95 infezione da VRS severa (TIP)</p>	<p>Confronto della composizione del microbiota intestinale tra i lattanti con infezione da VRS lieve (= controlli), moderata e severa</p>	<p>All'analisi della α-diversity, nessuna differenza tra i controlli ed i pazienti con infezione da VRS moderata o severa, né tra infezione moderata e infezione severa. (p > 0.05)</p> <p>All'analisi della β-diversity, significativa differenza di distanza filogenetica tra le</p>

				<p>popolazioni batteriche dei controlli in confronto ad infezione moderata/severa e tra infezione moderata e infezione severa ($p < 0.0001$ e $p = 0.031$ rispettivamente).</p> <p>All'analisi dei genera batterici, genus S24_7 associato a infezione severa rispetto ai controlli e genera S24_7, Odoribacter e Oribacterium associati con infezione severa rispetto a moderata, mentre i genera Clostridiales and Coriobacteriaceae sono associati a infezione moderata in confronto a infezione severa (per tutti $p < 0.05$)</p>
Alba et al., 2021, ¹⁰⁷ Spain, 2017-2018	<p>Studio caso-controllo, Bambini < 2 anni con diagnosi clinica secondo AAP di bronchiolite da infezione accertata da VRS e controlli sani, lavaggio nasale e campione fecale all'arruolamento con analisi del microbiota da amplificazione delle regioni ipervariabili V3-V4 del DNA batterico estratto e analisi immunologiche</p> <p>Criteri di esclusione: Precedente episodio di wheezing o distress respiratorio, ID, comorbidità croniche o allergie, terapia con immunosoppressori</p>	<p>75 bambini < 2 anni, 58/75 infezione da VRS, 17/75 controlli sani, 55/75 pazienti ricoverati, 11/55 ingresso in TIP 26/55 LOS < 7 giorni, 28/55 LOS \geq 7 giorni</p> <p>5 profili dominanti di microbiota nasale: 1) Haemophilus (24%), 2) Staphylococcus (22%), 3) Corynebacterium (13%),</p>	<p>Confronto della composizione del microbiota nasale tra casi con bronchiolite da VRS e controlli sani,</p> <p>Confronto della composizione del microbiota fecale tra casi con bronchiolite da VRS e controlli sani,</p> <p>Confronto dei profili immunologici nasali tra</p>	<p>All'analisi del phylum del microbiota nasale, abbondanza relativa significativamente maggiore di Proteobacteria e significativamente ridotta di Firmicutes e Actinobacteria nei casi di bronchiolite in confronto ai controlli sani ($p < 0.001$, $p = 0.010$ e</p>

		<p>4) Streptococcus ± Haemophilus ± Staphylococcus (26%) 5) Moraxella/Streptococcus (15%)</p>	<p>casi con bronchiolite da VRS e controlli sani,</p> <p>Confronto dei profili immunologici fecali tra casi con bronchiolite da VRS e controlli sani</p>	<p>p = 0.019 rispettivamente).</p> <p>All'analisi dei genera del microbiota nasale, abbondanza relativa significativamente maggiore di Haemophilus e Mannheimia e significativamente ridotta di Staphylococcus e Corynebacterium nei casi di bronchiolite in confronto ai controlli sani (p = 0.004 e p = 0.011, p = 0.023 e p = 0.007 rispettivamente).</p> <p>Il profilo Haemophilus dominante è presente solo nei casi di bronchiolite, inoltre l'abbondanza relativa di Haemophilus è significativamente maggiore nei lattanti ≥ 4 mesi in confronto ai lattanti < 4 mesi e nei lattanti con fratelli rispetto ai figli unici (p = 0.012 e p = 0.043 rispettivamente).</p> <p>Nei lattanti ospedalizzati, abbondanza relativa significativamente maggiore di Haemophilus e Mannheimia e Corynebacterium nei pazienti con LOS ≥ 7</p>
--	--	---	--	---

				<p>giorni in confronto a quelli con LOS < 7 giorni (p = 0.013, p = 0.045, e p = 0.048 rispettivamente), abbondanza relativa significativamente maggiore di Acinetobacter nei lattanti che necessitano di TIP in confronto a quelli che non necessitano di TIP, nei lattanti che necessitano di supporto respiratorio rispetto a quelli che non ne necessitano, nei pazienti con polmonite rispetto a quelli senza polmonite (p = 0.019, p = 0.028, e p = 0.036 rispettivamente).</p> <p>All'analisi del microbiota fecale, abbondanza relativa del genus Staphylococcus significativamente ridotta nei casi di bronchiolite rispetto ai controlli sani (p = 0.046).</p> <p>All'analisi del profilo immunologico nasale, concentrazioni significativamente più elevate di BAFF/TNFSF13B e sTNF-R1 nei casi di</p>
--	--	--	--	---

				<p>bronchiolite rispetto ai controlli sani (p < 0.010).</p> <p>All'analisi del profilo immunologico fecale, concentrazioni significativamente più elevate di BAFF/TNFSF13B e IL-35 e significativamente ridotte di APRIL/TNFSF13, IFN-β, IFN-γ, IL-19, IL-20, IL-29/IFNλ, IL-32, LIGHT/TNFSF14, MMP3, osteocalcina, pentraxina3, TSLP nei casi di bronchiolite rispetto ai controlli sani (tutte p < 0.05).</p>
<p>Fujiogi et al., 2022,¹⁰⁸ USA, 3 consecutive bronchiolitis seasons (Nov-Apr 2011-2014)</p>	<p>Studio di coorte prospettico multicentrico (MARC-35), Bambini < 2 anni ospedalizzati con diagnosi clinica secondo AAP di bronchiolite, AFN all'arruolamento con analisi del microbiota da amplificazione del DNA batterico estratto, analisi del metatrascrittoma batterico e del trascrittoma dell'ospite</p> <p>Criteri di esclusione: Arruolamento in precedenti versioni dello studio o > 24 ore dopo il ricovero, CC, pneumopatie, ID, prematùrità (EG < 32 settimane)</p>	<p>244 lattanti < 1 anno 222/244 infezione VRS, 51/244 infezione RV, 29/244 co-infezione VRS+RV, 41/244 necessità di cure intensive, 17/244 necessità di VPP</p>	<p>Elevata severità clinica (definita dalla necessità di VPP), necessità di cure intensive (intesa come necessità di VPP e/o ricovero in TIP)</p>	<p>All'analisi del microbiota, abbondanza maggiore dei genera S. pneumoniae, C. acnes, H. influenzae, C. simulans e S. mitis e abbondanza ridotta dei genera M. catarrhalis, E. coli, P. melaninogenica e P. nanceiensis sono significativamente associate a rischio di necessità di VPP (per tutti FDR < 0.001). All'analisi del microbiota fungino, abbondanza maggiore di Malassezia restricta, Sugiyamaella lignohabitans, Aspergillus</p>

				<p>heteromorphus, Melampsora larici-populina e Penicillium rubens e abbondanza ridotta di Malassezia globosa, Ramularia collo-cygni, Trametes versicolor, Pseudogymnoascus destructans, e Phycomyces blankesleeanus sono significativamente associate a rischio di necessità di VPP (per tutti FDR < 0.001).</p> <p>All'analisi del metatrascrittoma del microbiota intensità di 5 pathways (es. sovra-regolazione del metabolismo lipidico e della componente detossificante del metabolismo ossidativo) significativamente differenti nei lattanti con necessità di VPP rispetto a quelli senza tale necessità (per tutti FDR < 0.05).</p> <p>All'analisi del trascrittoma dell'ospite, intensità di 102 pathways (es. sotto-regolazione del pathway di IFN-I, IFN-γ, della risposta difensiva agli agenti virali, dell'attivazione delle</p>
--	--	--	--	---

				<p>cellule linfocitarie T, sovra-regolazione del pathway dei neutrofil) significativamente differenti nei lattanti con necessità di VPP rispetto a quelli senza tale necessità (per tutti FDR < 0.05).</p> <p>All'analisi integrativa dei 5 principali moduli del microbiota, del metatrascrittoma microbico e del trascrittoma dell'ospite, il modulo del microbiota S. pneumoniae/S. aureus è positivamente correlato con il rischio di necessità di VPP (OR 2.55, p < 0.05), i moduli del metatrascrittoma microbico dei geni della membrana plasmatica, del metabolismo mRNA, degli amminoacidi ramificati, dello stress ossidativo, del pathway NADH sono negativamente associati al rischio di necessità di VPP (OR 0.30, p < 0.05, OR 0.35, p < 0.05, OR 0.73, p < 0.05, e OR 0.57, p < 0.05, e OR 0.59, p < 0.05 rispettivamente),</p>
--	--	--	--	---

				<p>il modulo del trascrittoma dell'ospite IL-1/neutrofili è positivamente associato al rischio di necessità di VPP (OR 3.94, $p < 0.05$), i moduli del trascrittoma dell'ospite della regolazione T-linfocitaria, del recettore della proteina G del VRS, dell'IFN-I della risposta dell'ospite tipo I sono negativamente associati al rischio di necessità di VPP (OR 0.24, $p < 0.05$, OR 0.38, $p < 0.05$, OR 0.37, $p < 0.05$, e OR 0.43, $p < 0.05$ rispettivamente)</p>
<p>Rosas-Salazar et al., 2022,¹⁰⁹ USA, 2012-2013</p>	<p>Studio di coorte prospettico (INSPIRE), Lattanti < 1 anno nati a termine, non LBW, precedentemente sani, con ≥ 1 episodio di infezione da VRS nel corso della 1° stagione epidemica VRS della loro vita, Lavaggio nasale all'arruolamento con analisi del microbiota da amplificazione della regione ipervariabile V4 del DNA batterico estratto e analisi immunologiche mediante immunoassay</p>	<p>357 lattanti ≤ 6 mesi, 302/357 con mono-infezione VRS, 50/357 con co-infezione VRS+RV, 1/357 con co-infezione VRS+EV, 4/357 con co-infezione VRS+RV+EV, 53/357 ospedalizzati, 25/53 con necessità di ossigenoterapia, 4/53 con necessità di ricovero in TIP</p>	<p>Associazione tra microbiota nasofaringeo durante infezione da VRS e outcome a breve termine (score di severità clinica specificato dallo studio, rischio infezione basse vie aeree) e a lungo termine (wheezing al 4° anno di vita),</p> <p>Associazione tra microbiota nasofaringeo durante infezione da VRS e risposta immune nasofaringea,</p> <p>Associazione tra microbiota nasofaringeo durante infezione da VRS</p>	<p>α-diversity positivamente associata a outcome a breve termine (score di severità clinica specificato dallo studio, rischio infezione basse vie aeree) e a lungo termine (wheezing al 4° anno di vita) ($p = 0.01$, $p = 0.01$ e $P < 0.001$ rispettivamente), β-diversity o genera batterici specifici non associati significativamente a outcome a breve e lungo (per tutti $p > 0.05$).</p>

			<p>e risposta immune nasofaringea relativamente a outcome a breve termine (score di severità clinica specificato dallo studio, rischio infezione basse vie aeree) e a lungo termine (wheezing al 4° anno di vita)</p>	<p>All'analisi di regressione, l'abbondanza relativa di Klebsiella e Moraxella è positivamente associata ai livelli di risposta immune tipo 2 (IL-13 e IL-4 rispettivamente), tipo 3 (IL-17A) e pro-infiammatoria (TNF-α, IL-1b, IL-6, IL-8 e MCP-1), l'abbondanza di Haemophilus e Streptococcus è positivamente associata (ma senza significatività statistica) con i livelli di IL-17A, TNF-α, IL-1b, IL-6, MCP-1, e di TNF-α e IL-8 rispettivamente. L'abbondanza di Methylobacterium è negativamente associata con i livelli di risposta immune tipo 1 (IFN-γ, IL-2 e IL-12), tipo 2 (IL-4, IL-5 e IL-13), tipo 3 (IL-17A) e pro-infiammatoria (TNF-α, IL-1b, IL-6, IL-8, MCP-1 e MIP-1α).</p> <p>All'analisi integrata dell'associazione tra microbiota, risposta immune locale e outcome clinici emerge una interazione significativa tra l'indice di Shannon e il gruppo 1 di citochine</p>
--	--	--	---	---

				<p>(IL-2, IL-4, IL-2R, IL-17A, IL-12) della risposta immune locale (p = 0.048), con una direzione di causalità positiva all'associazione tra il gruppo 1 ed aumentati valori dello score di severità clinica per valori elevati di indice di Shannon, direzione negativa per valori ridotti dell'indice di Shannon.</p> <p>Nessuna associazione significativa all'analisi di mediazione per gli altri outcome clinici.</p>
<p>De Maio et al., 2022,¹¹⁰ Italia, Ott-Dic 2019</p>	<p>Studio osservazionale prospettico monocentrico, Lattanti < 6 mesi ospedalizzati con diagnosi clinica secondo AAP di bronchiolite, Campione fecale all'arruolamento con analisi del microbiota da amplificazione della regione ipervariabile V4 del DNA batterico estratto</p> <p>Criteri di esclusione: Sintomatologia gastrointestinale all'arruolamento, terapia antibiotica nei 7 giorni precedenti l'arruolamento</p>	<p>37 lattanti < 6 mesi, 25/37 infezione VRS, 4/24 co-infezione VRS+RV, 12/37 infezione non-VRS, 24/25 e 1/12 SpO₂ < 90% al ricovero, 4/25 and 0/12 necessità di cure intensive</p>	<p>Confronto della composizione del microbiota fecale nei lattanti con bronchiolite da VRS rispetto a quelli con bronchiolite non da VRS</p>	<p>All'analisi della α-diversity, nessuna differenza significativa relativa alla diversità di specie, né alla diversità filogenetica nei lattanti con infezione da VRS confrontati con quelli con infezione non da VRS (p > 0.05).</p> <p>All'analisi della β-diversity, nessuna separazione del microbiota significativa nei lattanti con infezione da VRS confrontati con quelli con infezione non da VRS (p > 0.05).</p>

				Nessuna differenza significativa tra genera batterici nei lattanti con SpO ₂ < 90% al ricovero per infezione da VRS rispetto a quelli con SpO ₂ < 90% al ricovero per infezione non da VRS (p > 0.05)
Antunes et al., 2022, ¹¹¹ Brazil, N.A.	<p>Studio cross-sectional, Lattanti < 1 anno ospedalizzati per bronchiolite da VRS accertata e negativi per gli altri virus, AFN e campione fecale all'arruolamento con analisi del microbiota da amplificazione della regione V2 del DNA batterico estratto e (per il campione fecale) analisi dei livelli di SCFA</p> <p>Criteri di esclusione: Comorbidità o uso di corticosteroidi inalatori</p>	30 lattanti, 17/30 campioni fecali	LOS, valore SpO ₂ al ricovero, durata sintomi	<p>Livelli di acetato fecale significativamente maggiori rispetto a butirrato e propionato (p = 0.0008), aumentati livelli di acetato significativamente associati ad aumentati valori di SpO₂ al ricovero (p = 0.026), phylum Bacteroidetes (classe Bacteroidia) associato con SCFA e outcome clinici, con famiglia Dysgonomonadaceae significativamente associate a incremento di acetato fecale (p < 0.01), e famiglia Bacteroidaceae positivamente associata con LOS e durata dell'ossigenoterapia (p < 0.05). Al contrario, il genus Mollicutes RF39 (phylum Tenericutes) è inversamente correlato con LOS (p < 0.05).</p>

				<p>Alle analisi ex-vivo condotte su cellule dell'AFN ottenuto dai pazienti, il trattamento con SCFA-acetato riduce significativamente la carica del VRS sulle cellule trattate rispetto a quelle non trattate (p = 0.0156), inoltre riduzione significative dell'espressione di OAS1, ISG15, MAVS, RIG-I e del recettore specifico per SCFA FFAR2 (p = 0.002, p = 0.0008, p = 0.032, p = 0.008, e p = 0.0016 rispettivamente), nessuna differenza significativa nell'espressione di IFBN1 and TLR4 (p > 0.05)</p>
--	--	--	--	--

Tabella 5: riassunto degli studi con risultati in merito a microbiota nasofaringeo e/o intestinale in corso di infezione delle vie aeree/bronchiolite da VRS

Note: AFN = aspirato faringonasale, CC = cardiopatia congenita, EV = Enterovirus, ID = immunodeficit, INSPIRE = Infant Susceptibility to Pulmonary Infections and Asthma Following RSV Infection in Infancy, LBW = low birth weight, LOS = lenght of stay/durata di degenza, MPD = metilprednisolone, ND = non disponibile, PS = Pronto Soccorso, RDA = analisi di ridondanza, RV = Rhinovirus, SCFA = acidi grassi a catena corta, SpO₂ = saturazione ossigeno, sPLS = sparse partial least squares, TIP = Terapia Intensiva Pediatrica, TLR = Toll-like receptor, TN = tampone nasale, VM = ventilazione meccanica, VPP = ventilazione a pressione positiva, VRS = Virus Respiratorio Sinciziale.

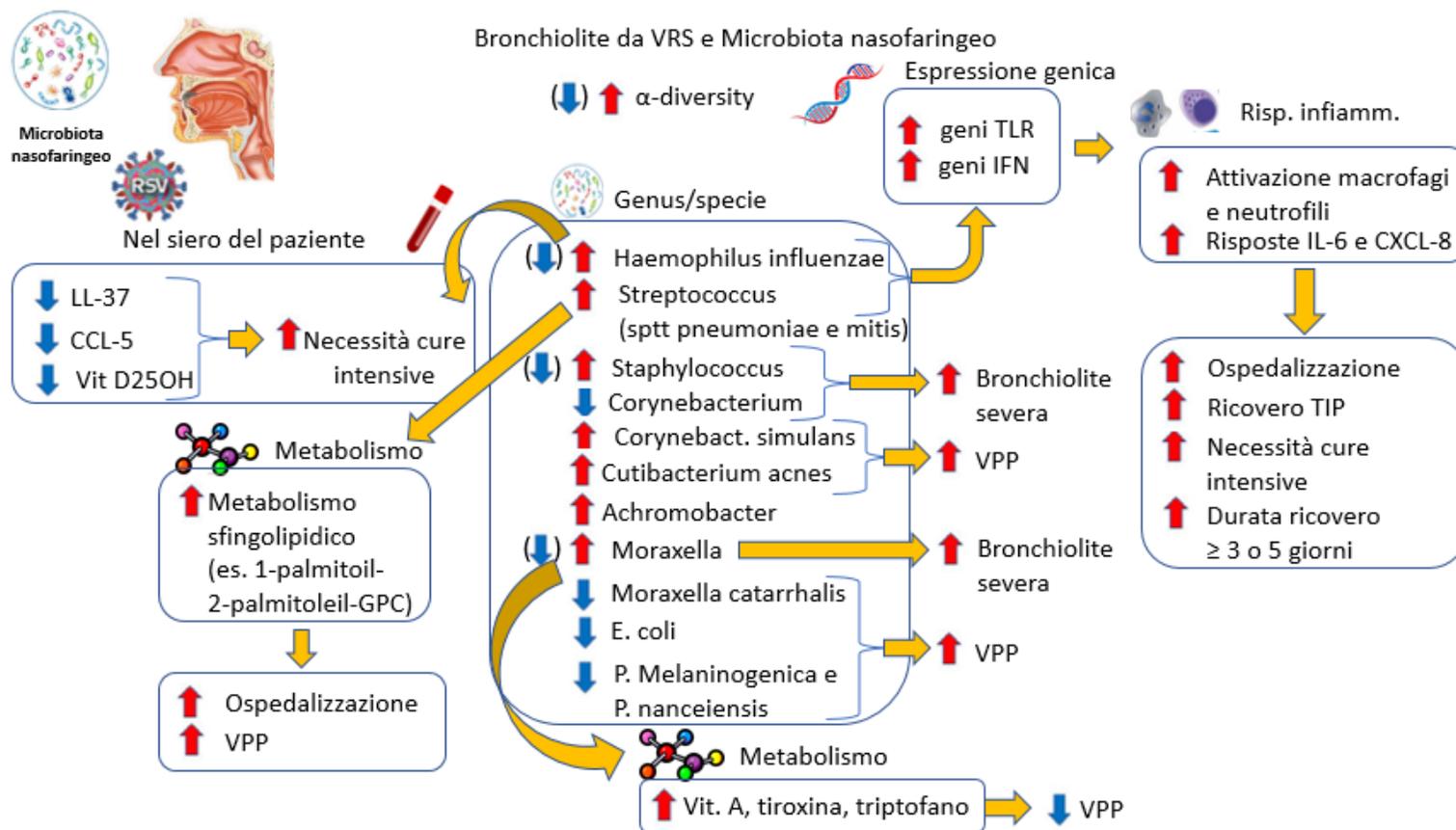


Figura 1: riassunto delle alterazioni nella composizione del microbiota nasofaringeo in corso di evento bronchiolite da VRS e correlazioni con espressione genetica, metabolismo, risposta infiammatoria, outcome clinici.

Adattata da:

- Rossi GA, Colin AA. Infantile respiratory syncytial virus and human rhinovirus infections: respective role in inception and persistence of wheezing. Eur Respir J. 2015 Mar;45(3):774-89. doi: 10.1183/09031936.00062714. Epub 2014 Oct 30. PMID: 25359340.
- Rossi GA, Ballarini S, Silvestri M, Sacco O, Colin AA. Respiratory syncytial virus and airway microbiota - A complex interplay and its reflection on morbidity. Pediatr Allergy Immunol. 2021 Aug;32(6):1141-1151. doi: 10.1111/pai.13524. Epub 2021 May 7. PMID: 33896042.

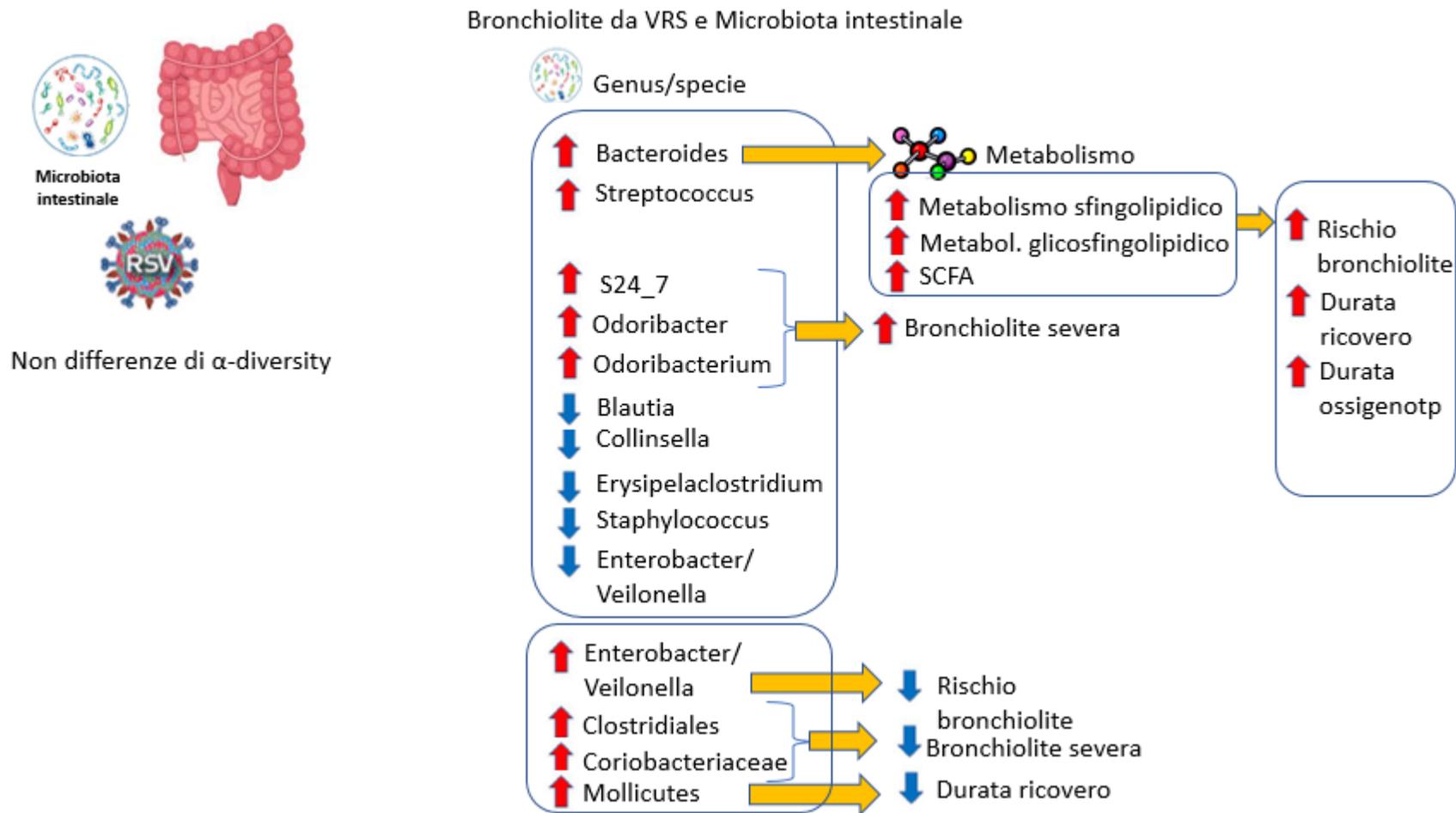


Figura 2: riassunto delle alterazioni nella composizione del microbiota intestinale in corso di evento bronchiolite da VRS e correlazioni con espressione genetica, metabolismo, risposta infiammatoria, outcome clinici.

Adattata da:

- Rossi GA, Colin AA. Infantile respiratory syncytial virus and human rhinovirus infections: respective role in inception and persistence of wheezing. *Eur Respir J.* 2015 Mar;45(3):774-89. doi: 10.1183/09031936.00062714. Epub 2014 Oct 30. PMID: 25359340.
- Rossi GA, Ballarini S, Silvestri M, Sacco O, Colin AA. Respiratory syncytial virus and airway microbiota - A complex interplay and its reflection on morbidity. *Pediatr Allergy Immunol.* 2021 Aug;32(6):1141-1151. doi: 10.1111/pai.13524. Epub 2021 May 7. PMID: 33896042.

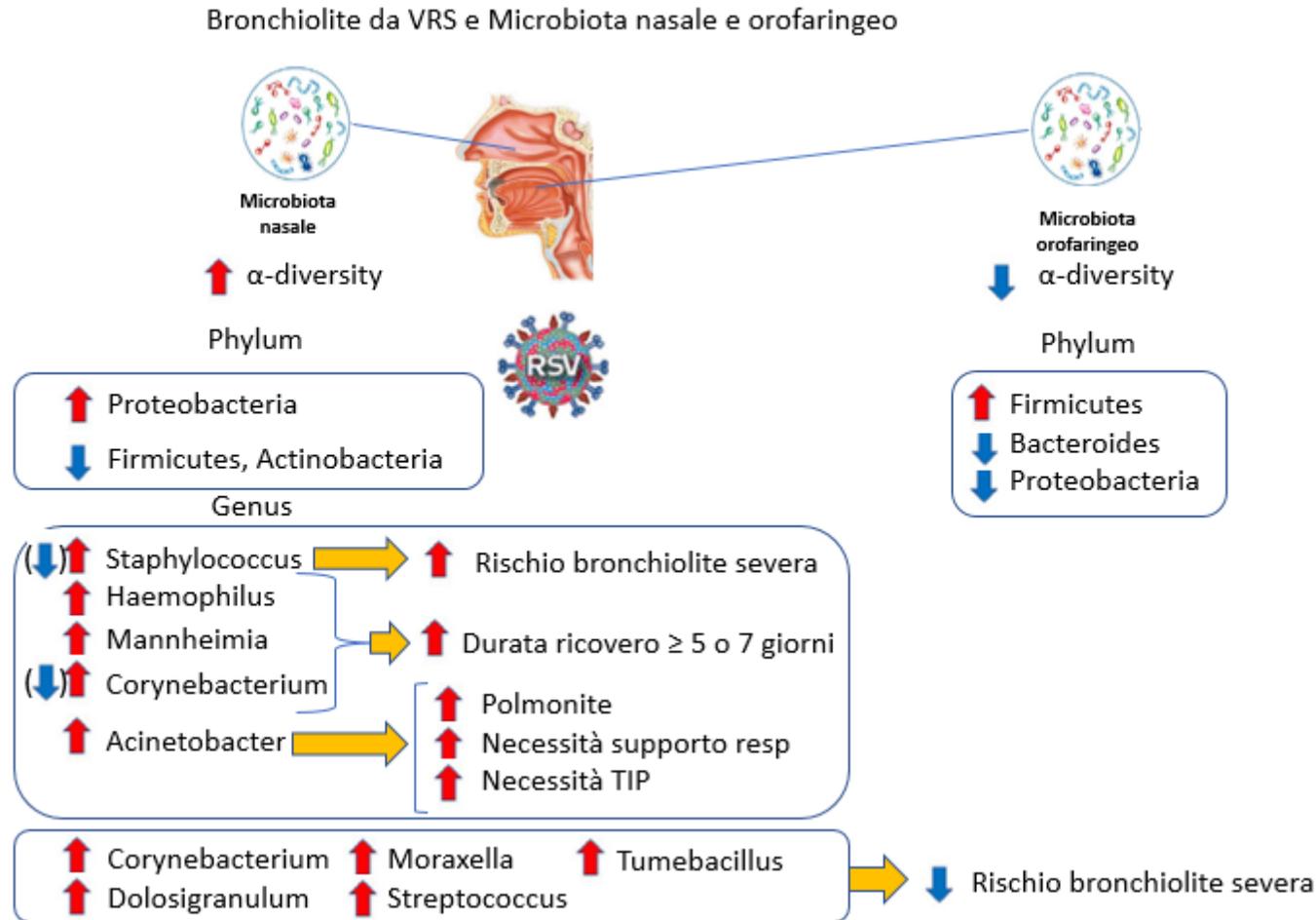


Figura 3: riassunto delle alterazioni nella composizione del microbiota nasale e orofaringeo in corso di evento bronchiolite da VRS e correlazioni con espressione genetica, metabolismo, risposta infiammatoria, outcome clinici.

Adattata da:

- Rossi GA, Colin AA. Infantile respiratory syncytial virus and human rhinovirus infections: respective role in inception and persistence of wheezing. *Eur Respir J.* 2015 Mar;45(3):774-89. doi: 10.1183/09031936.00062714. Epub 2014 Oct 30. PMID: 25359340.
- Rossi GA, Ballarini S, Silvestri M, Sacco O, Colin AA. Respiratory syncytial virus and airway microbiota - A complex interplay and its reflection on morbidity. *Pediatr Allergy Immunol.* 2021 Aug;32(6):1141-1151. doi: 10.1111/pai.13524. Epub 2021 May 7. PMID: 33896042.

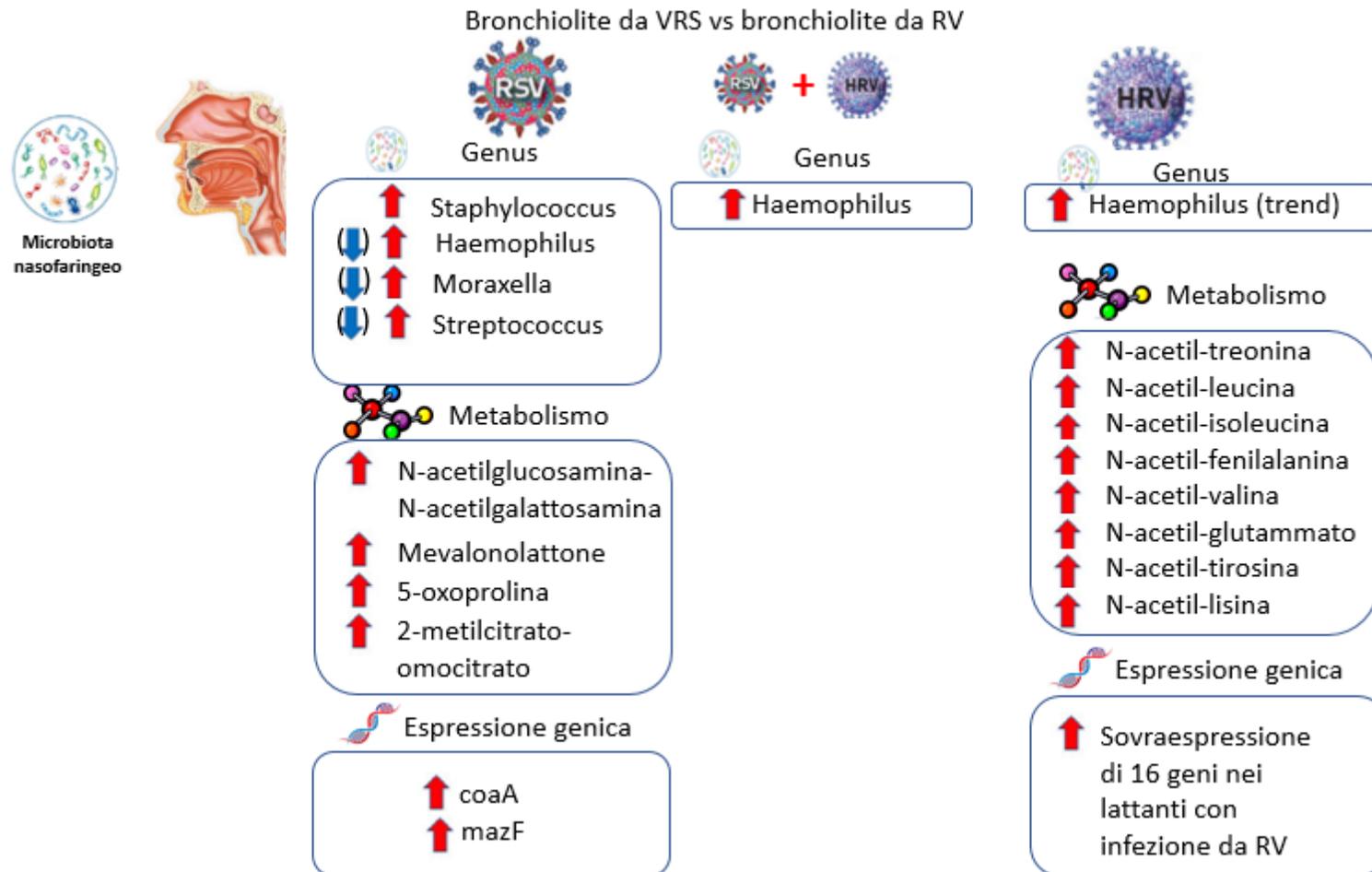


Figura 4: riassunto delle alterazioni nella composizione del microbiota nasofaringeo in corso di evento bronchiolite da VRS e da RV e correlazioni con espressione genetica, metabolismo, risposta infiammatoria, outcome clinici.

Adattata da:

- Rossi GA, Colin AA. Infantile respiratory syncytial virus and human rhinovirus infections: respective role in inception and persistence of wheezing. *Eur Respir J.* 2015 Mar;45(3):774-89. doi: 10.1183/09031936.00062714. Epub 2014 Oct 30. PMID: 25359340.
- Rossi GA, Ballarini S, Silvestri M, Sacco O, Colin AA. Respiratory syncytial virus and airway microbiota - A complex interplay and its reflection on morbidity. *Pediatr Allergy Immunol.* 2021 Aug;32(6):1141-1151. doi: 10.1111/pai.13524. Epub 2021 May 7. PMID: 33896042.

1.3.2 Microbiota e wheezing ricorrente in età pre-scolare/asma in età scolare

Negli ultimi anni l'attenzione della letteratura si è focalizzata anche su outcome a lungo termine rispetto all'evento bronchiolite, cercando di comprendere se l'aumentato rischio ad insorgenza di wheezing in età prescolare o asma dopo i 4-6 anni di vita possa trovare giustificazioni nella complessa interazione tra microbiota, la cui composizione è modificata e influenzata dall'evento bronchiolite e risposta infiammatoria ed immunitaria dell'ospite. Di seguito i riportano i lavori focalizzati su microbiota e sviluppo di wheezing in età prescolare o asma dopo i 4-6 anni di vita a seguito di evento bronchiolite/infezione delle vie aeree, con particolare attenzione all'infezione da VRS.

Il primo lavoro in merito a questo argomento risale al 2016, ma affonda le radici in un precedente lavoro che pubblica le evidenze di uno studio legato ad un proof-of-concept trial randomizzato in doppio cieco placebo-controlled che dimostra la significativa riduzione di rischio di wheezing ricorrente in bambini di età inferiore ai 18 mesi ospedalizzati per bronchiolite da VRS e sottoposti a trattamento con Azitromicina (AZT) in monosomministrazione quotidiana per 14 giorni (i primi 7 giorni al dosaggio di 10 mg/Kg/die, seguito poi dalla dose di 5 mg/Kg/die per altri 7 giorni). Gli Autori tornano sulla stessa coorte con l'intento di analizzare il microbiota nasofaringeo nel gruppo trattamento e nel gruppo placebo per comprendere se eventuali cambiamenti nella composizione e funzione del microbiota possano essere alla base di questa significativa riduzione di rischio di wheezing ricorrente nei pazienti esposti al trattamento con AZT. Vengono analizzati quindi 39 lattanti nati a termine e privi di comorbidità dell'originaria coorte, tutti di età < 7 mesi, 19 dei quali sottoposti al trattamento con AZT e 20 a placebo.

In primo luogo viene confrontato il microbiota alla randomizzazione dei gruppi (ovvero prima del trattamento AZT/placebo): all'analisi multivariata non emergono significative differenze in termini di composizione e abbondanza di genera batterici ($p > 0.05$) ed i genera *Streptococcus* e *Moraxella* risultano i più abbondanti in entrambi i gruppi. Differenze significative emergono invece al confronto degli stessi gruppi al termine del trattamento AZT/placebo ($p = 0.001$). In particolare, nel gruppo trattamento con AZT, l'abbondanza relativa di *Moraxella* appare significativamente ridotta dopo esposizione ad AZT (q-value = 0.03), mentre nel gruppo placebo l'abbondanza relativa di *Dolosigranulum* e *Corynebacterium* è significativamente aumentata (q-value = 0.03 per entrambi i genera), mentre l'abbondanza relativa di *Streptococcus* è significativamente ridotta al termine dell'esposizione a placebo (q-value = 0.01). A onor del vero, l'abbondanza relativa del genus *Moraxella* risulta significativamente differente tra i due gruppi AZT/placebo (gruppo AZT: mediana 0.05%, IQR 0%–7.6%; vs placebo: mediana 9.0%, IQR 0.1%–33.1%; q-value = 0.009).

All'analisi del microbiota in associazione all'outcome clinico di interesse di wheezing ricorrente (≥ 3 episodi) nell'arco dell'anno successivo all'evento bronchiolite, differenze significative emergono ancora una volta a carico del genus *Moraxella*, per il quale una ridotta abbondanza relativa al termine del trattamento appare associata significativamente a ridotto rischio di wheezing ricorrente (OR 0.86; IC 95% 0.75–0.99; $P = 0.03$) a prescindere dal tipo di trattamento (AZT/placebo). All'analisi di regressione corretta per i valori base dell'abbondanza di genere emerge che una riduzione dell'abbondanza relativa di *Moraxella* nei 14 giorni di trattamento correla significativamente con riduzione del rischio di wheezing ricorrente (OR 0.87; IC 95% 0.74–0.98; $p = 0.04$).

Pur consapevoli di non poter escludere che le associazioni rilevate dallo studio possano essere in parte condizionate da effetti diversi da quelli antimicrobici (ad es. effetti anti-infiammatori) della terapia con AZT, gli Autori ribadiscono quanto si può evincere con sicurezza dallo studio: 2 settimane di trattamento con AZT in corso di bronchiolite da VRS apportano modifiche nella composizione del microbiota, principalmente consistenti in riduzione dell'abbondanza di *Moraxella*, e una riduzione di tale genus risulta associata a ridotto rischio di sviluppo di wheezing ricorrente nell'intero anno successivo alla bronchiolite.¹¹²

Un secondo RCT è in corso in questi anni con l'intenzione di arruolare 200 pazienti < 18 mesi (campione più consistente rispetto allo studio del 2016) ricoverati per bronchiolite da VRS, 100 dei quali sottoposti a trattamento con AZT e 100 a placebo, avente come outcome primario lo sviluppo di wheezing ricorrente (inteso come ≥ 3 episodi di wheezing) nei 4 anni di follow-up e come outcome secondario l'analisi dell'impatto dell'AZT sul microbiota nasofaringeo in associazione al successivo sviluppo o meno di wheezing ricorrente. Attualmente è stato pubblicato in letteratura soltanto il protocollo dello studio (Azithromycin to prevent wheezing following severe RSV bronchiolitis-II clinical trial, APW-RSV II).¹¹³

Nel 2018 il gruppo di Rosas-Salazar e Colleghi torna sull'argomento microbiota, forte dei precedenti risultati ottenuti, con riscontro di significative alterazioni della composizione del microbiota nasofaringeo in corso di infezione respiratoria acuta da VRS (aumento dei generi *Haemophilus*, *Moraxella* e *Streptococcus*, riduzione dei generi *Lactobacillus*, *Staphylococcus* e *Corynebacterium* rispetto a controlli sani). Il passo avanti consiste nel voler indagare queste alterazioni alla luce dell'eventuale correlazione con sviluppo di wheezing successivo o addirittura ricorrente (≥ 2 episodi di wheezing) all'episodio bronchiolite nel corso del follow-up fino ai 2 anni di vita. Della coorte dello studio INSPIRE precedentemente analizzata vengono selezionati 118 lattanti < 1 anno che sperimentano almeno 1 infezione da VRS a carico delle vie aeree. Di 113 lattanti sono disponibili i dati relativo al follow-up fino ai 2 anni di vita, e nel corso di questo tempo 46 vanno incontro ad 1 episodio di wheezing successivo alla bronchiolite, mentre 36 sviluppano wheezing ricorrente. Il microbiota nasofaringeo, analizzato da lavaggio nasale ottenuto all'arruolamento e sottoposto ad amplificazione della regione ipervariabile V4 di DNA batterico estratto, risulta generalmente composto in questa coorte da *Moraxella* (37.6%), *Streptococcus* (19.7%), *Haemophilus* (13.5%), *Corynebacterium* (10.0%) e *Dolosigranulum* (4.7%). Dal confronto tra la composizione generale del sottogruppo di lattanti che vanno incontro ad un episodio di wheezing rispetto a quelli che nei 2 anni di follow-up non sperimentano wheezing non emergono differenze significative ($p > 0.05$), ma il valore assoluto dei generi *Lactobacillus* e *Staphylococcus* appaiono significativamente ridotti nei lattanti con 1 episodio di wheezing successivo alla bronchiolite rispetto a quelli senza e tale differenza persiste in tutti i modelli corretti per differenti fattori confondenti sperimentanti (ad es. modello 2, corretto per variabili proprie del paziente quali età, genere, asma materno, esposizione ad antibiotico terapia, punteggio allo score di severità clinica della bronchiolite RSS con DESeq2 test base mean = 8.43; log2 fold change = -4.56; q-value = 3.22e-08 per il genus *Lactobacillus* e DESeq2 test base mean = 947.73; log2 fold change = -2.94; q-value = 6.75e-02 per il genus *Staphylococcus* rispettivamente). Al confronto dei valori medi \pm DS di questi due generi nei lattanti con 1 episodio di wheezing successivamente alla bronchiolite rispetto ai lattanti senza wheezing, si osserva una differenza significativa solo per il genus *Lactobacillus* (Mann-Whitney U-test $p = 0.04$), mentre *Staphylococcus* perde significatività. Le differenze permangono significative a carico del solo genus *Lactobacillus* anche al confronto tra lattanti con wheezing ricorrente rispetto a lattanti senza (DESeq2 test base mean = 2.81; log2 fold change = -3.58; q-value = 1.47e-03). Infine, all'analisi multivariata corretta per le variabili precedentemente riportate, il riscontro di *Lactobacillus* nel microbiota nasofaringeo si associa a riduzione del rischio di sviluppo di 1 episodio di wheezing successivo alla bronchiolite (OR 0.34; IC 95% 0.14-0.83; $p = 0.02$) e di wheezing ricorrente (OR 0.21; IC 95%: 0.07-0.65; $p = 0.006$).

I risultati di questo studio suggeriscono, secondo gli Autori, che il genus *Lactobacillus* avrebbe un ruolo protettivo nei confronti dello sviluppo di wheezing, e corroborerebbero precedenti riscontri della letteratura in cui specie peculiari come *L. rhamnosus*, somministrata a livello intranasale in corso di infezione da VRS, ne ridurrebbe il danno polmonare, o del generale riscontro che la riduzione delle varie specie di *Lactobacillus* nei nati da taglio cesareo (per mancato passaggio nel canale del parto) si associa ad aumentato rischio di wheezing. Gli Autori arrivano addirittura a suggerire che si potrebbe considerare l'assenza o presenza di *Lactobacillus* nel microbiota

nasofaringeo dei lattanti con infezione da bronchiolite come biomarker per lo sviluppo o meno di wheezing.¹¹⁴

Lo stesso anno (2018) viene pubblicato un altro lavoro, stavolta cinese, che risulta essere l'unico a concentrarsi sul microbiota intestinale in relazione allo sviluppo di wheezing, indagando in particolar modo i generi *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* nei lattanti con e senza wheezing. Questo studio caso-controllo arruola 90 soggetti (30 di età < 6 anni con asma, 30 di età < 1 anno con bronchiolite, 30 di età < 4 anni controlli sani). Di tutti i pazienti vengono ottenuti all'arruolamento un campione di feci, su cui viene effettuata l'analisi del microbiota intestinale, e un campione di sangue, da cui viene effettuato l'esame delle citochine infiammatorie sieriche.

Per prima cosa, gli Autori vanno a confrontare la presenza del genere *Bifidobacterium*, che risulta significativamente ridotta nei casi con asma o bronchiolite rispetto ai controlli sani ($p < 0.001$) e tra i casi di asma quando confrontati con i casi di bronchiolite ($p = 0.011$), mentre non si osserva alcuna differenza significativa per quanto riguarda l'abbondanza relativa del genere *Lactobacillus* al confronto tra i vari gruppi (per tutte le analisi $p > 0.05$).

Concentrandosi poi sulle citochine infiammatorie, gli Autori evidenziano livelli significativamente più elevati di citochine del tipo Th17 (IL-17A) e del tipo 2 (IL-4 e IL-5) nei casi con asma e bronchiolite confrontati con i controlli sani, ma anche nei casi di asma confrontati con i casi di bronchiolite ($p < 0.001$ e $p = 0.003$ per IL-17A, $p < 0.001$ e $p = 0.009$ per IL-4, $p < 0.001$ e $p = 0.047$ per IL-5 rispettivamente), nonché livelli significativamente ridotti di citochine di tipo Th1 (IFN- γ e TNF- α) nei casi con asma e bronchiolite confrontati con i controlli sani, ma anche nei casi di asma confrontati con i casi di bronchiolite ($p < 0.001$ e $p = 0.003$ per IFN- γ , $p < 0.001$ e $p = 0.009$ per TNF- α).

A questo punto viene valutata l'eventuale associazione tra i due generi batterici e le IgE sieriche totali: dall'analisi emerge che l'abbondanza relativa di *Bifidobacterium* correla negativamente con le IgE sieriche sia nei pazienti con asma, che in quelli con bronchiolite ($r = -0.431$, $p = 0.018$ e $r = -0.507$, $p = 0.004$ rispettivamente), mentre non vi sono correlazioni per quanto riguarda il genere *Lactobacillus* ($p > 0.05$). Anche per quanto riguarda generi batterici e citochine, correlazioni significative emergono solo per *Bifidobacterium*, negativamente associato a IL17A e IL-4 e positivamente associato a IFN- γ sia per quanto riguarda i casi di asma ($r = -0.608$, $p = 0.004$, $r = -0.588$, $p = 0.006$, $r = 0.622$, $p = 0.002$ rispettivamente), sia per quanto riguarda i casi di bronchiolite ($r = -0.488$, $p = 0.006$, $r = -0.499$, $p = 0.013$, $r = 0.399$, $p = 0.028$ rispettivamente). Ancora una volta, non emerge alcuna correlazione significativa analizzando il genere *Lactobacillus*.

I risultati dello studio confermano quindi lo sbilanciamento verso un sistema immune di tipo Th2 alla base di asma e wheezing e vedono la riduzione di *Bifidobacterium* fortemente correlata a questo tipo di risposta immune.¹¹⁵

È dell'anno successivo (2019) un altro studio cinese, stavolta osservazionale prospettico, condotto su una coorte di 74 lattanti < 6 mesi ospedalizzati per bronchiolite severa, con analisi su escreato del microbiota nasofaringeo, dei livelli di lipopolisaccaride (LPS) e delle citochine infiammatorie. I pazienti vengono seguiti per 3 anni e la coorte suddivisa in 2 gruppi a seconda che i soggetti sviluppino wheezing ricorrente (≥ 3 episodi di wheezing entro il 3° anno, 26 pazienti) o meno (i rimanenti 48 pazienti).

All'analisi della composizione del microbiota nasofaringeo tra i due gruppi emergono, relativamente all' α -diversity, una ricchezza ed una diversità di specie batteriche significativamente maggiori nei lattanti con bronchiolite e successivo sviluppo di wheezing ricorrente, rispetto a quelli che non lo sviluppano ($p = 0.023$, con calcolo mediante Chao1 $p = 0.040$, tuttavia va segnalato Shannon index non significativo, $p = 0.311$). Questo risultato va a corroborare, secondo gli Autori, quanto già noto in letteratura, ovvero che un'elevata diversità di specie nel microbiota nasofaringeo (al contrario che per il microbiota intestinale, per cui vale il discorso opposto) si associa ad elevato rischio di patologie infiammatorie respiratorie quali ad esempio l'asma.

All'analisi dei generi batterici, inoltre, emerge un'abbondanza relativa significativamente maggiore per il genere *Moraxella* nei lattanti che sviluppano wheezing ricorrente nei 3 anni di follow-up rispetto a quelli che non lo sviluppano ($p = 0.026$). Questo dato andrebbe ad aggiungersi ai risultati dello studio di Zhou e Colleghi, in cui la riduzione dell'abbondanza di *Moraxella*, associata all'esposizione a trattamento con Azitromicina in corso di bronchiolite da VRS, correla con ridotto rischio di sviluppo di wheezing ricorrente nell'intero anno successivo alla bronchiolite.

Gli Autori passano poi ad analizzare le concentrazioni di LPS e citochine infiammatorie, rilevando livelli significativamente maggiori di LPS nei lattanti che sviluppano wheezing ricorrente rispetto a quelli che non lo sviluppano ($p = 0.003$), nonché livelli significativamente aumentati di CXCL8, CCL5, IL-6 e IL-13 nel primo gruppo rispetto al secondo ($p = 0.004$, $p = 0.029$, $p = 0.004$ e $p < 0.001$ rispettivamente). Significativamente aumentato è anche il rapporto risposta Th2/risposta Th1 (espresso dal rapporto IL-13/IFN- γ) nei lattanti con wheezing ricorrente al follow-up rispetto a quelli senza ($p < 0.001$), mentre non si osservano differenze statisticamente significative a carico dei livelli di citochine CXCL10, IFN- γ , IL-10, IL-12p40, IL-17A e IL-33. Anche in questo lavoro quindi emerge una forte correlazione tra uno sbilanciamento della risposta immune a favore di quella di tipo Th2 e l'insorgenza di wheezing.

All'analisi integrata tra composizione del microbiota nasofaringeo e concentrazioni di LPS e citochine infiammatorie, gli Autori osservano infine che l'abbondanza relativa del genere *Haemophilus* è positivamente associata a elevati livelli di CXCL8 ($r = 0.246$, $p = 0.037$), così come l'abbondanza relativa del genere *Moraxella* lo è ai livelli delle citochine IL-6 e IL-10 ($r = 0.236$, $p = 0.046$ e $r = 0.266$, $p = 0.024$ rispettivamente).

Sebbene in conclusione gli Autori debbano specificare che, avendo condotto le analisi su escreato, potrebbero aver ottenuto composizioni differenti da quanto avrebbero osservato se avessero ottenuto dai pazienti campioni di aspirato faringonasale, le correlazioni trovate li spingono a supporre che la correlazione già nota in letteratura tra bronchiolite e successivo sviluppo di wheezing poggi le sue fondamenta sulla prevalenza di generi come *Haemophilus* e *Moraxella* a seguito dell'evento bronchiolite, con conseguente enhancement di uno sbilanciamento della risposta immune Th2 prevalente, alla base dello sviluppo poi del wheezing.¹¹⁶

In merito all'analisi di associazioni tra microbiota nasofaringeo e sviluppo di wheezing ricorrente dopo evento bronchiolite sono pubblicati in letteratura anche 5 lavori che estrapolano dati dalla già nota coorte dello studio multicentrico MARC-35.

Il primo di questi lavori arruola 921 dei 1005 lattanti < 1 anno ricoverati per bronchiolite (755 con riscontro di infezione da VRS, 184 con RV) di cui si dispone del follow-up fino ai 3 anni di vita, e stratifica i pazienti per gruppi di severità clinica, sulla base di dati anamnestici e clinici, arrivando ad individuare 3 profili: il profilo A (136 pazienti, accomunati da anamnesi personale di eczema e difficoltà respiratoria, gruppo composto prevalentemente da bronchiolite non da VRS, principalmente da RV), il profilo B (452 pazienti che per caratteristiche anamnestiche e cliniche cadono sotto l'ombrello della "bronchiolite classica da VRS") ed infine il profilo C (333 pazienti, il gruppo con patologia bronchiolite maggiormente severa). Di questi pazienti viene effettuata l'analisi del microbiota nasofaringeo da aspirato ottenuto all'arruolamento e vengono identificati i già noti profili di generi batterici dominanti (*Haemophilus*, *Moraxella*, *Streptococcus*, profilo misto). Da campione di sangue ottenuto sempre all'arruolamento viene inoltre condotta l'analisi quantitativa delle IgE sieriche totali (con dicotomizzazione della coorte sulla base del cut-off di 100 kU/L) e allergene-specifiche, della conta eosinofila (cut-off 300 cellule/ μ L) e dei livelli di vitamina D-25(OH) e LL-37 (cut-off rispettivamente di 30 ng/mL e 46 ng/mL). Come outcome clinico primario viene scelta l'insorgenza di wheezing ricorrente entro il 3° anno di vita (inteso come ≥ 2 episodi di difficoltà respiratoria con necessità di terapia inalatoria corticosteroidica in 6 mesi o ≥ 2 episodi di difficoltà respiratoria in 1 anno, di durata ≥ 1 giorno e che disturbano il sonno).

La prevalenza di questi eventi nei 3 profili è così distribuita: 43% dei pazienti nel profilo A, 21% nel profilo B, 29% nel profilo C.

All'analisi di associazioni tra i profili di severità e l'outcome clinico del wheezing ricorrente entro il 3° anno di vita, utilizzando il profilo B (con prevalenza minore di tale outcome) come riferimento, emerge per entrambi i profili A e C un rischio significativamente aumentato di sviluppo di wheezing ricorrente (hazard ratio–HR 2.64; IC 95% 1.90–3.68; $p < 0.001$ per il profilo A; HR 1.51; IC 95% 1.14–2.01; $p = 0.004$ per il profilo C).

Gli Autori passano poi ad analizzare eventuali associazioni tra i profili e la composizione del microbiota ed i valori dei biomarker per cercare spiegazioni in merito al rischio di wheezing ricorrente osservato.

All'analisi dell'associazione tra profili di severità della bronchiolite e composizione peculiare del microbiota nasofaringeo emerge che il profilo A e C risultano avere prevalenza significativamente maggiore di genus *Haemophilus*-dominante quando confrontati con il profilo B ($p = 0.004$ e $p = 0.001$ rispettivamente) e che il profilo A risulta essere quello più di tutti associato a significativa prevalenza di genus *Moraxella*-dominante, con differenza statisticamente significativa al confronto con il profilo C, quello in cui la prevalenza di genus *Moraxella* è minima (OR 1.93; IC 95% 1.08–3.45; $p = 0.03$). Questi dati sembrano corroborare i risultati di precedenti lavori basati sempre sulla coorte MARC-35, che vedono il genus *Haemophilus* associato a severità clinica in corso di bronchiolite ed il genus *Moraxella* associato invece all'insorgenza di wheezing.

All'analisi delle eventuali associazioni tra profili di severità della bronchiolite e biomarkers non emergono sostanziali differenze tra i vari gruppi a carico di IgE totali, né allergene-specifiche, né tantomeno per quanto riguarda i livelli di vitamina D-25(OH), mentre i livelli di conta eosinofila e di LL-37 appaiono significativamente aumentati al confronto tra profilo A e profilo B, quest'ultimo utilizzato come riferimento poiché quello con valori inferiori di prevalenza all'interno del gruppo dei parametri analizzati (OR 3.75; IC 95% 2.03–6.93; $p < 0.05$ per quanto riguarda la conta eosinofila e OR 1.84, IC 95% 1.23–2.75; $p < 0.05$ in relazione a LL-37). La presenza di maggiore frequenza di eosinofilia nel profilo A, che è quello con maggiore prevalenza di wheezing ricorrente entro il 3° anno di vita, trova riscontro in letteratura, ma gli Autori sono costretti ad ammettere una mancata significatività a carico delle IgE totali ed allergene-specifiche, anch'esse ritenute in letteratura alla base del wheezing/asma, ipotizzando correlazioni indipendenti tra i due fattori e/o finestre temporali differenti in cui si verifica l'associazione. Gli Autori ipotizzano inoltre che la significativa differenza dei livelli di LL-37 (ma non di vitamina D-25(OH), alla base della produzione di LL-37) possa riflettere un'attivazione di risposta immune specifica nel profilo A e differente dagli altri profili, ma non entrano nei dettagli in merito.¹¹⁷

L'anno successivo (2020) il gruppo di lavoro torna sull'argomento pubblicando una nuova analisi della coorte MARC-35 e focalizzando stavolta l'attenzione su modifiche evolutive del microbiota ed insorgenza di wheezing al follow-up. Per fare ciò, gli Autori selezionano un sottogruppo di 842 lattanti < 6 mesi di cui dispongono non soltanto del tampone nasale all'arruolamento, bensì collezionato anche in specifici timepoint successivi, ovvero a distanza di 3 settimane dall'ospedalizzazione (“tampone di clearance”), nonché, in benessere, un tampone nasale effettuato durante l'estate (tampone estivo) ed un ultimo a distanza di 1 anno dal ricovero (“tampone di stagione epidemica”). Gli 842 lattanti vengono sottoposti a follow-up prolungato (almeno 4 anni) e 265 di questi sviluppano nel corso del follow-up wheezing ricorrente (inteso come ≥ 2 episodi di difficoltà respiratoria con necessità di terapia inalatoria corticosteroidica in 6 mesi o ≥ 2 episodi di difficoltà respiratoria in 1 anno, di durata ≥ 1 giorno e che disturbano il sonno).

All'analisi quantitativa del microbiota nel corso dei vari timepoint emerge una ridotta α -diversity al “tampone di clearance”, che invece torna ad avere valori massimi al “tampone di stagione epidemica” collezionato ad 1 anno dal ricovero per bronchiolite. Gli Autori focalizzano poi l'attenzione sui 3 generi batterici già noti nei loro studi: *Haemophilus*, *Moraxella* e *Streptococcus*. Se per il primo non emergono differenze significative ai vari tamponi di controllo, né tantomeno in

associazione all'outcome primario di insorgenza di wheezing ricorrente (a conferma che questo genus si associa a peggior decorso clinico durante l'evento bronchiolite, ma non sembra influenzare outcome a lungo termine come lo sviluppo di wheezing), ben diversi sono i risultati in merito agli altri due genera.

Per quanto riguarda il genus *Moraxella*, appare evidente un incremento significativo del rischio di wheezing ricorrente entro il 3° anno di vita nei pazienti che presentano valori di abbondanza relativa sopra la media al "tampone di clearance" in confronto a quelli che invece hanno valori sotto alla media ($p = 0.04$). Tale associazione persiste anche all'analisi dei modelli corretti per 16 fattori confondenti (es. anamnesi familiare positiva per asma materno, anamnesi personale positiva per eczema ed atopia, IgE totali, patogeno virale alla base della bronchiolite, necessità di cure intensive), con riscontro di HR pari a 1.38, HDI 95% 1.11–1.85. Inoltre dall'analisi risulta che ad ogni incremento del 10% di abbondanza relativa di *Moraxella* al "tampone di clearance" corrisponde un incremento pari al 38% di rischio di insorgenza di wheezing ricorrente entro il 3° anno.

Risultati analoghi si osservano anche per quanto riguarda il genus *Streptococcus*, per il quale si assiste ad un incremento significativo del rischio di wheezing ricorrente entro il 3° anno di vita nei pazienti che presentano valori di abbondanza relativa sopra la media al "tampone di clearance", ma anche al "tampone estivo" in confronto a quelli che invece hanno valori sotto alla media ($p = 0.01$ e $p = 0.03$ rispettivamente). Tale associazione persiste anche all'analisi dei modelli corretti per 16 fattori confondenti per entrambi i tamponi esposti sopra (HR 1.76; HDI 95% 1.13–3.19 per il "tampone di clearance" e HR 1.76; HDI 95% 1.15–3.27 per il "tampone estivo").

Anche all'analisi di sensibilità vengono confermate queste associazioni e risulta un incrementato rischio di insorgenza di wheezing ricorrente entro il 3° anno per *Moraxella* e *Streptococcus* al "tampone di clearance" (per entrambi $p = 0.01$) e per *Streptococcus* al "tampone estivo" ($p < 0.01$). Gli Autori infine "allargano" l'analisi al 4° anno, volendo verificare se i risultati osservati per l'outcome wheezing ricorrente persistano anche alla presenza di asma al 4° anno di vita. Dai modelli risulta ancora una volta che un'aumentata abbondanza relativa di *Moraxella* e *Streptococcus* al "tampone di clearance" si associa ad aumentato rischio di wheezing in aggiunta ad asma al 4° anno (HR 1.75; HDI 95% 1.13–3.18 e HR 2.84; HDI 95% 1.07–9.03 rispettivamente). L'incremento di tale rischio è presente anche per aumentata abbondanza relativa di *Streptococcus* al "tampone estivo" (HR 2.51; HDI 95% 0.96–8.43).

Tutti questi risultati confermano che un microbiota caratterizzato da spiccata prevalenza di *Moraxella* e *Streptococcus* correla con sviluppo di wheezing, peraltro in maniera indipendente da altri fattori quali IgE totali e sensibilizzazione del paziente (tutti fattori confondenti coinvolti nella correzione dei modelli statistici).¹¹⁸

L'anno seguente (2021) lo stesso gruppo di lavoro pubblica i risultati delle analisi omiche integrate (microbioma, trascrittoma dell'ospite, metaboloma) focalizzate sull'outcome dello sviluppo di wheezing entro il 3° anno e asma entro il 5° anno di vita. Della nota coorte di 1005 pazienti, gli Autori identificano un sottogruppo di 221 lattanti < 6 mesi di cui possono ricostruire, mediante integrazione di dati clinici, microbiomici, trascrittomici e metabolomici 4 profili distinti, definiti come endotipo A (43 pazienti con bronchiolite con presentazione "classica" – giovane età, bassa prevalenza di problematiche respiratorie ed asma in anamnesi familiare e personale, elevata prevalenza di mono-infezione da VRS; microbioma con elevata abbondanza relativa di *Moraxella nonliquefaciens*, risposta infiammatoria locale caratterizzata da livelli intermedi di IFN- α e IFN- γ), endotipo B (63 pazienti con elevata familiarità per asma, e sensibilizzazione IgE all'anamnesi, frequente RV in co-infezione, microbioma con elevata abbondanza relativa di *S. pneumoniae* e *M. catarrhalis*, risposta infiammatoria locale con elevati livelli di IFN- α e IFN- γ), endotipo C (63 pazienti con clinica particolarmente severa della bronchiolite ed elevata necessità di terapia antibiotica e supporto ventilatorio a pressione positiva, microbiota con profilo misto, risposta infiammatoria locale con bassi livelli di IFN) ed infine un endotipo D (52 pazienti con rara

familiarità per asma ed anamnesi personale positiva per sensibilizzazione IgE, microbiota con elevata abbondanza relativa di *M. catarrhalis*, risposta infiammatoria immune con elevati livelli di IL-6). Dei 221 lattanti, 158 presentano mono-infezione da VRS (distribuiti nei 4 endotipi con 32, 44, 40 e 42 casi rispettivamente) e 29 presentano infezione da RV (rispettivamente 5, 13, 5 e 6 casi per endotipo). Gli Autori focalizzano le analisi omiche in virtù di 2 outcome: lo sviluppo di wheezing ricorrente entro il 3° anno di vita (evento che si verifica per 69 pazienti, rispettivamente 10, 22, 19 e 18 casi per endotipo) e lo sviluppo di asma a 5 anni di vita (in 51 casi, rispettivamente 4, 24, 12 e 11 casi per endotipo).

All'analisi dell'associazione tra endotipi e rischio di outcome, utilizzando l'endotipo A come riferimento in quanto gruppo in cui meno si verificano l'insorgenza di wheezing ricorrente e di asma, emerge che l'endotipo B (clinica^{atopica} microbiota^{S. pneumoniae/M. catarrhalis} risposta infiammatoria IFN-elevato) si associa a tasso di prevalenza significativamente elevato di wheezing ricorrente al 3° anno di vita che evolve poi in asma al 5° anno di vita (HR 5.50; IC 95% 1.22–24.8; $p = 0.03$) e a rischio significativamente elevato di asma al 5° anno di vita (OR 6.00; IC 95% 2.08–21.9; $p = 0.002$). Tali associazioni persistono anche all'analisi di sensibilità condotta su modelli che escludono i pazienti con infezione da RV, mantenendo solo la quota di mono-infezioni da VRS: pur riducendosi la potenza statistica, utilizzando ancora l'endotipo A come riferimento, l'endotipo B continua a risultare associata a elevato rischio di asma al 5° anno (OR 5.21; IC 95% 1.73–19.5; $p = 0.006$). L'associazione persiste inoltre quando gli Autori provano ripetere le analisi utilizzando un numero differente di endotipi, osservando peraltro l'elevata concordanza dei 4 originali attraverso i nuovi ideati.

A questo punto gli Autori concentrano le analisi microbiomiche, trascrittomiche e metabolomiche proprio sull'endotipo B per definirne le caratteristiche e le eventuali basi dell'associazione di questo profilo con gli outcome dello studio.

All'analisi del microbiota, continuando ad utilizzare l'endotipo A come riferimento, l'endotipo B risulta presentare una significativa maggiore abbondanza relativa di *S. pneumoniae* ed una significativamente ridotta abbondanza relativa di *M. nonliquefaciens* (per entrambi FDR < 0.1, $p < 0.05$). All'analisi del trascrittoma, emergono 29 gene differentemente espressi (tutti con FDR < 0.1) ed all'analisi metabolomica l'endotipo B risulta associato significativamente a 24 pathways, tra cui la sovra-espressione di IFN- α IFN- γ (FDR < 0.05). Dall'analisi integrata di trascrittoma e metaboloma emerge infine l'espressione significativamente differente di 155 pathways, tra cui l'aumentato segnale di PI3K-Akt-mTOR, a carico dell'endotipo B (FDR < 0.05). Tutti questi dati, suggeriscono gli Autori, apportano un contributo in merito al dibattuto ruolo del genus *Moraxella*, talora associato direttamente, talora inversamente, al rischio di wheezing: identificando due specie differenti, *M. catarrhalis* e *M. nonliquefaciens* (la prima abbondante e la seconda ridotta nell'endotipo B), gli Autori suggeriscono che solo la *catarrhalis* si associ ad aumentato rischio di wheezing ed asma. Gli Autori propongono infine i riscontri metabolici ed infiammatori ottenuti nello studio come meccanismo attraverso cui si estrinseca la predisposizione allo sviluppo degli outcome dello studio in relazione al microbiota predominante.¹¹⁹

Lo stesso gruppo propone infine un'ultima ri-analisi della coorte, focalizzata su 244 lattanti < 6 mesi, definendo questa volta 5 endotipi metatrascrittomici ottenuti dalla combinazione di dati virologici e microbiomici: il profilo A (67 pazienti con infezione da VRS e microbiota con batteri commensali), il profilo B (36 pazienti con infezione da VRS/RV-A e microbiota con *H. influenzae* predominante), il profilo C (59 lattanti con bronchiolite da VRS e microbiota con *S. pneumoniae* predominante), il profilo D (33 pazienti con bronchiolite da VRS e microbiota con *M. nonliquefaciens*), ed infine il profilo E (49 lattanti con bronchiolite da VRS/RV-C e microbiota con prevalenza di *M. catarrhalis*).

Utilizzando il profilo A come riferimento, all'analisi del metatrascrittoma il profilo B risulta significativamente differente in termini di sovra-regolazione della virulenza e del metabolismo del ferro – trasporto del gruppo eme (FDR < 0.05 per entrambi), mentre il profilo C risulta

caratterizzato da una sovra-regolazione del metabolismo lipidico e degli acidi grassi in generale – in particolare per quanto riguarda i metaboliti glicerolipidici e glicerofosfolipidici (FDR < 0.05), mentre il profilo D risulta caratterizzato da una sotto-regolazione degli stesi pathway metabolici (FDR < 0.05) ed il profilo E è caratterizzato da una sovra-regolazione del metabolismo della risposta allo stress (FDR < 0.05).

All'analisi del metaboloma, utilizzando sempre il profilo A come riferimento, il profilo B risulta caratterizzato da attivazioni significative a carico di 63 pathways – tra tutti vengono citati in particolar modo la sovra-regolazione dei linfociti Th17 e la sotto-regolazione di IFN-I (FDR < 0.05), mentre il profilo C risulta caratterizzato da attivazioni significative a carico di 45 pathways – es. la sovra-regolazione del pathway del recettore per i prodotti terminali della glicosilazione (FDR < 0.05).

All'analisi dell'associazione con l'outcome clinico dello sviluppo di asma a 5 anni di vita, infine, utilizzando sempre il profilo A come riferimento, i profili B e C risultano significativamente associati ad aumentato rischio di asma (OR 2.81; IC 95% 1.11–7.26; p=0.030 e OR 2.49; IC 95% 1.10–5.87; p = 0.031 rispettivamente), senza significatività per i rimanenti profili.

I risultati rimangono significativi anche nel momento in cui gli Autori replicano le analisi partendo da una stratificazione della coorte in profili differenti, confermando la bontà delle associazioni riscontrate.

I risultati di questo studio confermano quanto già noto in letteratura ed aggiungono associazioni tra microbiota, metatrascrittoma e trascrittoma che giustificano il legame tra determinate composizioni di microbiota e rischio di sviluppo di asma.¹²⁰

Con un ultimo lavoro pubblicato quest'anno, gli Autori tornano sulla coorte MARC-35 e presentano un'analisi di 244 lattanti < 6 mesi di cui effettuano analisi integrata di microbiota, metaboloma e trascrittoma dell'ospite in relazione in particolare all'outcome dello sviluppo di asma entro i 6 anni di vita. La coorte risulta costituita da 222 casi di infezione da VRS e 51 di infezione da RV. 62 pazienti hanno sviluppato poi asma al controllo ai 6 anni di vita. Gli Autori focalizzano le analisi del microbiota in particolare sulle 3 specie batteriche già osservate come significativamente associate ad outcome di interesse: *S. pneumoniae*, *H. influenzae* e *M. catarrhalis*. Proprio un'aumentata abbondanza relativa di *S. pneumoniae* risulta significativamente associata ad aumentato rischio di asma al 6° anno di vita (p = 0.01), associazione che rimane anche nell'analisi stratificata per patogeno virale, particolarmente osservandosi associazione tra *S. pneumoniae* ed aumentato rischio di asma nei lattanti con infezione non da RV (OR 1.67; IC 95% 1.25–2.35; p = 0.001).

All'analisi del metaboloma, ben 328 pathways funzionali microbici risultano differenzialmente espressi stratificando i pazienti per status “asma” (FDR < 0.05). Tra questi, i 10 maggiormente rappresentati consistono principalmente in pathways del metabolismo lipidico (es. metabolismo degli acidi grassi, in tutte le analisi FDR < 1×10^{-12}) e dei carboidrati (es. pathway della glicolisi, in tutte le analisi FDR < 1×10^{-16}). Andando a verificare in particolar modo le associazioni presenti tra i 3 genera di interesse e questi pathway, si osserva, ancora una volta, associazione significativa a carico di *S. pneumoniae* con i 10 pathways metabolici più rappresentati, compresi biosintesi degli acidi grassi e metabolismo della glicolisi (per entrambi FDR < 0.05).

All'analisi del trascrittoma dell'ospite emergono 12 pathways differenzialmente espressi sulla base della stratificazione dei pazienti per status “asma”, in primis la sotto-regolazione di IFN- α e IFN- γ e la sovra-regolazione della risposta estrogenica (per tutti FDR < 0.05). Proprio la sotto-regolazione di IFN- α e IFN- γ rappresenta base infiammatoria dell'insorgenza di asma, secondo quanto noto in letteratura.

Ancora una volta gli Autori vanno a verificare in particolar modo le associazioni presenti tra i 3 genera di interesse e questi pathway, evidenziando correlazioni tra i 3 genera ed alcuni trascritti dell'ospite (DAGLB, EVI2B e PAK1IP1, per tutti FDR < 0.05). L'analisi delle relazioni causali, infine, suggerisce che il genus *S. pneumoniae* abbia un effetto diretto sull'espressione genica

batterica del pathway degli acidi grassi e sull'espressione genica dell'ospite dei geni, sotto-regolati, CLEC2B e DAGLB, quest'ultimo alla base dello sviluppo di asma, sulla base di quanto noto in letteratura.¹²¹

Anche per quanto riguarda questo argomento i risultati finora presenti in letteratura appaiono variegati, talora contrastanti, in alcuni casi con integrazioni, modifiche, addirittura smentite a lavori precedenti in studi successivi.

I risultati degli studi appena esposti sono riassunti in Tabella 6. Segue poi figura riassuntiva (Figura 5).

Autore e anno, Paese, Periodo di arruolamento	Tipologia di studio, Popolazione campione dello studio, Materiale biologico collezionato ed analizzato Criteri di esclusione	Dimensioni del campione, Frequenze sottogruppi	Outcome analizzati	Risultati (valore p)
Zhou et al., 2016, ¹¹² USA, N.D.	<p>Proof-of-concept trial randomizzato, placebo-controllato in doppio cieco, Lattanti < 18 mesi precedentemente sani ricoverati per 1° bronchiolite da VRS, randomizzati a ricevere trattamento con sospensione orale di AZT 10 mg/Kg 1 volta/die per 7 giorni seguiti da 5 mg/Kg 1 volta/die per altri 7 giorni, o placebo, LN all'arruolamento e alla fine del trattamento (AZT o placebo) ed analisi del microbiota da amplificazione delle regioni V1-V3 del DNA batterico estratto</p> <p>Criteri di esclusione: Prematurità, comorbidità</p>	39 lattanti < 7 mesi, 19/39 trattamento con AZT, 20/39 trattamento con placebo	<p>Confronto della composizione del microbiota nasofaringeo tra i gruppi sottoposti a trattamento con AZT o placebo al momento della randomizzazione e al termine del trattamento,</p> <p>Associazione tra microbiota nasofaringeo al termine del trattamento e wheezing ricorrente (≥ 3 episodi) nell'anno successivo alla bronchiolite</p>	<p>All'analisi multivariata ANOVA alla randomizzazione, non differenze significative in termini di composizione del microbiota e abbondanza delle specie batteriche tra il gruppo sottoposto a trattamento con AZT e quello esposto a placebo, con Streptococcus e Moraxella come genera più abbondanti in entrambi i gruppi ($p > 0.05$).</p> <p>All'analisi al termine del trattamento, significative differenze in termini di composizione del microbiota e abbondanza delle specie batteriche tra il gruppo sottoposto a trattamento con AZT e quello esposto a placebo ($p = 0.001$).</p> <p>In particolare, nel gruppo esposto a AZT l'abbondanza relativa di Moraxella è significativamente ridotta prima e dopo il trattamento (q-value = 0.03), mentre nel Gruppo esposto a</p>

				<p>placebo l'abbondanza relativa di Dolosigranulum e Corynebacterium appare significativamente aumentata e l'abbondanza relativa di Streptococcus appare significativamente ridotta prima e dopo esposizione a placebo (q-value = 0.03, q-value = 0.03 e q-value = 0.01 rispettivamente). Inoltre, l'abbondanza relativa del genus Moraxella differisce significativamente Tra I due gruppi trattamento (mediana gruppo AZT 0.05% (0%–7.6%) vs mediana gruppo placebo 9.0% (0.1%–33.1%) q-value = 0.009).</p> <p>Al termine di entrambi i tipi di trattamento, a prescindere dal tipo di trattamento, l'abbondanza relativa di Moraxella appare significativamente ridotta e significativamente associata a ridotto OR per wheezing ricorrente (OR 0.86, p = 0.03).</p> <p>All'analisi del modello di regressione corretto per i valori baseline di</p>
--	--	--	--	---

				abbondanza relativa, la riduzione del genus Moraxella dopo i 14 giorni di trattamento con AZT appare significativamente associata al rischio di wheezing ricorrente (OR 0.87, p = 0.04)
Rosas-Salazar et al., 2018, ¹¹⁴ USA, 2012-2013	<p>Studio di coorte prospettico multicentrico (INSPIRE), Lattanti < 1 anno, precedentemente sani, nati a termine, non LBW, con ≥ 1 episodio di infezione da VRS durante la 1° stagione epidemica,</p> <p>LN all'arruolamento con analisi del microbiota da amplificazione della regione ipervariabile V4 del DNA batterico estratto</p>	<p>118 lattanti < 1 anno, 113/118 con follow-up di 2 anni completo, 46/113 sviluppo di wheezing successivo all'infezione, 36/113 con sviluppo di wheezing ricorrente (≥ 2 episodi)</p> <p>Composizione del microbiota nasofaringeo durante infezione da VRS:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Moraxella (37.6%), 2) Streptococcus (19.7%), 3) Haemophilus (13.5%), 4) Corynebacterium (10%), 5) Dolosigranulum (4.7%) 	Associazione tra microbiota nasofaringeo e sviluppo di wheezing successivo o ricorrente (≥ 2 episodi)	<p>Nessuna differenza significativa nella composizione generale del microbiota durante infezione da VRS tra i pazienti che sviluppano wheezing successivamente e quelli che non lo sviluppano (p > 0.05);</p> <p>tuttavia, all'analisi dei modelli corretti per potenziali fattori confondenti, la conta assoluta dei generi Lactobacillus e Staphylococcus risulta significativamente ridotta nei lattanti che sviluppano wheezing successivo rispetto a quelli che non lo sviluppano (es. q-value = 3.22e-08 e q-value = 6.75e-02 rispettivamente);</p> <p>infine, media ± DS dell'abbondanza relativa di Lactobacillus significativamente ridotta nei lattanti che sviluppano wheezing</p>

				<p>successivo rispetto a quelli che non lo sviluppano ($p = 0.04$), mentre non vi sono differenze significative per il genus <i>Staphylococcus</i>.</p> <p>Abbondanza relativa di <i>Lactobacillus</i> significativamente ridotta nei lattanti con wheezing ricorrente rispetto a quelli senza ($q\text{-value} = 1.47e-03$).</p> <p>All'analisi multivariate corretta per età, genere, asma materno, precoce esposizione a terapia antibiotica, il riscontro di <i>Lactobacillus</i> reduce il rischio di wheezing successivo (OR 0.34, $p = 0.02$) e di wheezing ricorrente (OR 0.21, $p = 0.006$)</p>
<p>Liwen et al., 2018,¹¹⁵ Cina Feb 2016 – Dic 2017</p>	<p>Studio caso-controllo, Bambini < 6 anni con bronchiolite o asma (casi) e controlli sani, Campione di feci (con analisi del microbiota da amplificazione del DNA batterico estratto) e campione di sangue (con analisi quantitativa di IgE totali e di citochine di tipo Th1/Th2/Th17) all'arruolamento</p> <p>Criteri di esclusione: Per tutti i soggetti: diarrea o patologia intestinale nelle 4 settimane precedenti la raccolta del campione fecale,</p>	<p>90 bambini, 30 lattanti < 1 anno con bronchiolite, 30 bambini < 6 anni con asma, 30 bambini < 4 anni controlli sani</p>	<p>Prevalenza dei genera fecali <i>Bifidobacterium</i> e <i>Lactobacillus</i> nei bambini con bronchiolite e asma (casi) confrontati con i controlli sani, Prevalenza delle citochine sieriche di tipo</p>	<p>Abbondanza relativa del genus <i>Bifidobacterium</i> significativamente ridotta nei bambini con bronchiolite e asma (casi) confrontati con i controlli sani ($p < 0.001$) e tra i casi di asma confrontati con i casi di bronchiolite ($p = 0.011$),</p>

	<p>Per i controlli sani: anamnesi personale positiva per wheezing o esposizione a fumo passivo o reazioni allergiche o assunzione di antibiotici o yogurt nelle 4 settimane precedenti al prelievo dei campioni, feci anomale all'esame feci</p>		<p>Th1/Th2/Th17 nei bambini con bronchiolite e asma (casi) confrontati con i controlli sani</p> <p>Associazione tra i genera fecali Bifidobacterium e Lactobacillus con IgE totali sieriche nei bambini con bronchiolite e asma (casi) confrontati con i controlli sani,</p> <p>Associazione tra i genera fecali Bifidobacterium e Lactobacillus con citochine sieriche di tipo Th1/Th2/Th17 nei bambini con bronchiolite e asma</p>	<p>mentre non ci sono differenze significative relativamente all'abbondanza del genus Lactobacillus tra i due gruppi (p > 0.05).</p> <p>Significativo aumento dei livelli di citochine tipo Th17 (IL-17A) e tipo Th2 (IL-4, IL-5) nei bambini con bronchiolite e asma (casi) confrontati con i controlli sani e nei casi di asma confrontati con i casi di bronchiolite (p < 0.001 e p = 0.003 per IL-17A, p < 0.001 e p = 0.009 per IL-4, p < 0.001 e p = 0.047 per IL-5 rispettivamente), significativa riduzione dei livelli di citochine tipo Th1 (IFN-γ e TNF-α) nei bambini con bronchiolite e asma (casi) confrontati con i controlli sani e nei casi di asma confrontati con i casi di bronchiolite (p < 0.001 e p = 0.003 per IFN-γ, p < 0.001 e p = 0.009 per TNF-α).</p>
--	--	--	--	---

				<p>Abbondanza di Bifidobacterium fecale negativamente correlata alle IgE sieriche totali nei casi di asma e di bronchiolite (r = -0.431, p = 0.018 e r = -0.507, p = 0.004 rispettivamente), nessuna correlazione significativa invece tra Lactobacillus e IgE sieriche totali (p > 0.05).</p> <p>Abbondanza di Bifidobacterium fecale negativamente correlata alle citochine di tipo Th17 (IL-17A) e di tipo Th2 (IL-4) e positivamente correlata alle citochine di tipo 1 (IFN-γ) nei casi di asma (r = -0.608, p = 0.004, r = -0.588, p = 0.006, r = 0.622, p = 0.002 rispettivamente) e nei casi di bronchiolite (r = -0.488, p = 0.006, r = -0.499, p = 0.013, r = 0.399, p = 0.028 rispettivamente).</p> <p>Nessuna correlazione significativa tra Lactobacillus e citochine di tipo Th1/Th2/Th17 (all p > 0.05)</p>
--	--	--	--	--

<p>Zhang et al., 2019,¹¹⁶ China Oct 2014 – Dec 2015</p>	<p>Studio osservazionale prospettico, Lattanti < 6 mesi con bronchiolite severa (= necessità di ossigenoterapia e ricovero ospedaliero) da infezione da VRS e con primo episodio di wheezing, escreato per analisi del microbiota (da amplificazione delle regioni V4-V5 del DNA batterico estratto), delle citochine (da immunoassay) e del LPS (ELISA) all'arruolamento</p> <p>Criteria di esclusione: Infezione respiratoria acuta da altro agente virale o batterico, storia di precedente wheezing, uso di farmaci anti-reflusso, prematurità (EG < 37 settimane) qualunque patologia cronica polmonare, cardiaca, renale o epatica</p>	<p>74 lattanti < 6 mesi, 26/74 con wheezing ricorrente (\geq 3 episodi) nei 3 anni di follow-up, 48/74 senza wheezing ricorrente</p> <p>4 phyla di microbiota nasofaringeo dominante: 1) Firmicutes (84.5%), 2) Proteobacteria (9.1%), 3) Bacteroidetes (2.5%), 4) Actinobacteria (1.9%),</p> <p>5 generi di microbiota nasofaringeo dominante: 1) Streptococcus (80.0%), 2) Haemophilus (3.6%), 3) Moraxella (1.8%), 4) Prevotellaceae (1.6%), 5) Clostridiales (1.0%)</p>	<p>Confronto della composizione del microbiota nasofaringeo tra lattanti con e senza sviluppo di wheezing ricorrente al follow-up,</p> <p>Confronto delle concentrazioni di LPS e citochine tra lattanti con e senza sviluppo di wheezing ricorrente al follow-up,</p> <p>Associazione tra composizione del microbiota nasofaringeo e concentrazioni di LPS e citochine tra lattanti con e senza sviluppo di wheezing ricorrente al follow-up</p>	<p>All'analisi dell'α-diversity, ricchezza e diversità di specie significativamente maggiori tra i lattanti che sviluppano wheezing ricorrente rispetto a quelli che non lo sviluppano ($p = 0.023$, con calcolatore Chao1 $p = 0.040$, Shannon index invece non statisticamente significativo, $p = 0.311$). Nessuna differenza statisticamente significativa tra i lattanti che hanno ricevuto antibiotico per > 3 giorni o \leq 3 giorni. All'analisi dei generi batterici, abbondanza relativa del genere Moraxella significativamente maggiore tra i lattanti che sviluppano wheezing ricorrente rispetto a quelli che non lo sviluppano ($p = 0.026$).</p> <p>All'analisi delle concentrazioni di LPS e citochine, livelli significativamente maggiori di LPS tra i lattanti che sviluppano wheezing</p>
--	--	---	---	--

				<p>ricorrente rispetto a quelli che non lo sviluppano ($p = 0.003$), inoltre, livelli significativamente maggiori di CXCL8, CCL5, IL-6, e IL-13 tra i lattanti che sviluppano wheezing ricorrente rispetto a quelli che non lo sviluppano ($p = 0.004$, $p = 0.029$, $p = 0.004$ e $p < 0.001$ rispettivamente), livelli significativamente maggiori del rapporto Th2/Th1 (espresso dal rapporto IL-13/IFN-γ) tra i lattanti che sviluppano wheezing ricorrente rispetto a quelli che non lo sviluppano ($p < 0.001$), mentre non ci sono differenze significative tra i livelli di CXCL10, IFN-γ, IL-10, IL-12p40, IL-17A, e IL-33.</p> <p>L'abbondanza relativa del genus Haemophilus è positivamente associata ai livelli di CXCL8 ($r = 0.246$, $p = 0.037$), l'abbondanza relativa del genus Moraxella è positivamente associata con i livelli di IL-6 IL-10</p>
--	--	--	--	---

				($r = 0.236$, $p = 0.046$, $r = 0.266$, $p = 0.024$ rispettivamente)
Dumas et al., 2019, ¹¹⁷ USA, 3 stagioni epidemiche consecutive (Nov-Apr 2011-2014)	<p>Studio di coorte prospettico multicentrico (MARC-35), Bambini < 2 anni ospedalizzati con diagnosi clinica secondo AAP di bronchiolite, AFN (con analisi del microbiota da amplificazione della regione ipervariabile V4 del DNA batterico estratto) e campioni di sangue (con conta eosinofila, quantificazione delle IgE sieriche totali e allergene- specifiche e dei livelli di vitamina D-25(OH) e di LL-37) all'arruolamento</p> <p>Criteria di esclusione: Arruolamento in precedenti versioni dello studio o > 24 ore dopo il ricovero, CC, pneumopatie, ID, prematùrità (EG < 32 settimane)</p>	<p>921 lattanti < 1 anno, 755/921 infezione da VRS, 184/921 infezione da RV, 136/921 profilo A (storia di problemi respiratori/eczema, infezione non VRS – quasi sempre RV), 452/921 profilo B (bronchiolite da VRS classica), 333/921 profilo C (gruppo con maggior severità clinica), 251/921 wheezing ricorrente entro i 3 anni (inteso come riscontro di ≥ 2 episodi di difficoltà respiratoria con uso di steroide inalatorio in 6 mesi o ≥ 4 episodi in 1 anno che durino ≥ 1 giorno e disturbino il sonno, distribuzione prevalenza di questo evento nei 3 profili: 43%, 21%, 29% rispettivamente)</p> <p>Dicotomizzazione della coorte per biomarkers: livelli di IgE totali (cut-off 100 ku/L), conta eosinofila (cut-off 300 cellule/μL), livelli di 25(OH)D (cut-off 30 ng/mL), livelli di LL-37 (valore medio 46 ng/mL)</p> <p>4 profili di microbiota nasofaringeo dominante: 1) Moraxella,</p>	<p>Associazione tra profili di severità della bronchiolite e wheezing ricorrente entro i 3 anni (inteso come riscontro di ≥ 2 episodi di difficoltà respiratoria con uso di steroide inalatorio in 6 mesi o ≥ 4 episodi in 1 anno che durino ≥ 1 giorno e disturbino il sonno),</p> <p>Associazione tra profili di severità della bronchiolite e microbiota nasofaringeo,</p> <p>Associazione tra profili di severità della bronchiolite e biomarkers</p>	<p>Utilizzando il profilo B come riferimento (minima prevalenza di wheezing ricorrente), rischio significativamente aumentato di sviluppo di wheezing ricorrente associato con profilo A e con profilo C (HR 2.64, $p < 0.001$ e HR 1.51, $p = 0.004$ rispettivamente).</p> <p>All'analisi del microbiota, il profilo A e il profilo C hanno piÙ spesso profilo Haemophilus-dominante rispetto al profilo B ($p = 0.004$ e $p = 0.001$ rispettivamente); inoltre, la prevalenza di profilo Moraxella-dominante e massima nel profilo A e minima nel profilo C quando confrontati tra loro (OR 1.93, $p = 0.03$).</p> <p>In generale, non differenze significative nei livelli dei vari biomarkers tra i profili B e C, né nei livelli di IgE sieriche totali e allergene- specifiche, né nei livelli di vitamina D-25(OH) tra</p>

		<p>2) Haemophilus, 3) Streptococcus, 4) profilo misto</p>		<p>tutti i profili, mentre sono significativamente maggiori la conta eosinofila ed i livelli di LL-37 nel profilo A confrontato con il profilo B (OR 3.75, $p < 0.05$ e OR 1.84, $p < 0.05$ rispettivamente).</p>
<p>Mansbach et al., 2020,¹¹⁸ 3 stagioni epidemiche consecutive (Nov-Apr 2011-2014)</p>	<p>Studio di coorte prospettico multicentrico (MARC-35), Bambini < 2 anni ospedalizzati con diagnosi clinica secondo AAP di bronchiolite, TN all'arruolamento (= TN index), 3 dopo l'ospedalizzazione (= TN clearance) e, una volta in benessere, durante l'estate (= TN estivo) e dopo 1 anno dall'ospedalizzazione (= TN stagione epidemica) con analisi del microbiota da amplificazione della regione ipervariabile V4 del DNA batterico estratto</p> <p>Criteri di esclusione: Arruolamento in precedenti versioni dello studio o > 24 ore dopo il ricovero, CC, pneumopatie, ID, prematurità (EG < 32 settimane)</p>	<p>842 lattanti < 6 mesi, 265/842 con wheezing ricorrente entro i 3 anni (inteso come riscontro di ≥ 2 episodi di difficoltà respiratoria con uso di steroide inalatorio in 6 mesi o ≥ 4 episodi in 1 anno che durino ≥ 1 giorno e disturbino il sonno), 577/842 senza wheezing ricorrente, 196/265 e 494/577 con infezione da VRS, 62/265 and 111/577 con infezione da RV</p>	<p>Associazione tra microbiota nasale e wheezing ricorrente entro i 3 anni (riscontro di ≥ 2 episodi di difficoltà respiratoria con uso di steroide inalatorio in 6 mesi o ≥ 4 episodi in 1 anno che durino ≥ 1 giorno e disturbino il sonno),</p> <p>Associazione tra microbiota nasale e wheezing ricorrente entro i 3 anni con successivo asma ai 4 anni</p>	<p>α-diversity minima al TN clearance e massima al TN stagione epidemica.</p> <p>Rischio di wheezing ricorrente ai 3 anni significativamente elevato nei lattanti con valori di abbondanza relativa del genus Moraxella sopra la media al tampone di clearance in confronto ai lattanti con valori di abbondanza relativa sotto la media ($p = 0.04$).</p> <p>Rischio di wheezing ricorrente ai 3 anni significativamente elevato nei lattanti con valori di abbondanza relativa del genus Streptococcus sopra la media al tampone di clearance o al tampone estivo in confronto ai lattanti con valori di abbondanza relativa sotto la media ($p = 0.01$ e $p = 0.03$ rispettivamente).</p>

				<p>All'analisi corretta per 16 fattori confondenti (es. storia di eczema, atopia, patogeno virale, necessità di cure intensive), l'abbondanza relativa del genus Moraxella significativamente maggiore al TN di clearance è associata con wheezing ricorrente ai 3 anni di vita (HR 1.38), inoltre, per ogni incremento del 10% dell'abbondanza relativa di Moraxella al TN di clearance si ha un incremento del 38% del rischio di wheezing ricorrente ai 3 anni; allo stesso modo l'abbondanza relativa del genus Streptococcus significativamente maggiore al TN di clearance e al Tn estivo è associata con wheezing ricorrente ai 3 anni di vita (HR 1.76 per entrambi) All'analisi di sensibilità si conferma l'aumentato rischio di wheezing ricorrente nei lattanti con elevati livelli di abbondanza relativa di Moraxella o Streptococcus al TN di clearance (p = 0.01 per entrambi)</p>
--	--	--	--	--

				<p>o elevati livelli di abbondanza relativa di Streptococcus al TN estivo (p < 0.01).</p> <p>All'analisi corretta per fattori confondenti, elevate abbondanze relative di Moraxella e Streptococcus al TN di clearance hanno un aumentato rischio di wheezing ricorrente e successivo asma ai 4 anni (HR 1.75 e HR 2.84 rispettivamente), l'aumentata abbondanza relativa di Streptococcus al tampone estivo si associa con significatività borderline ad aumento del rischio di wheezing ricorrente e asma ai 4 anni (HR 2.51).</p>
<p>Raita et al., 2021,¹¹⁹ USA 3 stagioni epidemiche consecutive (Nov-Apr 2011-2014)</p>	<p>Studio di coorte prospettico multicentrico (MARC-35), Bambini < 2 anni ospedalizzati con diagnosi clinica secondo AAP di bronchiolite, AFN all'arruolamento con analisi del microbiota e del metatrascrittoma, del trascrittoma dell'ospite, del metaboloma</p> <p>Criteria di esclusione: Arruolamento in precedenti versioni dello studio o > 24 ore dopo il ricovero, CC, pneumopatie, ID, prematurità (EG < 32 settimane)</p>	<p>221 lattanti < 1 anno, 43/221 endotipo A (clinica^{classica} microbiota^{M. nonliquefaciens} infiammazione^{IFN-intermedio}), 63/221 endotipo B (clinica^{atopica} microbiota^{S. pneumoniae/M. catarrhalis} infiammazione^{IFN-elevato}), 63/221 endotipo C (clinica^{severa} microbiota^{misto} infiammazione^{IFN-basso}), 52/221 endotipo D (clinica^{non-atopica}</p>	<p>Confronto tra gli endotipi e associazione con rischio di wheezing ricorrente entro i 3 anni e di asma entro i 5 anni,</p> <p>Analisi integrata di microbiota nasofaringeo, trascrittoma e metaboloma e</p>	<p>Utilizzando l'endotipo A come riferimento, rischio di wheezing ricorrente che esita in asma significativamente maggiore nell'endotipo B (HR 5.50; p = 0.03), nessuna differenza significativa nel rischio di wheezing ricorrente che non esita in asma; inoltre, rischio di sviluppo di asma a 5 anni</p>

		<p>microbiota^{M. catarrhalis} inflammation^{IL-6}), 158/221 mono-infezione VRS (32/43, 44/63, 40/63 e 42/52 rispettivamente), 29/221 infezione da RV (5/43, 13/63, 5/63 e 6/52 rispettivamente), 69/221 con wheezing ricorrente entro i 3 anni (10/43, 22/63, 19/63 e 18/52 rispettivamente), 51/221 con asma entro i 5 anni (4/43, 24/63, 12/63 e 11/52 rispettivamente)</p>	<p>confronto tra gli endotipi</p>	<p>significativamente maggiore nell'endotipo B (OR 6.00, p = 0.002), nessun rischio significativo per gli endotipi C o D.</p> <p>All'analisi di sensibilità, escludendo le co- infezioni da RV, utilizzando il profilo A come riferimento, rischio significativamente maggiore di sviluppo di asma a 5 anni nei lattanti con endotipo B (OR 5.21, p = 0.006), nessun rischio significativo di sviluppo di wheezing ricorrente. Le associazioni significative elencate persistono anche ripetendo le analisi utilizzando un numero diverso di endotipi con dimostrata consistenza dei 4 endotipi originari.</p> <p>All'analisi del microbiota, utilizzando l'endotipo A come riferimento, abbondanza relativa significativamente maggiore del genus <i>S. pneumoniae</i>, significativamente minore del genus</p>
--	--	--	--	---

				<p>M. nonliquefaciens nell'endotipo B (FDR < 0.1, p < 0.05 per entrambi).</p> <p>All'analisi del trascrittoma dell'ospite, utilizzando l'endotipo A come riferimento, 29 geni sono differentemente espressi nell'endotipo B (FDR < 0.1 con \geq1.5-fold change).</p> <p>All'analisi del metatrasrittoma, utilizzando l'endotipo A come riferimento, 24 pathways sono significativamente alterati nell'endotipo B (es. sovra-espressione di IFN-α e -γ pathways) (FDR < 0.05).</p> <p>All'analisi integrata di trascrittoma e metaboloma, utilizzando l'endotipo A come riferimento, 155 pathways dell'endotipo B sono significativamente alterati (es. incremento del segnale PI3K-Akt-mTOR) (FDR < 0.05).</p>
Raita et al., 2021, ¹²⁰ USA,	Studio di coorte prospettico multicentrico (MARC-35), Bambini < 2 anni ospedalizzati con diagnosi clinica secondo AAP di bronchiolite,	244 lattanti \leq 7 mesi, 67/244 profilo A (virus ^{VRS} microbiota ^{commensale}),	Confronto tra le caratteristiche del	All'analisi del metatrasrittoma,

<p>3 stagioni epidemiche consecutive (Nov-Apr 2011-2014)</p>	<p>AFN all'arruolamento con analisi del microbiota e del metatrascrittoma, del trascrittoma dell'ospite, del metaboloma</p> <p>Criteri di esclusione: Arruolamento in precedenti versioni dello studio o > 24 ore dopo il ricovero, CC, pneumopatie, ID, prematurità (EG < 32 settimane)</p>	<p>36/244 profilo B (virus^{VRS/RV-A} microbiota^{H.} influenzae), 59/244 profilo C (virus^{VRS} microbiota <i>S. pneumoniae</i>), 33/244 profilo D (virus^{VRS} microbiota ^{M.} nonliquefaciens), 49/244 profilo E (virus^{VRS/RV-C} microbiota ^{M.} catarrhalis) 159/244 mono-infezione VRS (42/67, 21/36, 48/59, 24/33 e 24/49 rispettivamente), 13/244 mono-infezione RV (4/67, 1/36, 0, 0 e 8/49 rispettivamente), 34/244 co-infezione VRS+RV (14/67, 7/36, 5/59, 4/33 e 4/49 rispettivamente), 62/244 con asma ai 5 anni (12/67, 14/36, 21/59, 3/33 e 12/49 rispettivamente)</p>	<p>metatrascrittoma tra i differenti profili,</p> <p>Confronto tra le caratteristiche del trascrittoma dell'ospite tra i differenti profili,</p> <p>Associazione tra Metatrascrittoma e rischio di sviluppo di asma ai 5 anni</p>	<p>utilizzando il profilo A come riferimento, significativa sovra-espressione nel profilo B della virulenza associata ad antibiotico-resistenza e del metabolismo del ferro legato al trasporto del gruppo eme (per entrambi FDR < 0.05), sovra-espressione del metabolismo degli acidi grassi, dei lipidi e degli isoprenoidi (es. glicerolipidi and glicerofosfolipidi) nel profilo C (FDR < 0.05), sotto-espressione dei glicerolipidi and glicerofosfolipidi, dei lipidi e degli isoprenoidi nel profilo D (FDR < 0.05), sovra-espressione del metabolismo della risposta allo stress nel profilo E (FDR < 0.05).</p> <p>All'analisi del trascrittoma dell'ospite, utilizzando il profilo A come riferimento, 63 pathways significativamente alterati (es. sovra-espressione linfociti Th17, sotto-</p>
--	--	--	---	---

				<p>regolazione pathway IFN-I) nel profilo B (FDR < 0.05), 45 pathways significativamente alterati (es. sovra-espressione del recettore dei prodotti terminale della glicosilazione) nel profilo C.</p> <p>All'analisi dell'associazione dei profili con l'outcome di sviluppo di asma a 5 anni, utilizzando il profilo A come riferimento, rischio significativamente maggiore nei lattanti con profilo B e profilo C (OR 2.81, p=0.030 e OR 2.49, p = 0.031 rispettivamente), nessun rischio significativamente maggiore di asma a 5 anni per gli altri profili</p>
<p>Zhu et al., 2022,¹²¹ 3 stagioni epidemiche consecutive (Nov-Apr 2011-2014)</p>	<p>Studio di coorte prospettico multicentrico (MARC-35), Bambini < 2 anni ospedalizzati con diagnosi clinica secondo AAP di bronchiolite, AFN all'arruolamento con analisi del microbiota e del metatrascrittoma e del trascrittoma dell'ospite</p> <p>Criteria di esclusione: Arruolamento in precedenti versioni dello studio o > 24 ore dopo il ricovero, CC, pneumopatie, ID, prematurità (EG < 32 settimane)</p>	<p>244 lattanti < 6 mesi, 222/244 infezione da VRS, 51/244 infezione da RV, 62/244 sviluppo di asma all'età di 6 anni</p>	<p>Associazione tra genera batterici del microbiota nasofaringeo e rischio di sviluppo di asma ai 6 anni d'età</p>	<p>Elevata abbondanza relativa di <i>S. pneumoniae</i> significativamente associata al rischio di sviluppo di asma entro i 6 anni di vita (p = 0.01). All'analisi stratificata per patogeno virale della bronchiolite, <i>S. pneumoniae</i> associato con rischio significativamente</p>

				<p>maggiore di sviluppo di asma nei lattanti con infezione non da RV (OR 1.67, p = 0.001).</p> <p>All'analisi del metaboloma, 328 pathway funzionali microbici risultano differentemente attivati sulla base dello status "asma" (FDR<0.05), I 10 più abbondanti dei quali consistono in pathways del metabolismo lipidico (es. acidi grassi) e dei carboidrati (es. glicolisi) (FDR < 1 x 10⁻¹² e FDR < 1 x 10⁻¹⁶ rispettivamente). Associazione significativa tra abbondanza relativa di S. pneumoniae e pathways della biosintesi degli acidi grassi e della glicolisi pathways (per entrambi FDR < 0.05).</p> <p>All'analisi del trascrittoma dell'ospite, 12 pathways risultano significativamente alterati (es. sotto-espressione di IFN-α and IFN-γ e sovra-espressione della risposta estrogenica) nei bambini</p>
--	--	--	--	--

				<p>che sviluppano asma entro i 6 anni di vita (FDR < 0.05).</p> <p>All'esame dell'associazione microbiota-ospite, All'analisi di relazione causale, S. pneumoniae risulta implicato nel pathway microbico degli acidi grassi e nell'espressione dei geni dell'ospite CLEC2B e DAGLB, che hanno conseguenze sullo sviluppo successivo di asma.</p>
--	--	--	--	--

Tabella 6: riassunto degli studi con risultati in merito a microbiota nasofaringeo e/o intestinale e wheezing/asma a seguito dell'evento infezione delle vie aeree/bronchiolite da VRS

Note: AAP = American Academy of Pediatrics, AFN = aspirato faringonasale, AZT = Azitromicina, CC = cardiopatia congenita, ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay, HR = hazard ratio, ID = immunodeficit, INSPIRE = Infant Susceptibility to Pulmonary Infections and Asthma Following RSV Infection in Infancy, LBW = low birth weight, LN = lavaggio nasale, LPS = lipopolisaccaride, MARC-35 = 35th Multicenter Airway Research Collaboration, ND = non disponibile, TN = tampone nasale, RV = Rhinovirus, VRS = Virus Respiratorio Sinciziale.

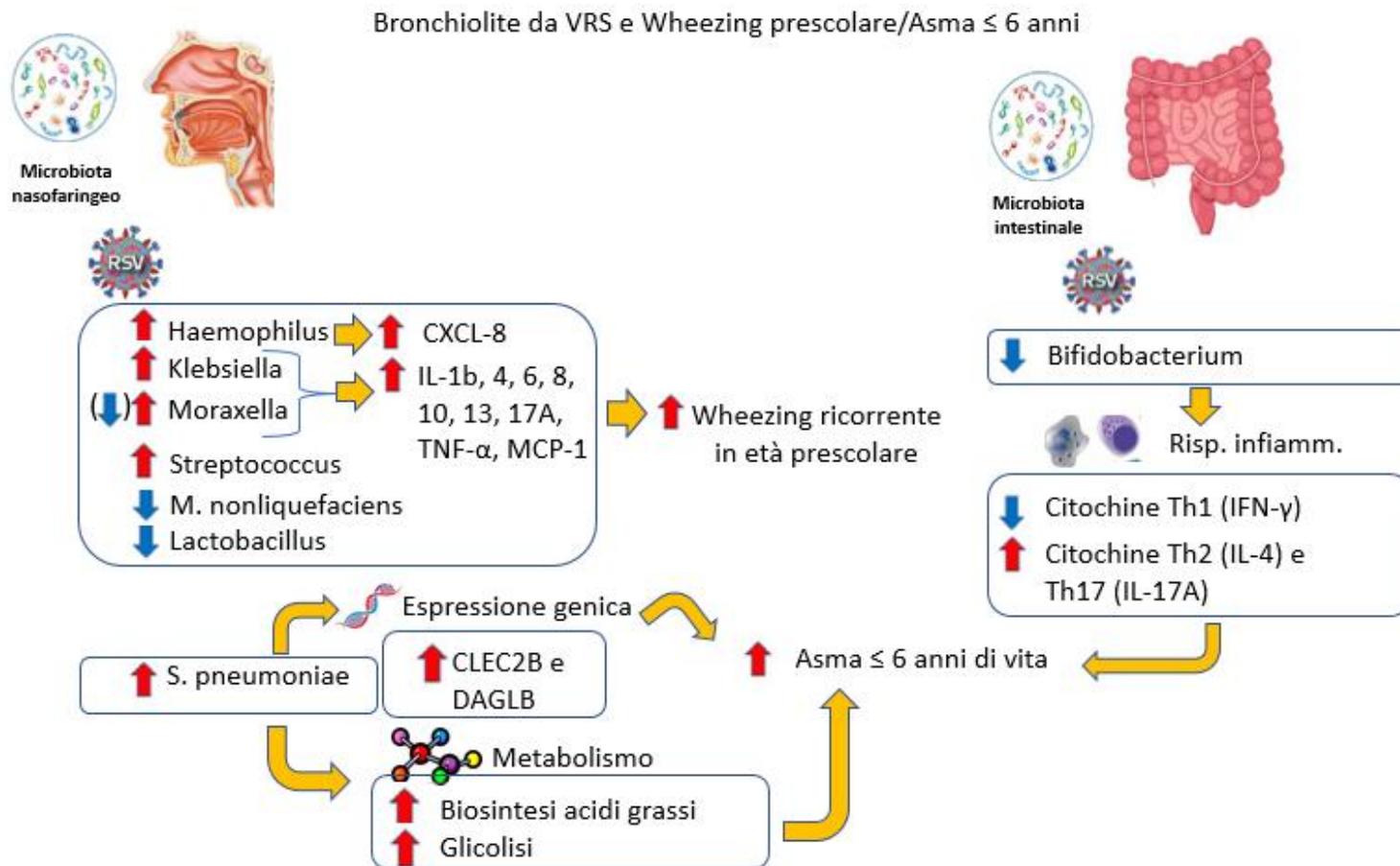


Figura 5: riassunto delle alterazioni nella composizione del microbiota nasofaringeo ed intestinale in corso di evento bronchiolite da VRS e correlazioni con espressione genetica, metabolismo, risposta infiammatoria, in relazione ad outcome clinici a lungo termine (wheezing prescolare e asma entro i 6 anni di vita).

Adattata da:

- Rossi GA, Colin AA. Infantile respiratory syncytial virus and human rhinovirus infections: respective role in inception and persistence of wheezing. *Eur Respir J.* 2015 Mar;45(3):774-89. doi: 10.1183/09031936.00062714. Epub 2014 Oct 30. PMID: 25359340.
- Rossi GA, Ballarini S, Silvestri M, Sacco O, Colin AA. Respiratory syncytial virus and airway microbiota - A complex interplay and its reflection on morbidity. *Pediatr Allergy Immunol.* 2021 Aug;32(6):1141-1151. doi: 10.1111/pai.13524. Epub 2021 May 7. PMID: 33896042.

2. Scopo del progetto di ricerca

Il progetto di ricerca consiste in uno studio osservazionale prospettico monocentrico, spontaneo, con impiego di tessuti umani in vitro, senza uso di medicinali.

Lo studio si propone di indagare la relazione tra severità del decorso clinico del paziente con bronchiolite, durante il periodo del ricovero, e la carica virale (RNA-VRS), la risposta immunitaria dell'ospite, il microbiota nasofaringeo ed intestinale (Fase 1).

Il presente studio si propone anche di studiare le modificazioni evolutive nel tempo (follow-up a breve e lungo termine) del microbiota nei primi anni di vita dei pazienti che sono stati affetti da bronchiolite, in relazione particolarmente con lo sviluppo di wheezing ricorrente entro i 3 anni successivi alla bronchiolite (Fase 2 e 3).

L'obiettivo primario dello studio consiste nel valutare, nei casi di bronchiolite acuta da VRS in bambini con età inferiore a 12 mesi, se esista una correlazione tra il decorso clinico della malattia e la carica di RNA-VRS nei campioni di AFN. Il decorso clinico dell'infezione viene valutato mediante score clinico all'ingresso, tipologia di supporto respiratorio, durata dell'ossigenoterapia e del ricovero ospedaliero.

Obiettivi secondari consistono:

- nel valutare la correlazione tra decorso clinico dell'infezione e la carica di RNA-VRS, in relazione a risposta infiammatoria e immunitaria dell'ospite, microbiota nasofaringeo, microbiota intestinale;
- nel comparare i dati ottenuti nei bambini con bronchiolite acuta da VRS con quelli ottenuti in bambini della medesima età con bronchiolite acuta causata da altri microrganismi patogeni (popolazione di controllo);
- nel valutare la correlazione tra microbiota (nasofaringeo e intestinale) e metabolomica urinaria e lo sviluppo di wheezing ricorrente al follow-up a breve termine (10 giorni, 1 mese, 6 mesi dalla dimissione) e a lungo termine (1 anno, 2 anni, 3 anni dalla dimissione).

3. Materiali e metodi

3.1. Disegno dello studio

Il progetto di ricerca consiste in uno studio osservazionale prospettico monocentrico, spontaneo, con impiego di tessuti umani in vitro, senza uso di medicinali.

Lo studio, con codice RMB2018 e Protocollo n° 3869/2018, è stato approvato dal Comitato Etico Indipendente dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna nella seduta del 12/12/2018.

3.2. Popolazione dello studio

La popolazione dello studio è costituita da bambini di età compresa tra 0 e 12 mesi senza comorbidità, ricoverati con diagnosi clinica di bronchiolite acuta presso il Reparto di Pediatria d'Urgenza della U.O. Pediatria d'Urgenza, Pronto Soccorso Pediatrico e Osservazione Breve Intensiva dell'IRCCS Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico Sant'Orsola.

Criteri di inclusione della popolazione di studio sono:

- Età compresa tra 0 e 12 mesi
- Ricovero ospedaliero per prima diagnosi clinica di bronchiolite acuta. La diagnosi di bronchiolite acuta viene effettuata sulla base dei seguenti criteri:
 - presenza di sibili o rantoli crepitanti bilaterali all'auscultazione
 - riscontro recente di patologia delle vie aeree superiori
- Consenso informato firmato dai genitori/tutori legali

Criteri di esclusione della popolazione di studio sono:

- Malattie cardiopolmonari croniche
- Disturbi neuromuscolari
- Fibrosi cistica
- Immunodeficienza congenita o acquisita
- Altre malattie respiratorie concomitanti che determinino distress respiratorio

3.3. Visite, campioni e dati raccolti

Le fasi dello studio risultano così articolate:

- FASE 1: Fase del ricovero (arruolamento)
- FASE 2: Follow-up a breve termine
- FASE 3: Follow-up a lungo termine

FASE 1: Fase del ricovero (arruolamento)

Durante il periodo del ricovero ospedaliero, i dati clinici, laboratoristici e radiologici dei pazienti arruolati, parte integrante del normale percorso assistenziale, vengono valutati e registrati in un'apposita scheda di raccolta dati (Case Report Form, CRF).

I dati raccolti nel CRF consistono in:

- Dati anagrafici e anamnestici di base: nome, cognome, sesso, data di nascita, etnia, età al momento del ricovero, età gestazionale alla nascita, peso alla nascita, peso al momento del ricovero, tipo di allattamento ricevuto.
- Dati riguardanti il ricovero: data del ricovero, data della dimissione; numero di giorni di degenza ordinaria; eventuale trasferimento presso la Rianimazione Pediatrica (= Terapia Intensiva Pediatrica, TIP) e numero di giorni di ricovero
- Dati clinici:

- Durata in giorni della sintomatologia respiratoria che ha portato all'accesso in PS
- Parametri vitali del paziente all'ingresso (frequenza cardiaca, frequenza respiratoria, temperatura corporea, saturazione di ossigeno)
- Presenza di segni di distress respiratorio (tachipnea, alitamento pinne nasali, rientramenti intercostali, sub-diaframmatici/sottocostali e al giugulo)
- Presenza di sibili o rantoli crepitanti bilaterali all'auscultazione
- Difficoltà all'alimentazione
- Complicanze acute insorte a seguito della bronchiolite virale (disidratazione, sepsi, otite media acuta batterica o altra infezione batterica secondaria, pneumotorace, pneumomediastino, versamento pleurico)
- Score clinico all'ingresso in Reparto: in concomitanza con l'inizio del ricovero viene calcolato il Bronchiolitis Clinical Score del paziente (range 0-12) sulla base di frequenza respiratoria, distress respiratorio, segni indiretti di distress e reperti auscultatori (Tabella 7). Alla luce del Clinical Score, la bronchiolite viene classificata in lieve (score 1-4), moderata (score 5-8) o severa (score 9-12).¹²²

<i>Clinical Score</i>	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>
<i>Frequenza respiratoria (atti/minuto)</i>	< 50	50-60	61-69	≥ 70
<i>Segni di distress respiratorio</i>	Distress Assente	Rientramenti sottocostali o intercostali	Due dei seguenti: rientramenti sottocostali, intercostali, sottosternali o alitamento pinne nasali	Tre o più dei seguenti: rientramenti sottocostali, intercostali, sottosternali, al giugulo o alitamento pinne nasali
<i>Segni indiretti di distress</i>	Alimentazione regolare	Difficoltà all'alimentazione	Due dei seguenti: difficoltà all'alimentazione, pallore, cianosi periorale o agitazione	Due dei seguenti: cianosi, rifiuto all'alimentazione, iporeattività
<i>Auscultazione</i>	normale	sibili telespiratori o rantoli crepitanti	sibili espiratori e/o rantoli crepitanti	sibili inspiratori ed espiratori e/o riduzione dell'ingresso aereo

Tabella 7: Clinical Score della bronchiolite. Modificato da Basile V et al.¹²²

- Esami laboratoristici e strumentali: esami ematici, tampone nasofaringeo, AFN per diagnosi eziologica della bronchiolite, eventuali Rx torace ed ecografia polmonare
- Dati terapeutici: terapie effettuate; eventuale durata dell'ossigenoterapia, data di dimissione

Nel CRF viene inoltre registrata la diagnosi eziologica di bronchiolite, ottenuta mediante raccolta di AFN e condotta presso il Laboratorio di Virologia dell'U.O. di Microbiologia dell'IRCCS Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico Sant'Orsola.

Nel CRF vengono inoltre registrati gli eventuali esami strumentali e le pratiche terapeutiche sui pazienti, che vengono condotte in accordo con l'attuale pratica clinica.

Un consenso informato viene richiesto ai genitori/tutori dei pazienti prima dell'arruolamento.

Ottenuto il consenso, nella fase dell'arruolamento vengono raccolti i campioni di aspirato faringonasale (AFN), di saliva, di urina e di feci:

- la raccolta di AFN viene effettuata nel corso delle aspirazioni delle prime vie aeree che vengono eseguite routinariamente in corso del ricovero per mantenere libere da secrezioni le prime vie aeree per facilitare la respirazione dei bambini. Il campione di AFN raccolto viene raccolto in terreno di trasporto “Universal Transport Medium” (UTM™, Copan, Italia) e poi conservato dal Laboratorio di Virologia dell’U.O. di Microbiologia dell’IRCCS Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico Sant’Orsola suddiviso in 3 aliquote distinte refrigerate a -80°C, necessarie per eseguire il dosaggio della carica virale (quantificazione del livello di RNA-VRS mediante Real Time reverse transcriptase (RT) PCR quantitativa in caso di positività del test di IF per VRS), il dosaggio delle citochine e dell’infiltrato infiammatorio (presso la Clinical Research Division del Fred Hutchinson Cancer Research Center a Seattle, WA, United States of America) e l’analisi del microbiota nasofaringeo (presso l’Unità di Ecologia Microbica della Salute del Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie dell’Università di Bologna);
- la raccolta di saliva viene effettuata mediante tampone a secco conservato poi in terreno di trasporto UTM™. Il campione raccolto viene poi conservato refrigerato a -20°C dal Laboratorio di Virologia dell’U.O. di Microbiologia dell’IRCCS Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico Sant’Orsola e su tale campione viene infine analizzato il microbiota salivare (presso l’Unità di Ecologia Microbica della Salute del Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie dell’Università di Bologna);
- la raccolta di urina viene effettuata mediante posizionamento di sacchetto adesivo “Urinocol” e successivo trasferimento del campione in provetta dedicata. Il campione raccolto viene poi conservato refrigerato a -20°C dal Laboratorio di Virologia dell’U.O. di Microbiologia dell’IRCCS Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico Sant’Orsola e su tali campioni viene infine effettuata l’analisi del metaboloma urinario (presso l’Unità di Ecologia Microbica della Salute del Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie dell’Università di Bologna);
- la raccolta di feci viene effettuata da evacuazioni spontanee. Il campione raccolto viene poi conservato refrigerato a -20°C dal Laboratorio di Virologia dell’U.O. di Microbiologia dell’IRCCS Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico Sant’Orsola e su tali campioni viene infine effettuata l’analisi del microbiota intestinale (presso l’Unità di Ecologia Microbica della Salute del Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie dell’Università di Bologna);
- qualora sia possibile prelevare sangue intero dall’accesso vascolare eventualmente posizionato per le necessità cliniche del paziente, viene prelevato campione ematico in provetta con litio-eparina (3 mL). Tale raccolta di campione ematico viene eseguita solo nei pazienti con accesso venoso, per evitare di sottoporre i pazienti a flebotomia dedicata ai soli fini dello studio, o in caso di esecuzione di prelievo ematico per altri motivi clinici. Il campione raccolto viene poi conservato dal Laboratorio di Virologia dell’U.O. di Microbiologia dell’IRCCS Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico Sant’Orsola per la separazione di plasma e di cellule mononucleate da sangue periferico (PBMC), conservati rispettivamente a -80°C ed in azoto liquido per poi essere inviati presso la Clinical Research Division, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA, United States of America, per la ricerca di citochine nel campione di plasma e la valutazione delle sottopopolazioni linfocitarie nel campione di PBMC mediante citometria a flusso FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting).

Effettuata la raccolta di tutti e 4 i campioni al momento del ricovero, ogni 48 ore viene ripetuto il prelievo di AFN in occasione dell’aspirazione che viene effettuata per mantenere pervie le vie aeree del paziente.

Alla dimissione dal Reparto vengono nuovamente collezionati tutti e 5 i tipi di campione (sangue venoso periferico incluso se paziente ancora portatore di accesso vascolare e se sottoposto a prelievo all'arruolamento).

FASE 2 e 3: Follow-up a breve e lungo termine

Una volta dimessi, i pazienti vengono richiamati per visite periodiche, durante le quali viene effettuato un raccordo anamnestico, una visita clinica di controllo, una nuova raccolta dei 4 campioni biologici (AFN, saliva, urina, feci, sangue escluso) che vengono conservati nei modi precedentemente descritti ed analizzati dai settori di ricerca competenti.

Nel corso di questo studio la rilevazione dei parametri clinici e il prelievo di campioni biologici vengono effettuati secondo lo schema riportato in tabella 8.

Le rilevazioni cliniche e la raccolta dei campioni di tessuti umani vengono distinte in 3 fasi consecutive:

- FASE 1: Fase dell'arruolamento e del ricovero (V0-V4)
- FASE 2: Follow-up a breve termine (V5-V7)
- FASE 3: Follow-up a lungo termine (V8-V10)

	Fase 1					Fase 2		Fase 3
	V0	V1	V2	V3	V4	V5	V6-7	V8-V10
	Pre - arruolamento	Arruolamento	Controllo a 48h dal ricovero	Ogni 2 giorni	Dimissione	10 giorni dalla dimissione	1 e 6 mesi dalla dimissione	Follow-up annuale fino ai 3 anni
Consenso informato		X						
Criteri di inclusione/esclusione	X							
Anamnesi	X					X	X	X
Esame obiettivo	X		X	X	X			X
Raccolta dati anagrafici, clinici e terapeutici		X	X	X	X			X
AFN	X		X		X			
RNA PCR per VRS su AFN		X	X	X	X	X	X	
Dosaggio citochine su AFN		X	X	X	X	X	X	
Esami ematici di routine	X							
Esami ematici per sottopopolazioni linfocitarie e citochine infiammatorie		X*			X*			
Raccolta di saliva per microbiota salivare		X			X	X	X	X
Raccolta AFN per microbiota nasofaringeo		X			X	X	X	X
Raccolta urine per metaboloma		X			X	X	X	X
Raccolta feci per microbiota intestinale		X			X	X	X	X

Tabella 8: riassunto schematico delle fasi dello studio e dei campioni prelevati in ogni fase

X* - la raccolta di campione ematico viene eseguita solo nei pazienti con accesso venoso, per evitare di sottoporre i pazienti a flebotomia dedicata ai soli fini dello studio, o in caso di esecuzione di prelievo ematico per altri motivi clinici.

La ricerca del genoma del VRS nei campioni biologici viene realizzata mediante estrazione degli acidi nucleici seguita da reazione di amplificazione.

L'estrazione viene eseguita su strumento automatizzato NucliSENS® easyMag® (bioMérieux), che sfrutta la capacità della silice magnetica di catturare acidi nucleici liberi in soluzione (dopo lisi del campione). In particolare, un volume iniziale pari a 200 µl di campione respiratorio viene dispensato in pozzetti inseriti all'interno dello strumento. Dopo una fase di lisi del campione vengono aggiunte biglie magnetiche rivestite di silice in grado di legare gli acidi nucleici liberi in soluzione, che verranno isolati, purificati e risospesi in 50 µl di tampone di eluizione. Nei 200 µl di campione iniziale, prima di procedere alla fase di estrazione, vengono aggiunti 5 µl di controllo interno (sequenza di RNA sintetizzata) necessari per monitorare l'intera procedura e l'eventuale inibizione di amplificazione.

Dopo l'estrazione, 5 µl di campione vengono sottoposti a retrotrascrizione (cDNA) e amplificazione mediante Real Time PCR quantitativa (rtq-PCR), tecnologia Taqman (DiaSorin) su strumento 3MTM Integrated Cyler (Diasorin) dotato di supporti a disco nel quale le reazioni avvengono attraverso un sistema di microfluidica. Insieme ai campioni da saggiare, vengono amplificati campioni a concentrazione nota per ottenere una curva di calibrazione (curva standard) per la quantificazione del carico virale. In presenza del target virale, gene matrix (codificante la proteina di matrice del virus), la reazione di amplificazione produce ampliconi, rilevati da emissione di fluorescenza dovuta alla presenza, nel mix di reazione, di una sonda marcata con un fluoroforo e complementare, nella sequenza nucleotidica, al target virale. Quando la sonda ed il target formano un ibrido viene emessa fluorescenza. Il risultato quantitativo viene ottenuto mediante confronto dell'emissione di fluorescenza relativa ai singoli campioni con quella dei punti della curva standard. Tutti i valori di carica virale, espressi come numero di copie di VRS/mL di campione, vengono normalizzati sulla base della quantificazione di materiale genomico presente in ciascun campione (copie di VRS-RNA/ng DNA), eseguita mediante spettrofotometro NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific). I valori della carica virale vengono successivamente trasformati in scala logaritmica per permettere una più omogenea analisi dei risultati ottenuti.

Per l'analisi del microbiota nasofaringeo (da AFN e da saliva) e intestinale (feci) il DNA microbico viene estratto dai campioni mediante impiego del kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN) con opportune modifiche a seconda della tipologia di campione. La concentrazione finale del DNA viene determinata usando lo spettrofotometro NanoDrop ND-1000.

Viene poi effettuata la caratterizzazione filogenetica del microbiota mediante next-generation sequencing del gene 16S rRNA. L'analisi viene effettuata mediante amplificazione delle regioni ipervariabili V3 e V4 del gene batterico codificante il 16S rRNA, seguendo il protocollo Illumina per la preparazione delle librerie. La procedura di sequenziamento ottimizzata per la piattaforma Illumina MiSeq è descritta nello studio di Caporaso et al.¹²³

Le sequenze ottenute vengono analizzate attraverso il software open source Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME). In breve, le sequenze vengono filtrate per qualità, raggruppate sulla base dell'identità al 97% in Operational Taxonomic Units (OTUs) e quindi assegnate ad un taxon batterico.

Il potenziale funzionale del microbiota viene studiato mediante sequenziamento shotgun del metagenoma. A tal fine, viene utilizzata la piattaforma Illumina NextSeq e seguiti i protocolli di analisi utilizzati in Rampelli e Colleghi: in breve, le sequenze vengono filtrate per qualità e contaminazione da DNA genomico umano utilizzando la procedura descritta dallo Human Microbiome Project, le sequenze risultanti vengono analizzate mediante due approcci: assemblaggio de novo e annotazione delle ORF mediante server di annotazione come MG-RAST e IMG/M, contro il database GenBank, KEGG o eggNOG, ma anche mappaggio diretto delle reads sul database NCBI, mediante impiego degli algoritmi bowtie2 o bwa.

Per la caratterizzazione della comunità fungina e di quella virale vengono utilizzati tool open source, come FungiScan e ViromeScan. Il resistoma, ovvero il pattern di geni codificanti per antibiotico-resistenze, viene caratterizzato mediante mappaggio dei contigs su specifici database. Il profiling dei ceppi viene effettuato mediante impiego di StrainPhlAn. I dati così ottenuti vengono infine analizzati con il software R per le valutazioni statistiche.

I campioni di urina vengono analizzati mediante risonanza magnetica nucleare (NMR), seguendo i protocolli di preparazione campione ed analisi descritti in De Filippis et al.¹²⁴ L'identificazione delle molecole di interesse viene effettuata mediante confronto con database, quali Human Metabolome Database e Chenomx software data bank. I campioni ematici raccolti per la valutazione dello stato immunitario dell'ospite (PBMC e citochine infiammatorie sieriche) vengono trattati negli presso la Clinical Research Division, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA, United States of America.

3.4. Analisi statistica

I dati raccolti sono stati espressi come media (\pm deviazione standard, DS) per le variabili quantitative parametriche. Le variabili non parametriche qualitative sono state riportate in numero assoluto (percentuale), mentre le non parametriche quantitative sono state espresse come mediana (con range interquartile).

Sono stati effettuati confronti tra il campione di pazienti affetti da bronchiolite da VRS ed i pazienti affetti da bronchiolite acuta da altri agenti infettivi (utilizzata come popolazione di controllo), comparando le caratteristiche demografiche e cliniche (età, durata della sintomatologia) e l'outcome clinico (tipologia di supporto respiratorio, durate ossigenoterapia e durata della degenza).

Le variabili parametriche sono state confrontate mediante T-test di Student; le variabili non parametriche qualitative sono state comparate mediante test χ^2 o test di Fisher, mentre le variabili non parametriche quantitative sono state comparate mediante test di Mann-Whitney.

Per valutare la predittività di un parametro è stata utilizzata l'analisi della curva ROC e come misura di accuratezza diagnostica è stata calcolata l'area sottostante la curva (AUC). Il valore del relativo parametro con migliore capacità predittiva è stato calcolato mediante test di Youden.

I fattori predittivi per i quali si ipotizza un effetto sull'outcome sono stati inseriti come variabili indipendenti in un'analisi di regressione monovariata al fine di valutare la significatività statistica degli stessi, ponendo come variabili dipendenti la durata dell'ossigenoterapia e del ricovero. I fattori significativi o riconosciuti come influenti sull'outcome sono stati quindi inseriti in un'analisi di regressione logistica multivariata.

Tutte le ipotesi sono state testate utilizzando test a 2 code all'interno di un intervallo di $p < 0,05$. Per valutare il grado di concordanza tra i parametri rilevati con due test differenti è stato costruito un grafico di regressione lineare.

Tutte le analisi relative alla carica virale sono state eseguite utilizzando SPSS 25.0 per Windows (SPSS, Chicago, Illinois) e GraphPad 8.0.1.

Per quanto riguarda l'analisi del microbiota, è stata valutata la diversità intra-individuale (diversità α) mediante impiego delle metriche Faith's phylogenetic diversity, observed OTUs e Shannon index. La diversità inter-individuale (diversità β) è stata valutata mediante distanze UniFrac weighted e unweighted, utilizzate poi come input per l'analisi delle coordinate principali (PCoA). I grafici di PCoA, heatmap e i bar plot sono stati costruiti utilizzando i pacchetti Made4 e Vegan di R. L'analisi statistica è stata portata a termine utilizzando i pacchetti Vegan e Stats. La separazione dei dati in PCoA è stata testata utilizzando un test di permutazione con pseudo-F ratios (funzione Adonis di Vegan). Il test di Fisher (exact test) è stato utilizzato per valutare la significatività. Un valore di $p < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo.

4. Risultati

Nello studio sono stati arruolati finora 90 pazienti. Le analisi statistiche relative all'intero campione di studio sono state condotte su 89 pazienti, essendo 1 risultato da escludere successivamente all'arruolamento in quanto non rispondente ai criteri di inclusione (2° episodio di bronchiolite acuta).

Tutte le caratteristiche cliniche e terapeutiche dei pazienti dello studio, con stratificazione in gruppo "Bronchiolite VRS +" e gruppo "Bronchiolite VRS -" e relativo confronto, sono riportate in Tabella 9A.

	Totale pazienti (n=89)	Bronchiolite VRS + (n=68)	Bronchiolite VRS - (n=21)	p-value
Genere, n (%)				
- Maschi	48 (53.9)	33 (48.5)	15 (71.4)	n.s.
- Femmine	41 (46.1)	35 (51.5)	6 (28.6)	
Etnia, n (%)				
- Caucasica	66/81 (81.5)	48/61 (7.8)	18/20 (90.0)	n.s.
- Afroamericana	9/81 (11.1)	8/61 (13.1)	1/20 (5.0)	
- Asiatica	6/81 (7.4)	5/61 (8.2)	1/20 (5.0)	
Età al ricovero (mesi), mediana (IQR)	2.6 (1.4 – 4.2)	2.4 (1.3 – 3.9)	2.9 (2.1 – 4.2)	n.s.
Età gestazionale (sett) mediana (IQR), - < 37 sett, n (%)	38.7 (38.0 – 40.0) 12 (13.5)	39.0 (38.0 – 40.0) 8 (11.8)	39.0 (37.5 – 40.0) 4 (19.0)	n.s.
Peso (Kg), mediana (IQR)	5.2 (4.4 – 6.8)	5.0 (4.3 – 6.6)	5.7 (4.6 – 6.9)	n.s.
Vaccinati, n (%)	45/86 (52.3)	31/65 (47.7)	14 (66.7)	n.s.
Allattati con latte materno, n (%)	80 (89.9)	60 (88.2)	20 (95.2)	n.s.
Allattamento materno in corso al ricovero, n (%)	12/77 (15.6)	9/59 (15.3)	3/18 (16.7)	n.s.
Esposti a fumo passivo, n (%)	3/51 (5.9)	2/41 (4.9)	1/10 (10.0)	n.s.
Ipertensione materna, n (%)	2/88 (2.3)	2/67 (3.0)	0	n.s.
Diabete gestazionale, n (%)	14/88 (15.9)	10/67 (14.9)	4 (19.0)	n.s.

Note: IQR = intervallo interquartile, Kg = kilogrammi, n = numero di casi, n.s. = non significativo, sett = settimane, % = frequenza percentuale

Tabella 9A: caratteristiche anamnestiche dei pazienti appartenenti all'intero campione, successivamente stratificato per gruppo "Bronchiolite VRS +" e gruppo "Bronchiolite VRS -" ed analisi di confronto tra i due gruppi.

Tutte le caratteristiche cliniche e terapeutiche dei pazienti dello studio, con stratificazione in gruppo “Bronchiolite VRS +” e gruppo “Bronchiolite VRS -” e relativo confronto, sono riportate in Tabella 9B.

	Totale pazienti (n=89)	Bronchiolite VRS + (n=68)	Bronchiolite VRS - (n=21)	p-value
Durata esordio sintomi-ricovero (gg), mediana (IQR)	3.0 (2.0 – 5.0)	3.0 (2.0 – 4.8)	5.0 (3.0 – 7.0)	0.02
SatO₂ all’ingresso, mediana (IQR)	96.0 (94.0 – 98.0)	96.0 (93.0 – 98.0)	97.0 (94.5 – 98.0)	n.s.
GB all’ingresso, media (±DS)	11532.2 (±4521.4)	11022.6 (±4008.1)	13372.2 (±5792.3)	n.s.
PCR all’ingresso, media (± DS)	1.7 (±2.7)	1.7 (±2.7)	1.7 (±3.0)	n.s.
Supporto ventilatorio, n (%)				n.s.
- No	41 (46.1)	30 (44.1)	11 (52.4)	
- NC	37 (41.6)	30 (44.1)	7 (34.3)	
- HFNC	11 (12.3)	8 (11.8)	3 (14.3)	
Durata O₂ terapia (h), mediana (IQR)	24.0 (0 – 72.0)	24.0 (0 – 72.0)	24.0 (0 – 72.0)	n.s.
Difficoltà alimentari, n (%)	61 (68.5)	50 (73.5)	11 (52.4)	n.s.
Idratazione ev, n (%)	68 (76.4)	53 (77.9)	15 (71.4)	n.s.
Terapia antibiotica, n (%)	21/85 (24.7)	18/66 (27.3)	3/19 (15.8)	n.s.
Terapia cortisonica, n (%)	21/84 (25.0)	18/65 (27.7)	3/19 (15.8)	n.s.
Terapia aerosolica, n (%)				
- Totale	81 (91.0)	61 (89.7)	20 (95.2)	n.s.
- Adrenalina	25 (28.1)	22 (32.4)	3 (14.3)	n.s.
- Salbutamolo	29 (32.6)	23 (33.8)	6 (38.6)	n.s.
- Sol. Fisiologica	72 (80.9)	55 (80.9)	17 (81.0)	n.s.
- Ipratropio	1 (1.1)	1 (1.5)	0	n.s.
- Budesonide	6 (6.7)	4 (5.9)	2 (9.5)	n.s.
Bronchiolitis Clinical Score, mediana (IQR)	4.0 (3.0 – 5.0)	4.0 (3.0 – 5.0)	4.0 (3.0 – 4.0)	n.s.
- score ≥ 5, n (%)	26 (29.2)	26 (38.2)	0	< 0.001
Complicanze acute	1/85 (1.2)	1/66 (1,5)	0	n.s.
Durata ricovero (gg), mediana (IQR)	5.0 (4.0 – 6.0)	5.0 (4.0 – 6.8)	4.5 (3.0 – 6.0)	n.s.

Note: DS = deviazione standard, ev = endovena, gg = giorni, h = ore, IQR = intervallo interquartile, Kg = kilogrammi, n = numero di casi, n.s. = non significativo, O₂ = ossigeno, SatO₂ = saturazione di O₂, sett = settimane, % = frequenza percentuale

Tabella 9B: caratteristiche cliniche e terapeutiche dei pazienti appartenenti all’intero campione, successivamente stratificato per gruppo “Bronchiolite VRS +” e gruppo “Bronchiolite VRS -”.

Purtroppo, il dilagare della pandemia COVID-19 scatenata dal virus SARS-CoV-2 ha influenzato notevolmente tutti gli scenari clinici, tra cui quello della bronchiolite, influenzando inevitabilmente sullo studio condotto. Durante la stagione epidemica 2020-2021 abbiamo infatti assistito ad un sostanziale azzeramento dei casi bronchiolite e di conseguente arruolamento ai fini dello studio, come si può evincere dal Grafico 1, estrapolato dallo studio pubblicato da parte del nostro gruppo di

lavoro⁹ e dal Grafico 2, che illustra la distribuzione degli arruolamenti per ogni stagione epidemica di VRS attraversata finora dallo studio RMB, con annullamento di fatto dell'arruolamento nella stagione 2020-2021 e successiva ripresa nella 4° stagione a livelli paragonabili all'epoca pre-COVID-19 (Grafico 2)

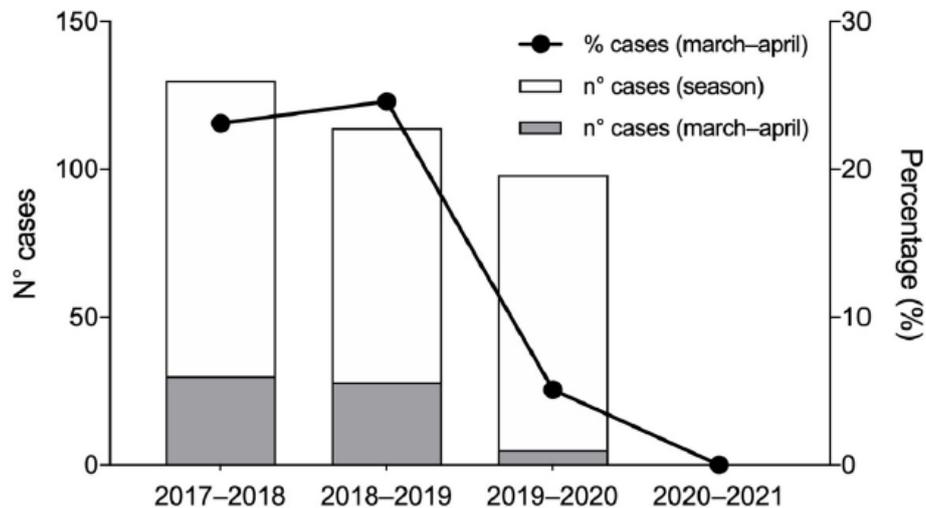


Grafico 1: numero di casi di bronchiolite ricoverati nel nostro Centro Ospedaliero di Terzo Livello nelle stagioni epidemiche VRS 2017-2018, 2018-2019, 2019-2020 (ove già si può osservare la riduzione assoluta – in grigio e percentuale – linea nera di casi di bronchiolite nei mesi di marzo e aprile), 2020-2021. Estrapolato da Stera G et al. Children (Basel). 2021⁹

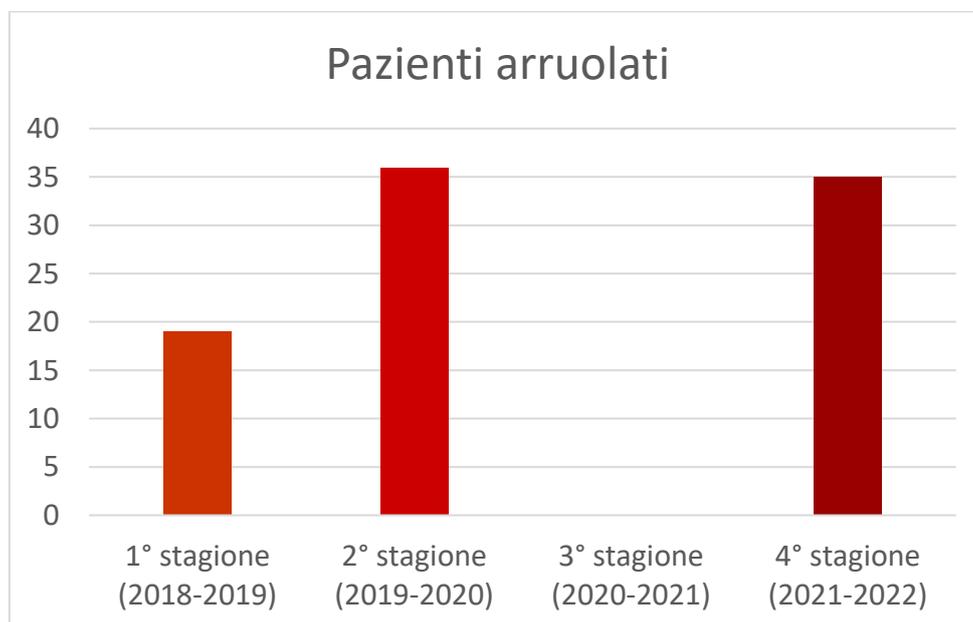


Grafico 2: distribuzione dei pazienti arruolati per stagione epidemica da VRS dello studio.

La pandemia ha inficiato anche il follow-up a breve e lungo termine di alcuni gruppi di pazienti arruolati, a causa dei lockdown imposti alla popolazione nel corso di alcuni mesi dell'anno 2020, nonché del generale timore di contagio durante i mesi di picchi epidemici da SARS-CoV-2 attraversati nel corso degli anni 2020 e 2021, che hanno favorito un drop out parziale (mancata adesione ad alcuni controlli) o totale (richiesta di abbandono dello studio), come si può evincere dalla situazione riassunta nel Grafico 3.

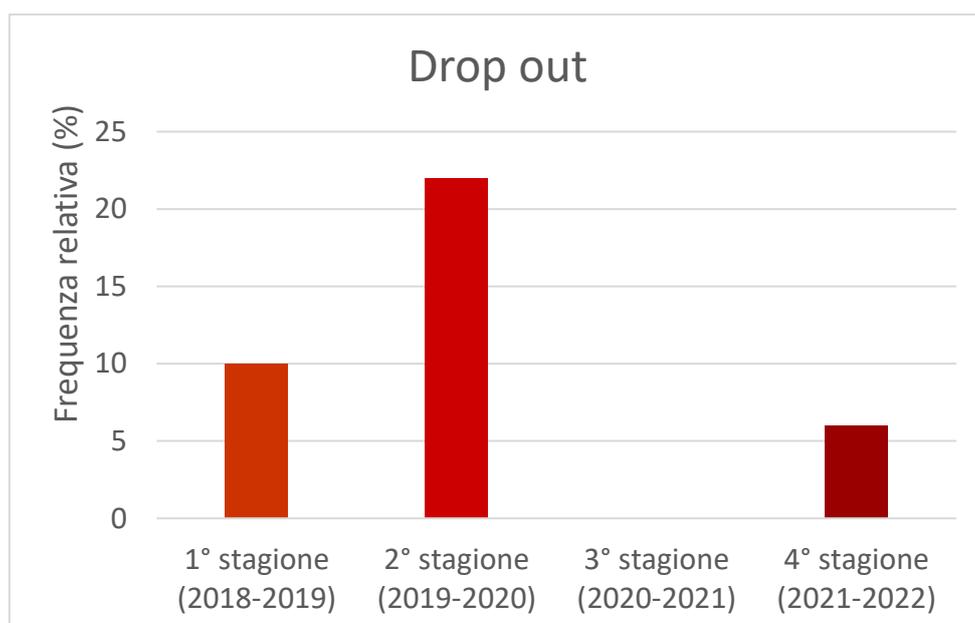


Grafico 3: distribuzione delle percentuali di drop out occorse durante la pandemia COVID-19 stratificate per stagione di arruolamento dello studio.

Considerando che la metà delle stagioni epidemiche finora attraversate dallo studio è risultata influenzata dalla pandemia COVID-19, si è provveduto ad analizzare l'intero campione di popolazione arruolata finora stratificato nei 2 sottogruppi "pre COVID-19" e "COVID-19" per verificare il mantenimento dell'omogeneità del campione ai fini delle variabili anamnestiche, cliniche e terapeutiche indagate dallo studio (risultati riassunti nelle Tabelle 10A e 10B).

	Totale pazienti (n=89)	Pre COVID-19 (n=54)	COVID-19 (n=35)	p-value
Genere, n (%)				n.s.
- Maschi	48 (53.9)	29 (53.7)	19 (54.3)	
- Femmine	41 (46.1)	25 (46.3)	16 (45.7)	
Etnia, n (%)				< 0.001
- Caucasica	66/81 (81.5)	39/53 (73.6)	32/35 (97.0)	
- Afroamericana	9/81 (11.1)	9/53 (17.0)	0/35 (0)	
- Asiatica	6/81 (7.4)	5/53 (9.4)	1/35 (3.0)	
Età al ricovero (mesi), mediana (IQR)	2.6 (1.4 – 4.2)	2.4 (1.5 – 4.2)	2.9 (1.8 – 3.9)	n.s.
Età gestazionale (sett)				
- Mediana (IQR),	38.7 (38.0 – 40.0)	38.7 (38.0 – 40.0)	38.7 (38.0 – 40.0)	n.s.
- < 37 sett, n (%)	12 (13.5)	7 (13.0)	5 (14.3)	n.s.
Peso (Kg), mediana (IQR)	5.2 (4.4 – 6.8)	5.0 (4.4 – 6.6)	5.5 (4.5 – 6.8)	n.s.
Vaccinati, n (%)	45/86 (52.3)	26 (48.1)	19 (54.3)	n.s.
Allattati con latte materno, n (%)	80 (89.9)	51 (94.4)	29 (82.9)	< 0.001
Allattamento materno in corso al ricovero, n (%)	12/77 (15.6)	1 (1.9)	1 (2.9)	n.s.
Esposti a fumo passivo, n (%)	3/51 (5.9)	8 (15.1)	6 (17.1)	n.s.

Note: IQR = intervallo interquartile, Kg = kilogrammi, n = numero di casi, n.s. = non significativo, sett = settimane, % = frequenza percentuale

Tabella 10A: caratteristiche anamnestiche dei pazienti appartenenti all'intero campione, successivamente stratificato per gruppo "Pre COVID-19" e gruppo "COVID-19".

	Totale pazienti (n=89)	Pre COVID-19 (n=54)	COVID-19 (n=35)	p-value
Durata esordio sintomi-ricovero (gg), mediana (IQR)	3.0 (2.0 – 5.0)	3.0 (2.0 – 5.5)	4.0 (2.5 – 5.5)	n.s.
SatO ₂ all'ingresso, mediana (IQR)	96.0 (94.0 – 98.0)	97.0 (94.0 – 98.0)	96.0 (94.0 – 98.0)	n.s.
GB all'ingresso, media (±DS)	11532.2 (±4521.4)	11927.7 (±5065.0)	10868.8 (±3397.1)	n.s.
PCR all'ingresso, media (± DS)	1.7 (±2.7)	2.1 (±2.9)	5.5 (±11.7)	0.04
Supporto ventilatorio, n (%)				< 0.001
- No	41 (46.1)	32 (59.3)	9 (25.7)	0.003
- NC	37 (41.6)	16 (29.6)	21 (60.0)	0.005
- HFNC	11 (12.3)	6 (11.1)	5 (14.3)	n.s.
Durata O ₂ terapia (h), mediana (IQR)	24.0 (0 – 72.0)	0 (0 – 48.0)	65.0 (0 – 72.0)	0.009
Difficoltà alimentari, n (%)	61 (68.5)	37 (68.5)	24 (68.6)	n.s.
Idratazione ev, n (%)	68 (76.4)	42 (77.8)	26 (74.3)	n.s.
Terapia antibiotica, n (%)	21/85 (24.7)	26 (48.1)	13 (37.1)	0.03
Terapia cortisonica, n (%)	21/84 (25.0)	19 (35.2)	14 (40.0)	n.s.
Terapia aerosolica, n (%)				
- Totale	81 (91.0)	51 (94.4)	35 (100)	0.01
- Adrenalina	25 (28.1)	18 (33.3)	16 (45.7)	0.01
- Salbutamolo	29 (32.6)	16 (29.6)	18 (51.4)	< 0.001
- Sol. Fisiologica	72 (80.9)	42 (77.8)	35 (100)	< 0.001
- Ipratropio	1 (1.1)	0	1 (2.9)	n.s.
- Budesonide	6 (6.7)	3 (5.6)	4 (11.4)	n.s.
Bronchiolitis Clinical Score, mediana (IQR)	4.0 (3.0 – 5.0)	4.0 (3.0 – 5.0)	4.0 (0 – 5.0)	n.s.
- score ≥ 5, n (%)	26 (29.2)	14 (25.9)	12 (34.3)	n.s.
Complicanze acute	1/85 (1.2)	0	1 (2.9)	n.s.
Durata ricovero (gg), mediana (IQR)	5.0 (4.0 – 6.0)	5.0 (4.0 – 6.0)	1.0 (4.0 – 6.0)	n.s.

Note: DS = deviazione standard, ev = endovena, gg = giorni, h = ore, IQR = intervallo interquartile, Kg = kilogrammi, n = numero di casi, n.s. = non significativo, O₂ = ossigeno, SatO₂ = saturazione di O₂, sett = settimane, % = frequenza percentuale

Tabella 10B: caratteristiche cliniche e terapeutiche dei pazienti appartenenti all'intero campione, successivamente stratificato per gruppo "Pre COVID-19" e gruppo "COVID-19".

Stanti le difficoltà sopraelencate, al termine del periodo di Dottorato di ricerca è stato possibile condurre le analisi su limitati sottogruppi di pazienti.

Per l'analisi della carica virale e la correlazione con gli outcome clinici relativi alla bronchiolite nella fase di arruolamento e ricovero dello studio è stato selezionato un campione di 41 lattanti dai 68 con bronchiolite VRS positiva (60.3%) per i quali sono risultati disponibili i campioni biologici per le analisi a più timepoint. Questo sottogruppo è stato sottoposto a confronto con il campione totale per verificare l'omogeneità del sottocampionamento.

Analogamente, per le analisi relative al microbiota nasofaringeo e intestinale è stato selezionato un campione di 20 soggetti (29.4%) di cui si dispone dei campioni biologici di tutti i timepoint per i quali sono stati chiamati finora i pazienti arruolati. Anche questo sottogruppo è stato sottoposto a confronto con il campione totale.

I risultati relativi ai sottogruppi ed al confronto con l'intero campione di studio sono sintetizzati nelle Tabelle 11A e 11B.

	Totale pazienti (n=89)	Analisi carica virale (n=41)	p-value	Analisi microbiota (n=20)	p-value
Genere, n (%)			n.s.		n.s.
- Maschi	48 (53.9)	21 (51.2)		13 (65.0)	
- Femmine	41 (46.1)	20 (48.8)		7 (35.0)	
Etnia, n (%)			n.s.		n.s.
- Caucasica	66/81 (81.5)	27/35 (77.1)		18/19 (94.7)	
- Afroamericana	9/81 (11.1)	6/35 (17.1)		0	
- Asiatica	6/81 (7.4)	2/35 (5.7)		1/19 (5.3)	
Età al ricovero (mesi), mediana (IQR)	2.6 (1.4 – 4.2)	3.3 (1.4 – 6.4)	n.s.	2.8 (1.4 – 3.8)	n.s.
Età gestazionale (sett)					
- Mediana (IQR),	38.7 (38.0 – 40.0)	39.0 (37.0 – 40.1)	n.s.	39.0 (38.0 – 40.0)	n.s.
- < 37 sett, n (%)	12 (13.5)	6 (14.6)		1 (5.0)	
Peso (kg), mediana (IQR)	5.2 (4.4 – 6.8)	5.9 (4.5 – 7.0)	n.s.	5.5 (4.5 – 7.1)	n.s.
Vaccinati, n (%)	45/86 (52.3)	24/37 (64.9)	0.04	10/19 (52.6)	n.s.
Allattati con latte materno, n (%)	80 (89.9)	34/40 (85.0)	n.s.	18 (90.0)	n.s.
Allattamento materno in corso al ricovero, n (%)	12/77 (15.6)	8/31 (25.8)	n.s.	4/17 (23.5)	n.s.
Esposti a fumo passivo, n (%)	3/51 (5.9)	0	n.s.	0	n.s.
Ipertensione materna, n (%)	2/88 (2.3)	1/39 (2.6)	n.s.	0	n.s.
Diabete gestazionale, n (%)	14/88 (15.9)	7/39 (17.9)	n.s.	4 (20.0)	n.s.

Note: IQR = intervallo interquartile, Kg = kilogrammi, n = numero di casi, n.s. = non significativo, sett = settimane, % = frequenza percentuale

Tabella 11A: caratteristiche anamnestiche dei pazienti appartenenti all'intero campione, confrontato con i sottogruppi selezionati per le analisi di correlazione tra carica virale del VRS e outcome clinici ("Analisi carica virale") e per le analisi del microbiota nasofaringeo e intestinale ("Analisi microbiota").

	Totale pazienti (n=89)	Analisi carica virale (n=41)	p-value	Analisi microbiota (n=20)	p-value
Durata esordio sintomi-ricovero (gg), mediana (IQR)	3.0 (2.0 – 5.0)	3.0 (2.0 – 4.8)	n.s.	3.0 (2.0 – 5.0)	n.s.
Sat O2 all'ingresso, mediana (IQR)	96.0 (94.0 – 98.0)	96.0 (94.0 – 97.8)	n.s.	96.0 (94.0 – 98.0)	n.s.
GB all'ingresso, media (±DS)	11532.2 (±4521.4)	11220.3 (±4352.5)	n.s.	11258 (±4008.1)	n.s.
PCR all'ingresso, media (± DS)	1.7 (±2.7)	2.2 (±3.3)	n.s.	1.4 (±3.1)	n.s.

Supporto ventilatorio, n (%)			n.s.		n.s.
- No	41 (46.1)	17 (41.5)		4 (2.,0)	
- NC	37 (41.6)	20 (48.8)		14 (70.0)	
- HFNC	11 (12.3)	4 (9.8)		2 (10.0)	
Durata O₂terapia (h), mediana (IQR)	24.0 (0 – 72.0)	48.0 (0 – 96.0)	n.s.	72.0 (24.0 – 96.0)	n.s.
Difficoltà alimentari, n (%)	61 (68.5)	32 (78.0)	n.s.	14 (70.0)	n.s.
Idratazione endovenosa, n (%)	68 (76.4)	36 (87.8)	n.s.	15 (75.0)	n.s.
Terapia antibiotica, n (%)	21/85 (24.7)	9/38 (22.5)	n.s.	10 (50.0)	n.s.
Terapia cortisonica, n (%)	21/84 (25.0)	11/39 (28.2)	n.s.	9 (45.0)	n.s.
Terapia aerosolica, n (%)					
- Totale	81 (91.0)	37 (87.8)	n.s.	20 (100.0)	n.s.
- Adrenalina	25 (28.1)	14 (34.1)	n.s.	9 (45.0)	n.s.
- Salbutamolo	29 (32.6)	14 (34.1)	n.s.	9 (45.0)	n.s.
- Sol. Fisiologica	72 (80.9)	31 (75.6)	n.s.	20 (100.0)	0.03
- Ipratropio	1 (1.1)	0	n.s.	1 (5.0)	n.s.
- Budesonide	6 (6.7)	1 (2.4)	n.s.	1 (5.0)	n.s.
Bronchiolitis Clinical Score, mediana (IQR)	4.0 (3.0 – 5.0)	4.0 (3.0 – 5.0)	n.s.	4.0 (3.0 – 5.0)	n.s.
- score ≥ 5, n (%)	26 (29.2)	13 (31.7)	n.s.	7 (35.0)	n.s.
Complicanze acute	1/85 (1.2)	1/37 (2.7)	n.s.	1/19 (5,3)	n.s.
Durata ricovero (gg), mediana (IQR)	5.0 (4.0 – 6.0)	5.5 (5.0 – 7.0)	n.s.	5.0 (4.3 – 7.0)	n.s.
- ricovero > 5 gg	35 (39.3)	20 (48.8)	n.s.	9 (45.0)	n.s.

Note: DS = deviazione standard, ev = endovena, gg = giorni, h = ore, IQR = intervallo interquartile, Kg = kilogrammi, n = numero di casi, n.s. = non significativo, O₂ = ossigeno, SatO₂ = saturazione di O₂, sett = settimane, % = frequenza percentuale

Tabella 11B: caratteristiche cliniche e terapeutiche dei pazienti appartenenti all'intero campione, confrontato con i sottogruppi selezionati per le analisi di correlazione tra carica virale del VRS e outcome clinici (“Analisi carica virale”) e per le analisi del microbiota nasofaringeo e intestinale (“Analisi microbiota”).

4.1. Analisi della carica del VRS e correlazione con outcome di severità clinica in corso di bronchiolite acuta

Dai campioni raccolti dai 41 lattanti selezionati per l'analisi sono stati studiati i valori di carica virale ai timepoint di arruolamento (V1), 3° giornata di ricovero (V2) e dimissione (V4). La distribuzione dei valori di carica virale ai vari timepoint collezionati durante l'ospedalizzazione è riassunta in Grafico 4.

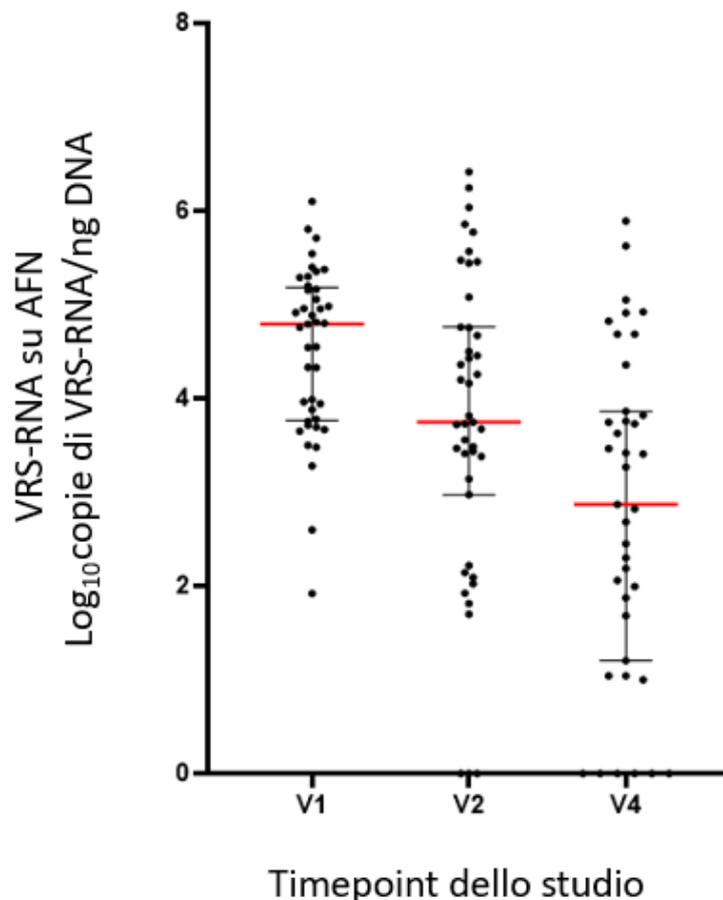


Grafico 4. distribuzione dei valori in scala logaritmica della carica VRS ai vari timepoint dello studio: in rosso la mediana della carica ad ogni timepoint, in nero i relativi quartili (1° e 3°).

Si è proceduto poi a selezionare per ciascun paziente il valore massimo di carica virale raggiunto durante il ricovero a prescindere dal timepoint in cui tale valore è stato raggiunto: questi valori sono stati assemblati all'interno della categoria denominata "picco VRS".

È stata infine valutata, per ciascun paziente, la differenza tra il picco di carica virale raggiunto a prescindere dal timepoint in cui tale valore è stato ottenuto ed il valore della carica di VRS alla dimissione: queste differenze sono state assemblate all'interno della categoria "clearance VRS".

Successivamente è stata effettuata l'analisi di correlazione tra le variabili categoriche di interesse (carica virale al timepoint V1, picco VRS, clearance VRS e carica VRS al timepoint V4) e gli outcome considerati possibile misura della severità clinica. Si è deciso di utilizzare inoltre come outcome di severità clinica non soltanto il ricorso o meno a supporto respiratorio con ossigenoterapia, ma anche la specifica necessità di alti flussi (HFNC), che come tipo di supporto esprime una maggior severità della dinamica respiratoria del paziente ed è rescue therapy per supporto ventilatorio non invasivo. Altri outcome utilizzati sono stati la durata del supporto respiratorio, ad alti o bassi flussi di ossigeno (con stratificazione dei pazienti a seconda di una durata < 48 ore o ≥ 48 ore) e la durata ricovero (per la quale i pazienti sono stati stratificati in ricovero ≤ 5 giorni oppure > 5 giorni). Soltanto per la carica virale all'arruolamento (timepoint V1) è stato preso in considerazione come outcome clinico il valore del Bronchiolitis Clinical Score (registrato soltanto all'ingresso in Reparto e per il quale si è deciso di stratificare i pazienti per valori < 5 punti – score lieve, e ≥ 5 punti – score moderato-severo).

I risultati delle analisi effettuate sono sintetizzati nelle Tabelle 12A e 12B ed i risultati con trend di significatività e con associazioni significative sono illustrati nei Grafici 5 – 7.

	Supporto respiratorio no + NC (n = 37)	Supporto respiratorio HFNC (n = 4)	p-value	Supporto respiratorio ≤ 48 h (n = 8)	Supporto respiratorio > 48 h (n = 16)	p-value
Log ₁₀ carica VRS V1, mediana (IQR)	4.55 (3.76 – 5.16)	5.17 (4.98 – 5.49)	0.09	4.87 (3.59 – 5.06)	4.81 (4.41 – 5.33)	n.s.
Log ₁₀ carica picco VRS, mediana (IQR)	4.82 (3.96 – 5.46)	5.66 (5.23 – 6.08)	0.05	4.87 (4.66 – 5.21)	4.94 (4.41 – 5.48)	n.s.
Log ₁₀ carica clearance VRS (ΔLog ₁₀ carica VRS _{picco-V4}), mediana (IQR)	4.55 (3.71 – 5.34)	5.66 (5.23 – 6.09)	0.03	4.86 (4.64 – 5.05)	4.94 (3.98 – 5.45)	n.s.
Log ₁₀ carica VRS V4, mediana (IQR)	2.82 (1.04 – 3.86)	2.66 (1.84 – 3.08)	n.s.	3.34 (1.76 – 3.50)	2.64 (1.16 – 3.74)	n.s.

Note: h = ore, HFNC = ossigenoterapia ad alti flussi, IQR = intervallo interquartile, Log₁₀ = valore in scala logaritmica, NC = nasocannule (ossigenoterapia a bassi flussi)

Tabella 12A: confronto delle variabili di carica VRS al timepoint V1, picco VRS, clearance VRS e carica VRS al timepoint V4 per gli outcome impiegati come misura di severità clinica (tipologia e durata del supporto respiratorio). Relativamente a questi outcome clinici le analisi sono state condotte per tutte le variabili di carica VRS considerate.

	Bronchiolitis Clinical Score < 5 giorni (n = 28)	Bronchiolitis Clinical Score ≥ 5 giorni (n = 13)	p-value	Durata ricovero ≤ 5 giorni (n = 21)	Durata ricovero > 5 giorni (n = 20)	p-value
Log ₁₀ carica VRS V1, mediana (IQR)	4.85 (3.98 – 5.22)	3.94 (3.71 – 4.95)	n.s.	4.94 (3.89 – 5.17)	4.55 (3.78 – 5.06)	n.s.
Log ₁₀ carica picco VRS, mediana (IQR)	/	/	/	5.0 (3.88 – 5.41)	4.76 (3.65 – 5.38)	n.s.
Log ₁₀ carica clearance VRS (ΔLog ₁₀ carica VRS _{picco-V4}), mediana (IQR)	/	/	/	1.0 (0.47 – 1.58)	1.52 (0.86 – 2.31)	n.s.
Log ₁₀ carica VRS V4, mediana (IQR)	/	/	/	3.55 (1.80 – 4.44)	2.30 (1.04 – 3.27)	n.s.

Note: IQR = intervallo interquartile, Log₁₀ = valore in scala logaritmica

Tabella 12B: confronto delle variabili di carica VRS al timepoint V1, picco VRS, clearance VRS e carica VRS al timepoint V4 per gli outcome impiegati come misura di severità clinica (valore di Bronchiolitis Clinical Score, durata del ricovero). Relativamente a questi outcome clinici le analisi sono state condotte solo per alcune variabili logicamente correlabili agli eventi di interesse clinico.

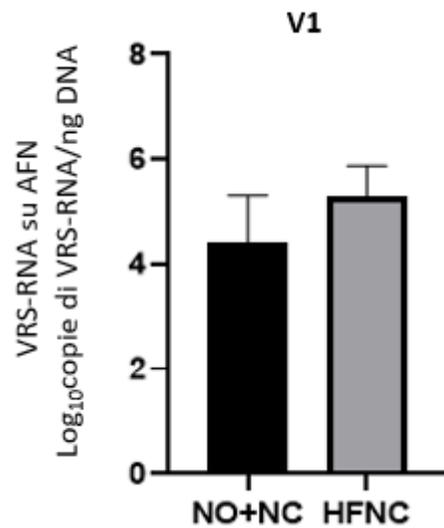


Grafico 5: confronto tra i valori di carica virale al timepoint V1 (ingresso in Reparto) tra i pazienti non sottoposti a supporto respiratorio o sottoposti ad ossigenoterapia a bassi flussi confrontati con pazienti sottoposti a HFNC.

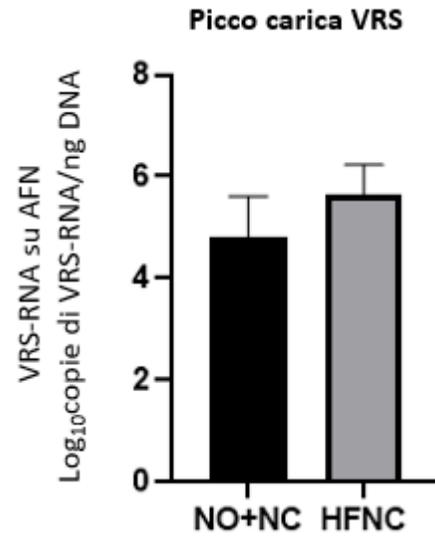


Grafico 6: confronto tra i valori di picco di carica virale tra i pazienti non sottoposti a supporto respiratorio o sottoposti ad ossigenoterapia a bassi flussi confrontati con pazienti sottoposti a HFNC.

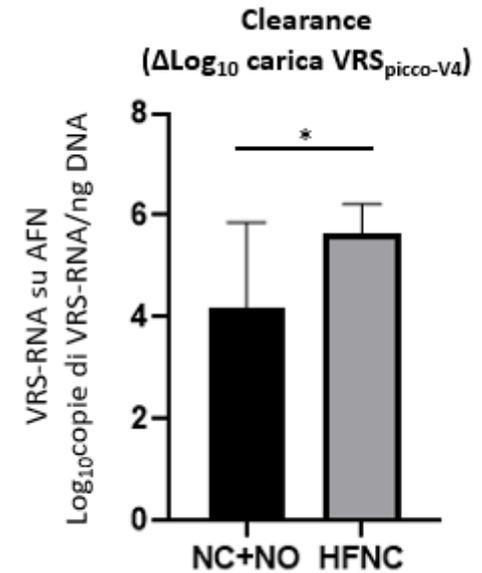


Grafico 7: confronto tra i valori di clearance virale tra i pazienti non sottoposti a supporto respiratorio o sottoposti ad ossigenoterapia a bassi flussi confrontati con pazienti sottoposti a HFNC. * p = 0.03

4.2. Analisi della composizione del microbiota nasofaringeo, salivare ed intestinale durante bronchiolite acuta e follow-up a breve termine

Per il campione di 20 lattanti selezionato per lo studio del microbiota al termine del Dottorato di ricerca è stato finora possibile effettuare analisi sui campioni biologici prelevati all'arruolamento (timepoint V1), alla dimissione dal Reparto (timepoint V4), al controllo di follow-up a 6 mesi dalla dimissione (timepoint V7). Il campione di studio è stato inoltre finora stratificato in 2 sottogruppi, basandosi sul punteggio del Bronchiolitis Clinical Score rilevato all'arruolamento (timepoint V1): sono stati identificati 7 pazienti con score < 5 punti (lieve) e 13 con score \geq 5 punti (moderato-severo). In generale, per ciascuna tipologia di microbiota analizzata (faringonasale, salivare, intestinale) è stata condotta analisi di confronto tra i vari gruppi (timepoint, score clinico) con test di Kruskal-Wallis e, laddove individuate delle differenze significative, sono poi state condotte le analisi all'interno dei vari sottogruppi con test di Wilcoxon.

In primo luogo sono state condotte analisi a carico dell'aspirato faringonasale (analisi dell' α -diversity, Grafico 8A, e analisi del quantitativo di specie batteriche, Grafico 8B).

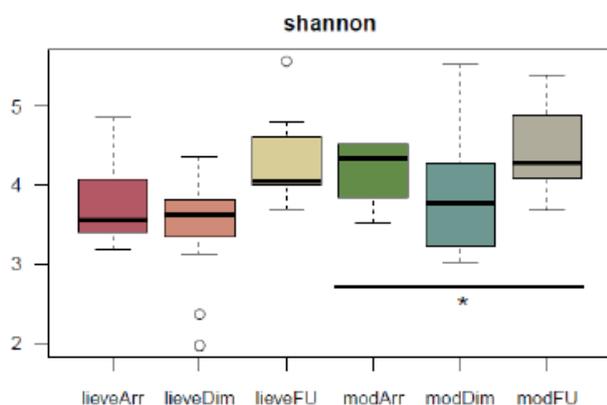


Grafico 8A: analisi dell' α -diversity nei campioni di AFN valutata mediante Shannon index. Test di Kruskal-Wallis positivo per differenze tra gruppi ($p = 0.005$).

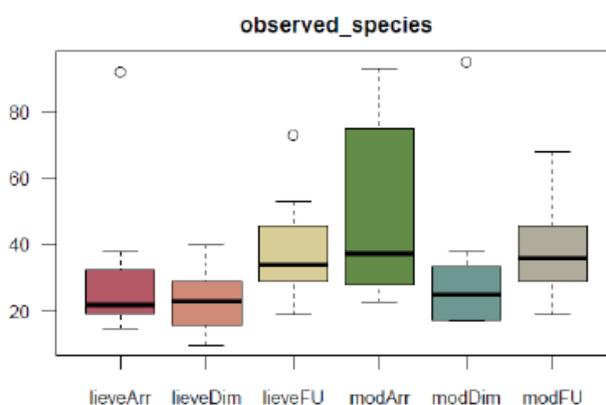


Grafico 8B: analisi del quantitativo di specie batteriche nei campioni di AFN. Test di Kruskal-Wallis positivo per differenze tra gruppi ($p = 0.02$). Presenti inoltre tendenza alla significatività per maggior presenza di specie batteriche al follow-up a 6 mesi rispetto alla dimissione tra i pazienti con score clinico lieve e all'arruolamento rispetto al follow-up a 6 mesi tra i pazienti con score clinico moderato.

I Grafici 9A e 9B riassumono inoltre l'analisi della β -diversity (con metodica Unweighted UniFrac, che tiene conto solo del numero di microrganismi rilevati, e con metodica Weighted UniFrac, che tiene conto anche dell'abbondanza dei vari microrganismi).

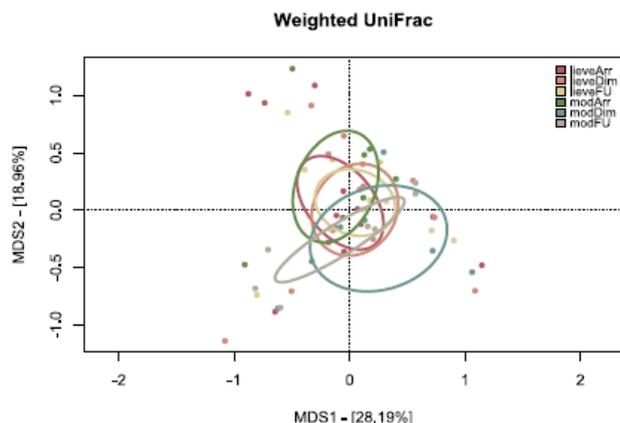


Grafico 9A: analisi Weighted UniFrac della β -diversity ai vari timepoint in entrambi i sottogruppi (nessuna differenza significativa).

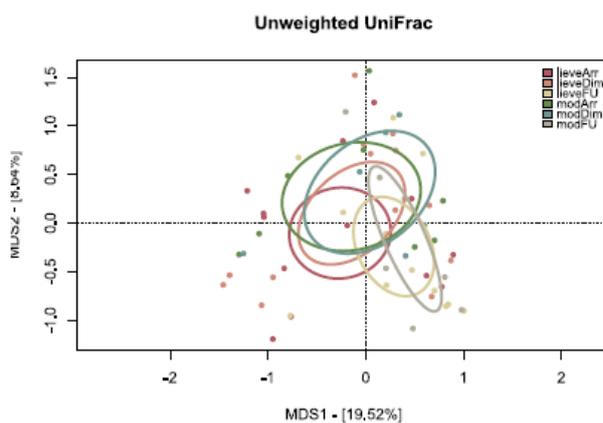


Grafico 9B: analisi Unweighted UniFrac della β -diversity (nei pazienti con score clinico lieve differenza significativa al timepoint arruolamento vs follow-up 6 mesi, $p = 0.01$; tendenza alla significatività per differenze tra timepoint dimissione e follow-up 6 mesi).

E' stata poi eseguita l'analisi dei differenti phyla batterici riscontrati (Grafico 10) e successivamente delle famiglie batteriche (Grafico 11A), con focus sulla famiglia delle Aerococcaceae, unica famiglia risultata significativamente più presente nei campioni raccolti al follow-up a 6 mesi dalla dimissione (Grafico 11B).

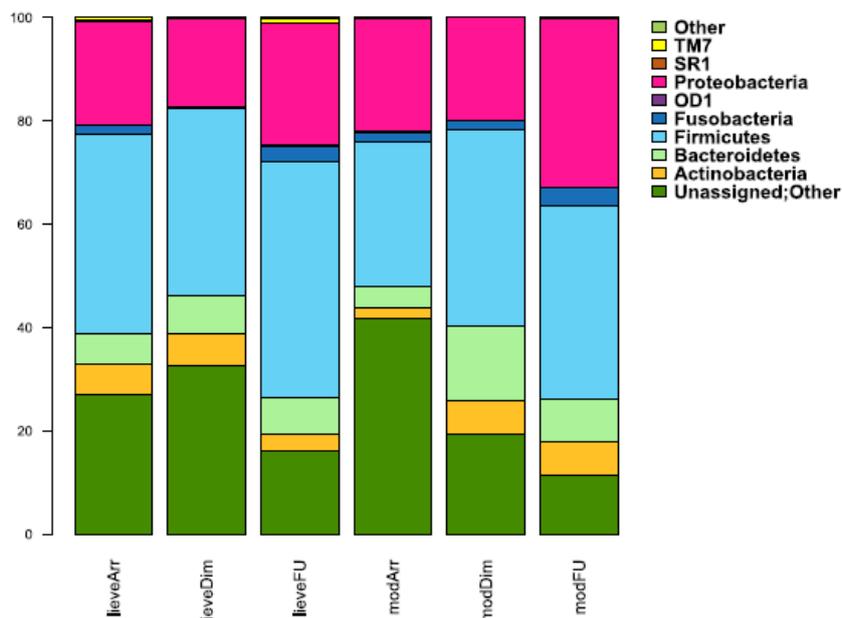


Grafico 10: distribuzione dei differenti phyla all'analisi dedicata, senza riscontro di differenze significative né tra categorie di pazienti, né tra i vari timepoint di collezione dei campioni di AFN.

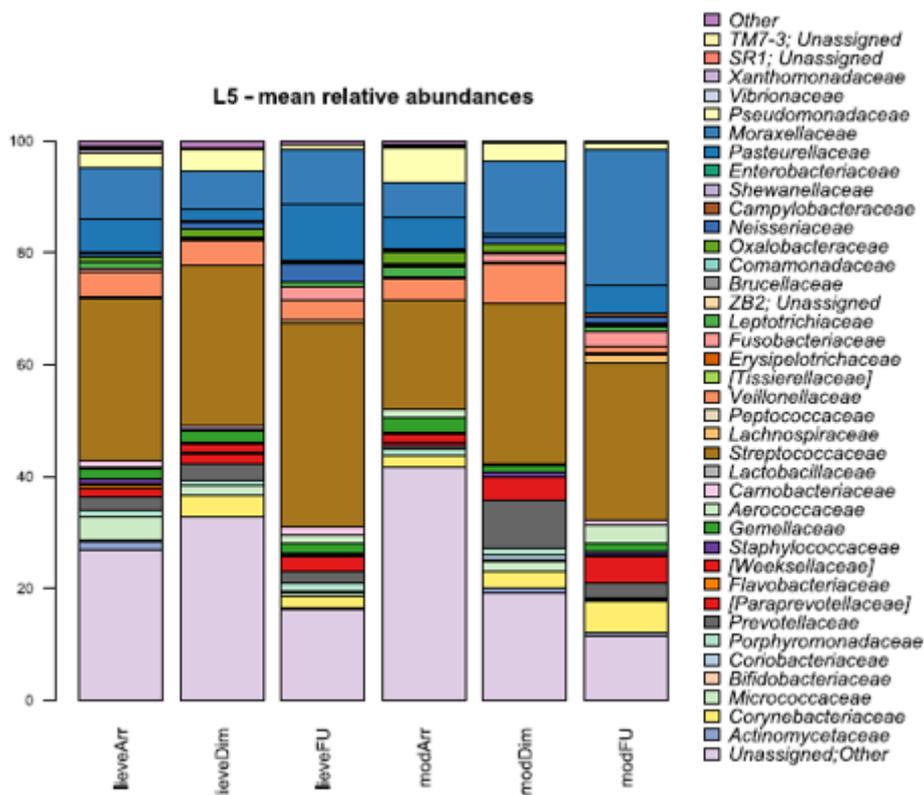


Grafico 11A: distribuzione delle diverse famiglie batteriche all'analisi dedicata, senza riscontro di differenze significative né tra categorie di pazienti, né tra i vari timepoint di collezione dei campioni di AFN.

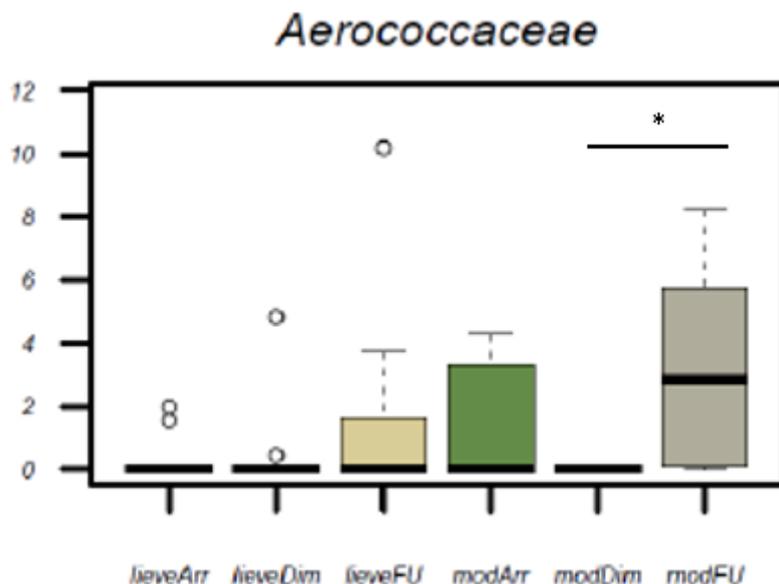


Grafico 11B: analisi della presenza della famiglia delle Aerococcaceae, con presenza maggiore ai campioni raccolti al follow-up a 6 mesi dalla dimissione rispetto al timepoint dimissione, con differenza significativa tra i pazienti con score moderato (* p = 0.02).

E' stata infine condotta l'analisi dei genera batterici riscontrati all'AFN, in primis *Alloiococcus* (Grafico 12A) e *Leptotrichia* (Grafico 12B).

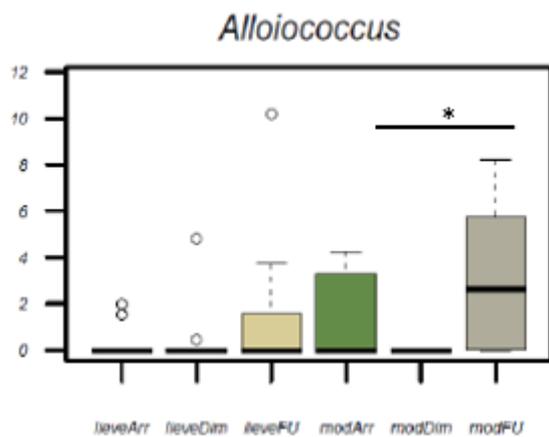


Grafico 12A: distribuzione del genus *Alloiococcus* (test di Kruskal-Wallis con $p = 0.035$), in particolare maggior presenza a 6 mesi dalla dimissione rispetto alla dimissione nei pazienti con score clinico moderato (* $p = 0.02$).

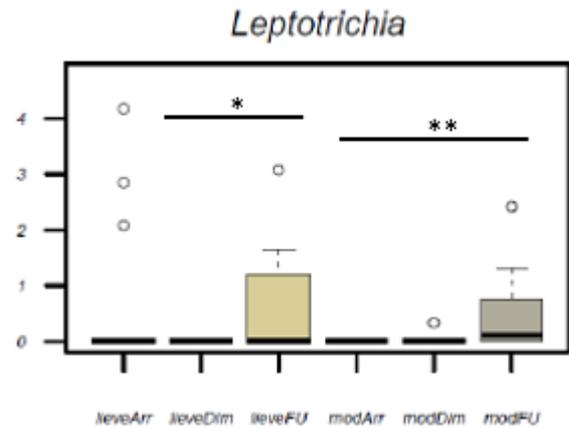


Grafico 12B: distribuzione del genus *Leptotrichia* (test di Kruskal-Wallis con $p = 0.03$), in particolare significativa maggior presenza al follow-up a 6 mesi rispetto alla dimissione nei pazienti con score lieve (* $p = 0.01$) e rispetto all'arruolamento nei pazienti con score moderato (** $p = 0.02$).

Particolare attenzione è stata posta ai genera che in letteratura presentano associazioni con outcome clinici a breve o a lungo termine in merito alla bronchiolite: *Haemophilus*, *Moraxella*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* e *Veilonella* (Grafici 13A – 13E).

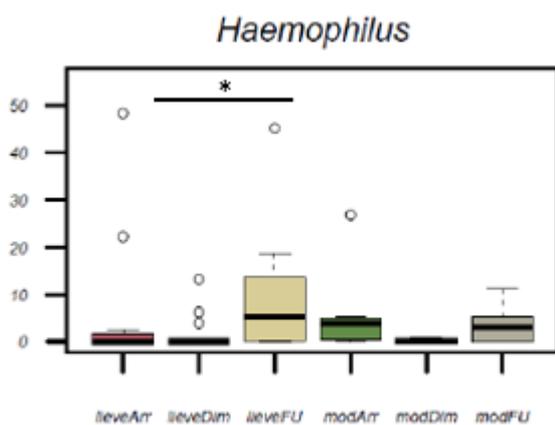


Grafico 13A: Distribuzione del genus *Haemophilus*, significativamente maggiore a 6 mesi rispetto alla dimissione tra i pazienti con score clinico lieve (* $p = 0.03$), presenza maggiore con tendenza a significatività all'arruolamento rispetto alla dimissione nei pazienti con score moderato.

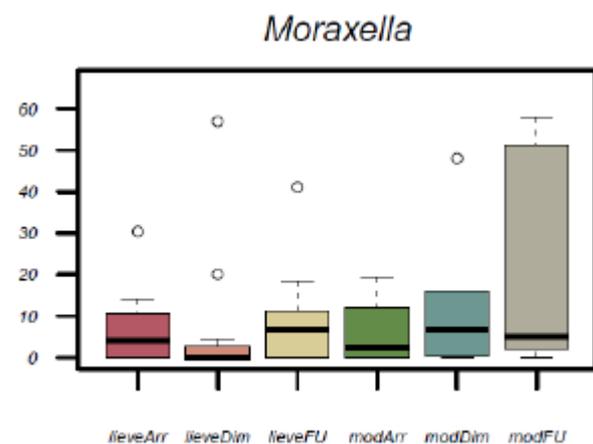


Grafico 13B: Distribuzione del genus *Moraxella*, per il quale si è osservata tendenza alla significatività per presenza maggiore alla dimissione tra i pazienti con score clinico moderato rispetto a score clinico lieve.

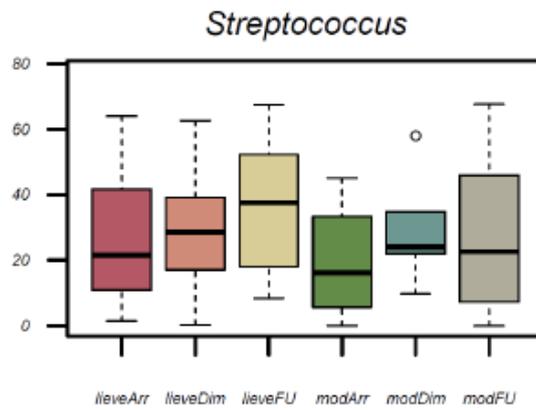


Grafico 13C: Distribuzione del genus Streptococcus (nessuna associazione significativa).

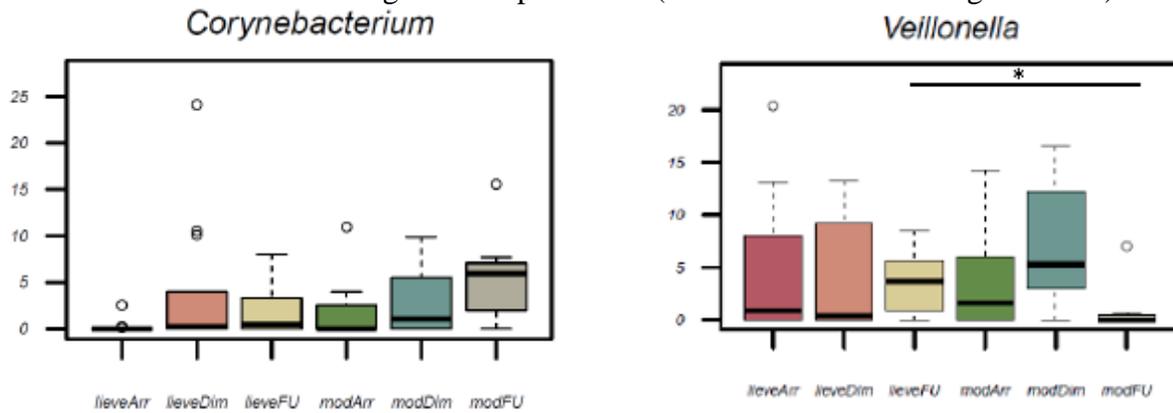


Grafico 13D: Distribuzione del genus Corynebacterium, con tendenza alla significatività per maggiore presenza alla dimissione, ma anche al follow-up a 6 mesi, rispetto all'arruolamento nei pazienti con score clinico lieve.

Grafico 13E: Distribuzione del genus Veillonella, con presenza significativamente maggiore a 6 mesi tra i pazienti con score clinico lieve rispetto a score moderato (* $p = 0.04$); presenza maggiore tendente alla significatività alla dimissione dei pazienti con score moderato rispetto a score lieve.

Analoghe analisi sono state condotte per quanto riguarda lo studio del microbiota intestinale da campioni fecali.

In primo luogo sono stati effettuati lo studio dell' α -diversity (Grafico 14A) e l'analisi quantitativa delle specie osservate (Grafico 14B).

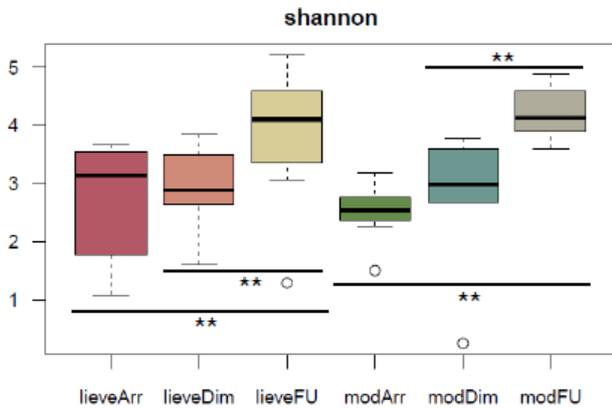


Grafico 14A: analisi dell' α -diversity del microbiota intestinale (test di Kruskal-Wallis con $p = 1e-04$) e trend di recupero della diversità dell'ecosistema nel tempo.

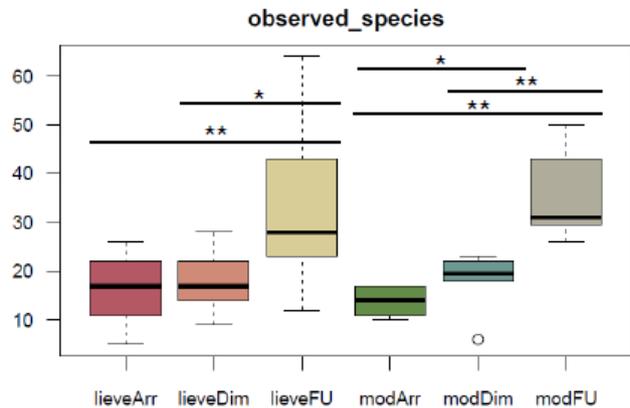


Grafico 14B: analisi quantitativa delle specie presenti nel microbiota intestinale dei soggetti studiati (test di Kruskal-Wallis con $p = 4e-05$) e trend di incremento ai timepoint finali rispetto ai precedenti in entrambi i sottogruppi.

E' stata poi effettuata l'analisi della β -diversity, sia con metodica Unweighted UniFrac (Grafico 15A) che con metodica Weighted UniFrac (Grafico 15B).

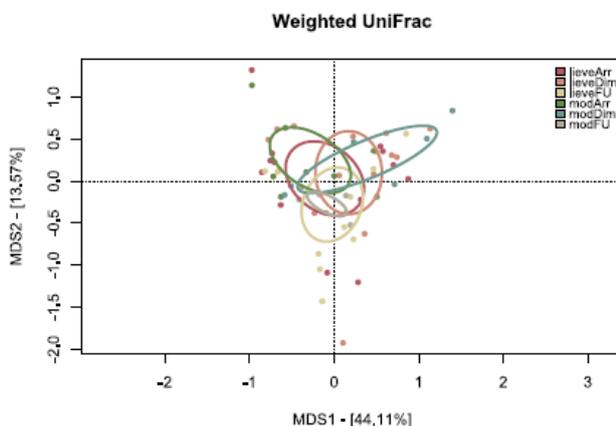


Grafico 15A: analisi della β -diversity del microbiota intestinale con metodica Weighted UniFrac, con differenza con tendenza alla significatività tra follow-up a 6 mesi e dimissione per i pazienti con score moderato-severo ($p = 0.05$).

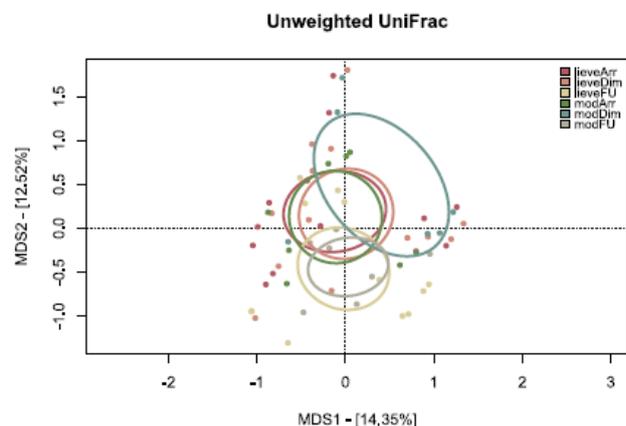


Grafico 15B: analisi della β -diversity del microbiota intestinale con metodica Unweighted UniFrac, con differenze nei pazienti con score moderato-severo, con tendenza alla significatività tra il timepoint follow-up 6 mesi e dimissione ($p = 0.05$), significativa invece la differenza tra follow-up 6 mesi e arruolamento ($p = 0.02$).

All'analisi dei phyla batterici (Grafico 16A) non si sono osservate differenze significative tra i gruppi, mentre all'interno del gruppo di pazienti con score clinico moderato è emersa la tendenza ad una maggior presenza di Firmicutes al follow-up a 6 mesi rispetto alla dimissione (Grafico 16B).

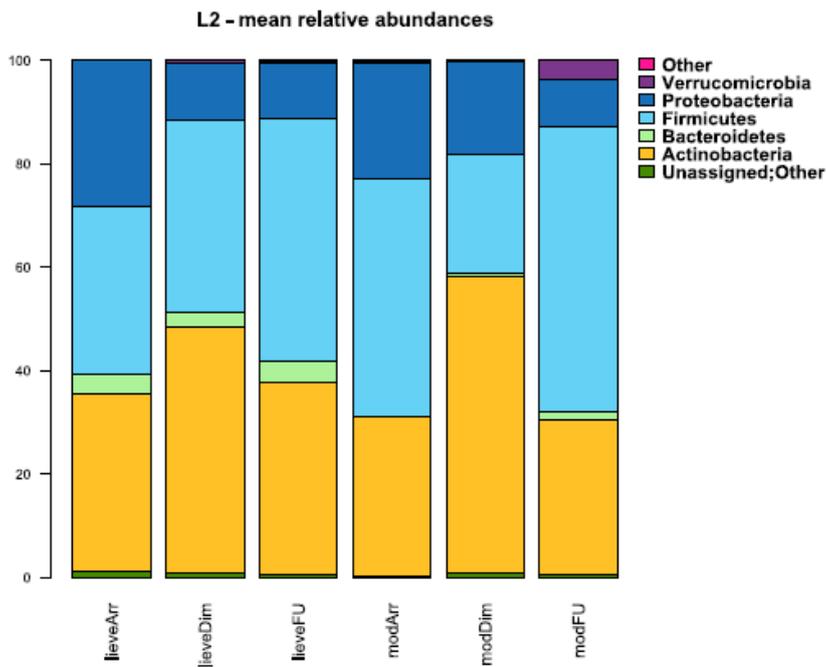


Grafico 16A: distribuzione dei phyla batterici nel microbiota intestinale analizzato.

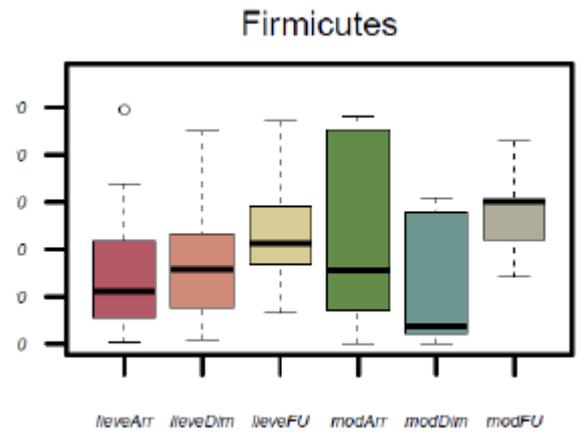


Grafico 16B: analisi del phylum dei Firmicutes, con tendenza a maggior presenza al follow-up a 6 mesi rispetto alla dimissione.

E' stata poi condotta l'analisi delle diverse famiglie batteriche rilevate sui campioni fecali (Grafico 17).

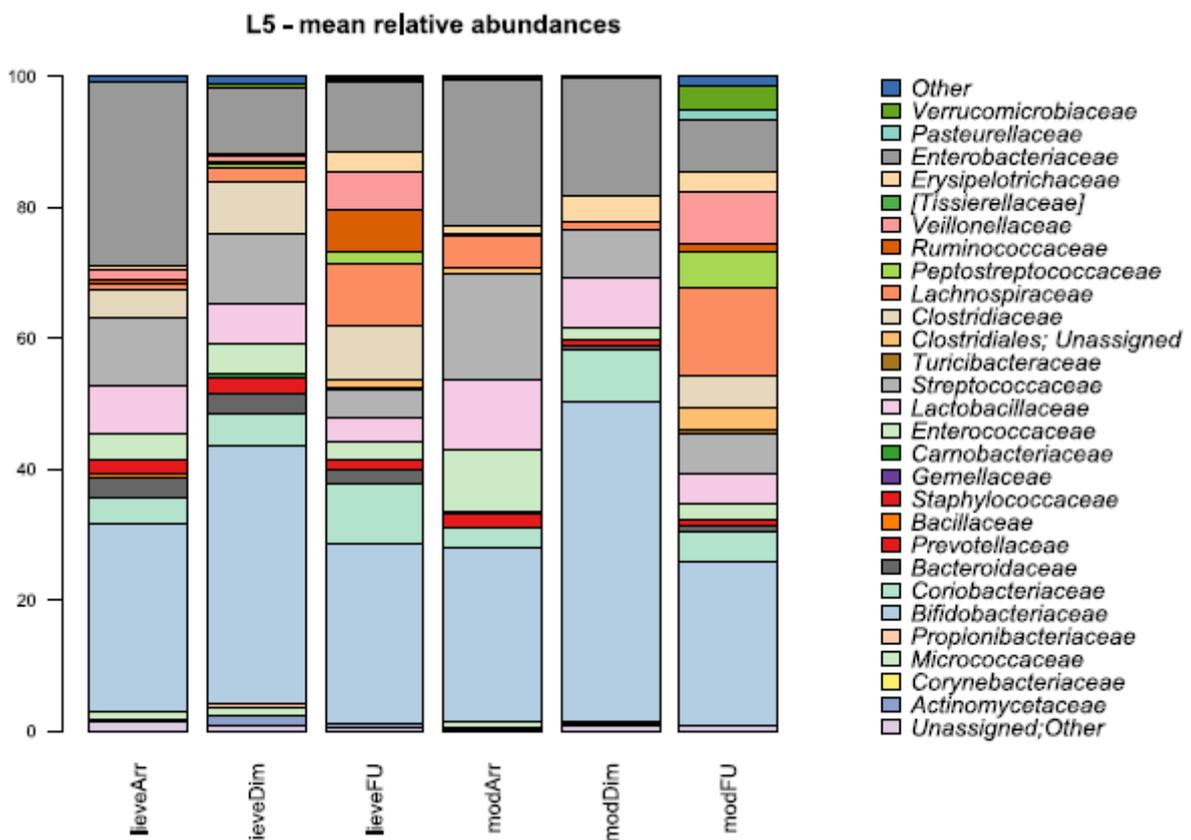


Grafico 17: distribuzione delle famiglie batteriche tra gruppi e differenti timepoint.

E' stata poi analizzata nello specifico la distribuzione nei differenti timepoint degli ordini e delle famiglie batteriche riscontrate sui campioni e di seguito sono riportate quelle da cui sono emerse differenze significative di distribuzione: ordine dei Clostridiales (Grafico 18°), famiglia delle Clostridiaceae (Grafico 18B), famiglia delle Peptostreptococcaceae (Grafico 18C), famiglia delle Staphylococcaceae (Grafico 18D), famiglia delle Ruminococcaceae (Grafico 18E), famiglia delle Veillonellaceae (Grafico 18F), famiglia delle Coriobacteriaceae (Grafico 18G), famiglia delle Enterobacteriaceae (Grafico 18H).

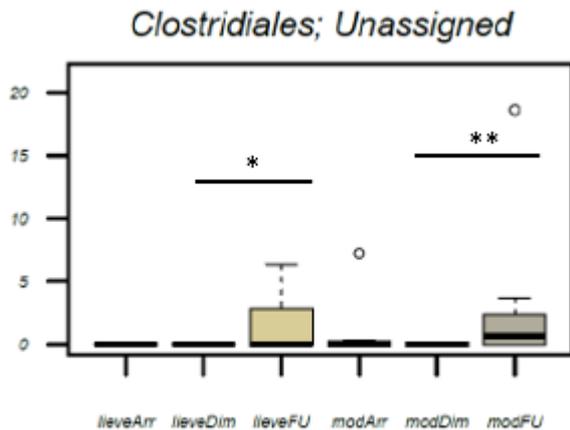


Grafico 18A: distribuzione dell'ordine dei Clostridiales, con significative differenze di distribuzione tra gruppi (test di Kruskal-Wallis con $p = 0.002$) e maggiore presenza al follow-up a 6 mesi rispetto alla dimissione in entrambi i gruppi di pazienti (rispettivamente * $p = 0.01$ nello score clinico lieve, ** $p = 0.04$ nel moderato).

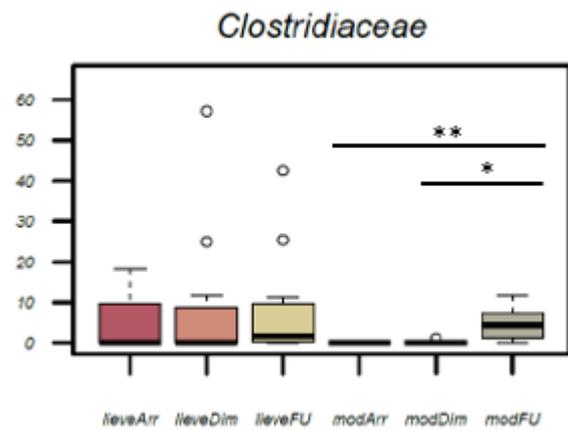


Grafico 18B: distribuzione famiglia delle Clostridiaceae, con differenze tra i vari gruppi e timepoint (test di Kruskal-Wallis con $p = 0.008$); in particolare, all'interno del gruppo score moderato, presenza significativamente maggiore di questa famiglia al follow-up a 6 mesi rispetto alla dimissione (* $p = 0.01$) e all'arruolamento (** $p = 0.02$).

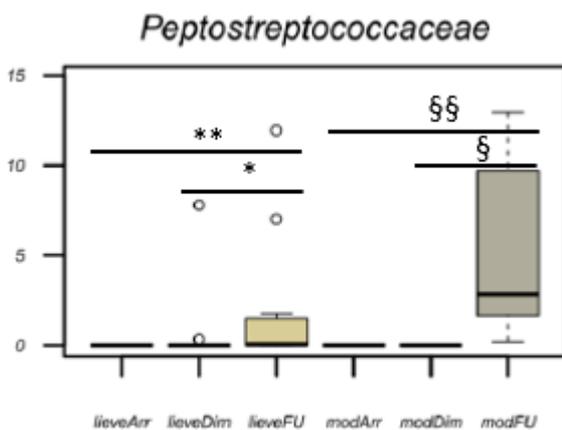


Grafico 18C: distribuzione della famiglia delle Peptostreptococcaceae, con significative differenze tra i vari gruppi e timepoint (test di Kruskal-Wallis con $p = 2.2e-06$), nonché valori significativamente maggiori a 6 mesi rispetto ai precedenti timepoint in entrambi i gruppi di pazienti (per tutti i confronti $p < 0.05$).

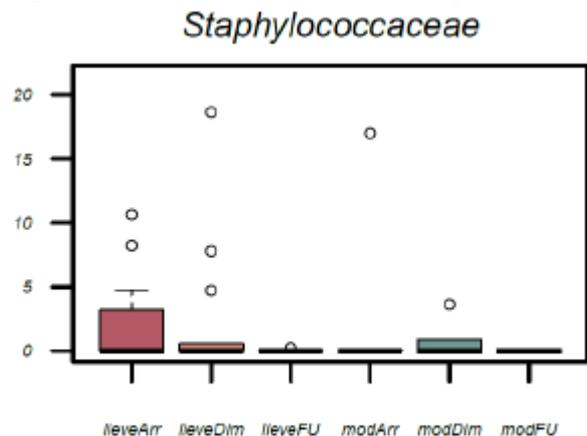


Grafico 18D: distribuzione della famiglia delle Staphylococcaceae, con tendenza a presenza maggiore al timepoint arruolamento e dimissione rispetto al follow-up 6 mesi nel gruppo score lieve.

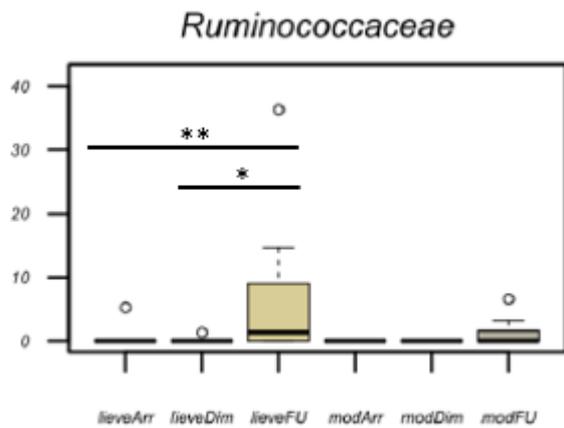


Grafico 18E: analisi della famiglia delle Ruminococcaceae, con differenze significative tra i vari gruppi e timepoint (test di Kruskal-Wallis con $p = 0.009$), nonché una presenza maggiore al follow-up a 6 mesi rispetto alla dimissione (* $p = 0.01$) e all'arruolamento (** $p = 0.02$) per quanto riguarda il gruppo di pazienti con score clinico lieve.

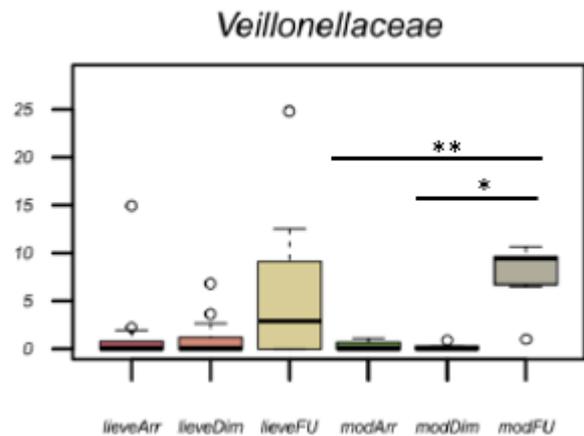


Grafico 18F: analisi della famiglia delle Veillonellaceae, con differenze significative tra i vari gruppi e timepoint (test di Kruskal-Wallis con $p = 0.003$) e, all'interno del gruppo score moderato, una maggior presenza al timepoint follow-up 6 mesi rispetto alla dimissione e all'arruolamento (rispettivamente * $p = 0.003$ e ** $p = 0.002$).

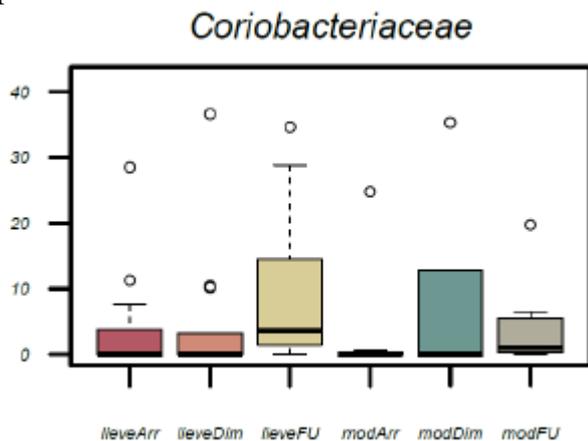


Grafico 18G: analisi della famiglia delle Coriobacteriaceae, senza differenze significative tra gruppi, soltanto con tendenza a valori maggiori a 6 mesi rispetto all'arruolamento per i pazienti con score lieve.

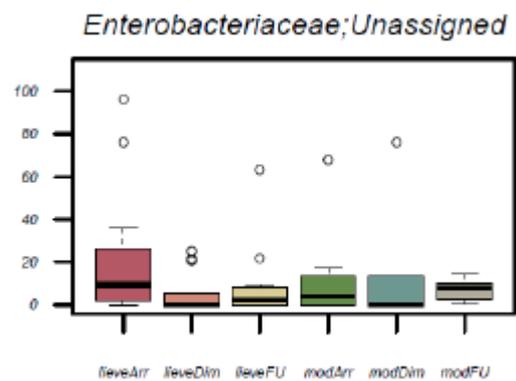


Grafico 18H: analisi della famiglia delle Enterobacteriaceae, senza differenze significative tra i due gruppi di pazienti, con tendenza quasi significativa di maggior presenza all'arruolamento rispetto alla dimissione tra i pazienti con score clinico lieve ($p = 0.05$).

All'analisi dei generi batterici, per quanto riguarda quelli appartenenti al phylum dei Firmicutes, sono emersi risultati a carico di Blautia e Ruminococcus (entrambi generi della famiglia delle Lachnospiraceae), Veillonella, Faecalibacterium, Eubacterium ed Haemophilus (Grafici 19A – 19G)

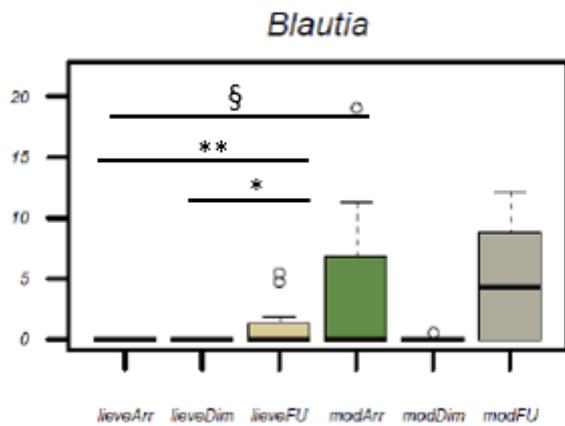


Grafico 19A: analisi del genus *Blautia*, con differenze significative tra i vari gruppi (test di Kruskal-Wallis con $p = 0.007$), in particolare al timepoint arruolamento (maggiore presenza nei pazienti con score moderato-severo rispetto a lieve, § $p = 0.02$), nonché valori maggiori al follow-up a 6 mesi rispetto alla dimissione e all'arruolamento nei pazienti con score lieve (* $p = 0.03$ e ** $p = 0.03$).

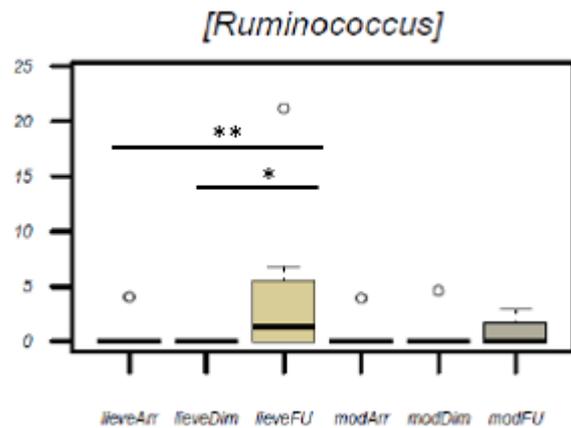


Grafico 19B: analisi del genus *Ruminococcus*, con differenze significative tra i vari gruppi e timepoint (test di Kruskal-Wallis con $p = 0.001$), nonché maggiore presenza al follow-up a 6 mesi rispetto a dimissione e arruolamento sempre nei pazienti con score clinico lieve (* $p = 0.001$ e ** $p = 0.003$).

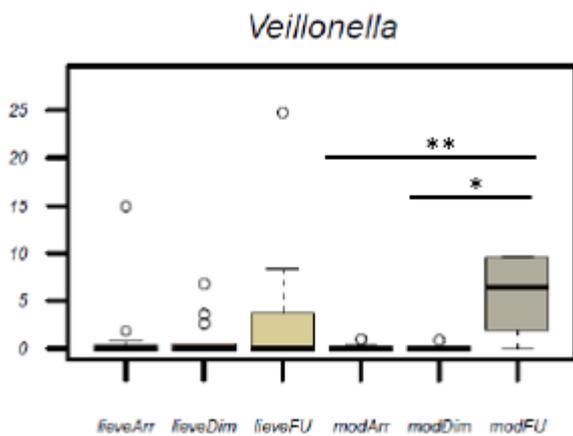


Grafico 19C: analisi del genus *Veillonella*, con differenze tra gruppi (test di Kruskal-Wallis con $p = 0.026$) e, tra i pazienti con score moderato-severo, una presenza maggiore al follow-up a 6 mesi rispetto alla dimissione (* $p = 0.01$) e all'arruolamento (* $p = 0.007$).

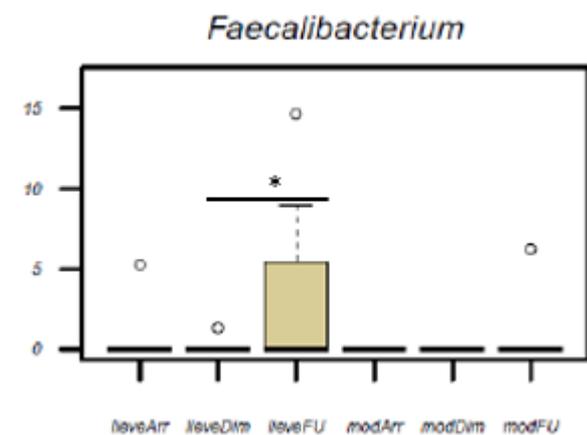


Grafico 19D: analisi genus *Faecalibacterium*, con differenze tra gruppi (test di Kruskal-Wallis con $p = 0.042$) e, tra i pazienti con score lieve, valori maggiori a 6 mesi rispetto alla dimissione (* $p = 0.04$) e arruolamento (ai limiti della significatività, $p = 0.05$).

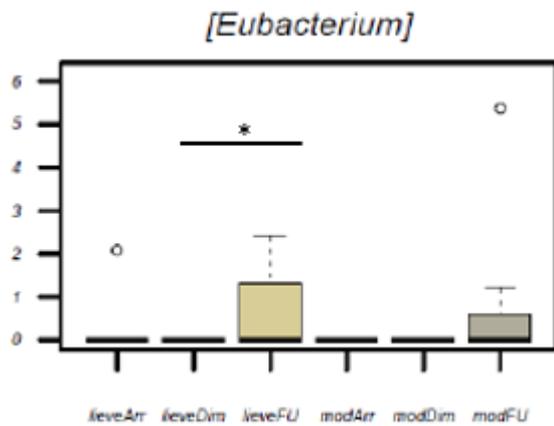


Grafico 19E: analisi del genus Eubacterium, con differenze significative tra i gruppi e timepoint (test di Kruskal-Wallis con $p = 0.019$) e, all'interno del gruppo score moderato, valori maggiori al follow-up a 6 mesi rispetto alla dimissione (* $p = 0.01$) e all'arruolamento (tendenza alla significatività).

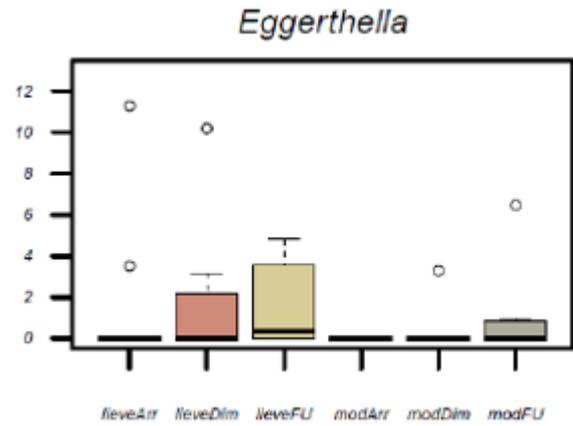


Grafico 19F: analisi del genus Eggerthella, senza differenze significative tra i gruppi in generale, mentre tra i pazienti con score moderato si è osservato un aumento ai limiti della significatività al follow-up a 6 mesi rispetto all'arruolamento ($p = 0.05$).

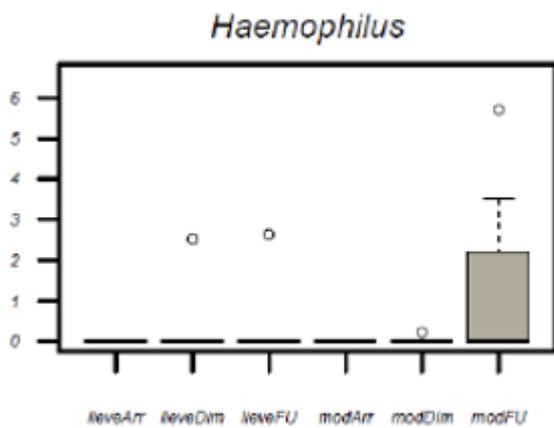


Grafico 19G: analisi del genus Haemophilus, con test di Kruskal-Wallis tra gruppi ai limiti della significatività ($p = 0.05$), principalmente a causa degli elevati valori riscontrati nei pazienti con score moderato al follow-up a 6 mesi rispetto ai precedenti timepoint (tendenza alla significatività con $p = 0.05$).

Nel nostro studio infine è stata effettuata, per la prima volta per quanto a nostra conoscenza in letteratura, l'analisi del microbiota ottenuto da tamponi salivari.

Sono stati innanzitutto effettuati lo studio dell' α -diversity (Grafico 20A) e l'analisi quantitativa delle specie osservate (Grafico 20B).

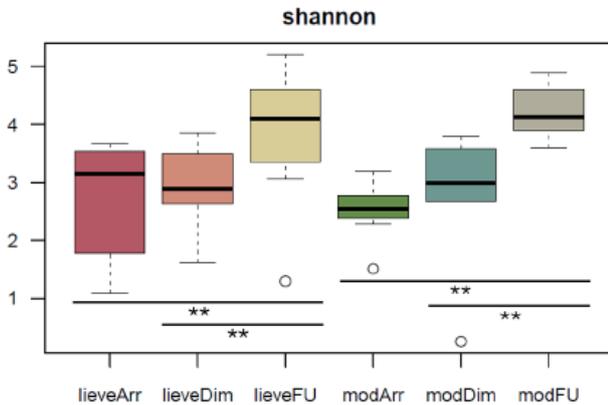


Grafico 20A: analisi dell' α -diversity del microbiota salivare con differenze tra i vari gruppi e timepoint (test di Kruskal-Wallis con $p = 1e-04$) e trend di recupero della diversità dell'ecosistema nel tempo, con valori maggiori a 6 mesi rispetto ai precedenti timepoint in entrambi i gruppi.

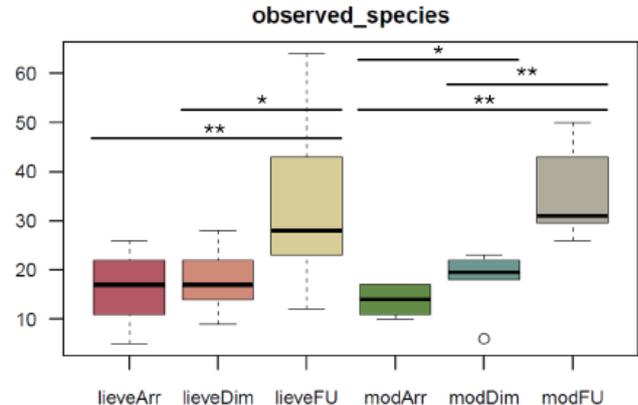


Grafico 20B: analisi quantitativa delle specie presenti nel microbiota salivare dei soggetti studiati, con differenze tra i vari gruppi e timepoint anche all'analisi quantitativa delle specie osservate (test di Kruskal-Wallis con $p = 4e-05$) e trend di incremento ai timepoint finali rispetto ai precedenti in ambo i gruppi.

E' stata poi effettuata l'analisi della β -diversity, sia con metodica Unweighted UniFrac, con metodica Weighted UniFrac (Grafici 21A e 21B).

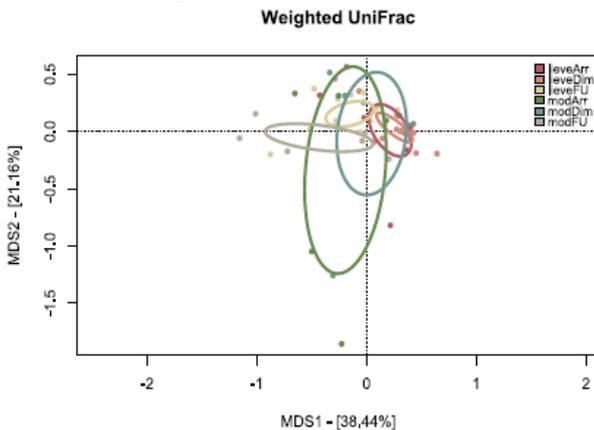


Grafico 21A: analisi della β -diversity alla metodica Weighted UniFrac, con differenze significative al raffronto tra i timepoint dei pazienti con score lieve (follow-up 6 mesi in confronto a dimissione e arruolamento rispettivamente con $p = 0.01$ e $p = 0.04$).

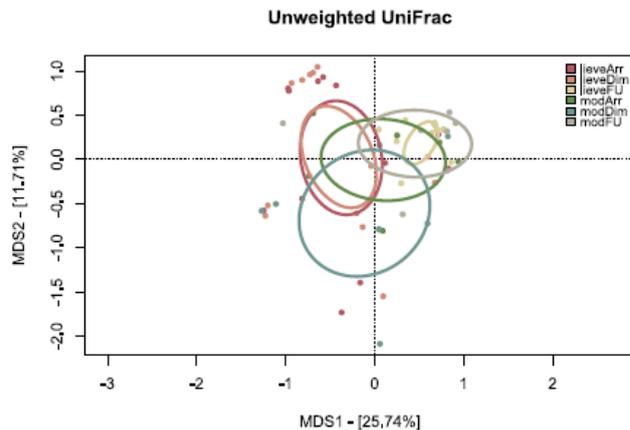


Grafico 21B: analisi della β -diversity alla metodica Unweighted UniFrac, con differenze significative al raffronto tra i timepoint dei pazienti con score lieve (follow-up 6 mesi in confronto a dimissione e arruolamento rispettivamente con $p = 3e-04$ e $p = 4e-04$).

All'analisi dei phyla batterici sono emerse differenze significative a carico dei Firmicutes (Grafico 22A), Bacteroidetes (Grafico 22B), Fusobacteria (Grafico 22C) e Proteobacteria (Grafico 22D).

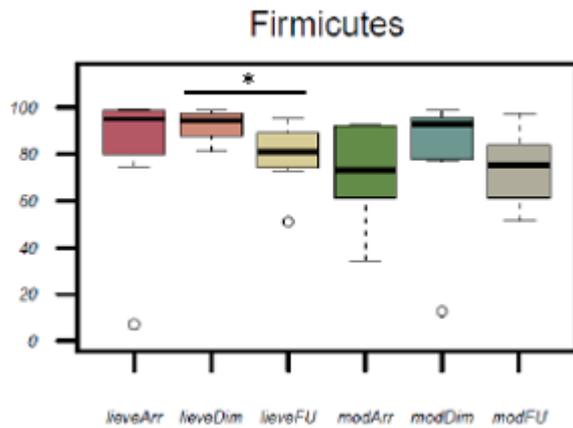


Grafico 22A: analisi del phylum dei Firmicutes, con differenze tra i vari gruppi (test di Kruskal-Wallis con $p = 0.014$), in particolare in particolare al timepoint arruolamento tra i due gruppi di pazienti (tendenza alla significatività, $p = 0.05$) e alla dimissione rispetto al follow-up nei pazienti con score lieve (* $p = 0.005$).

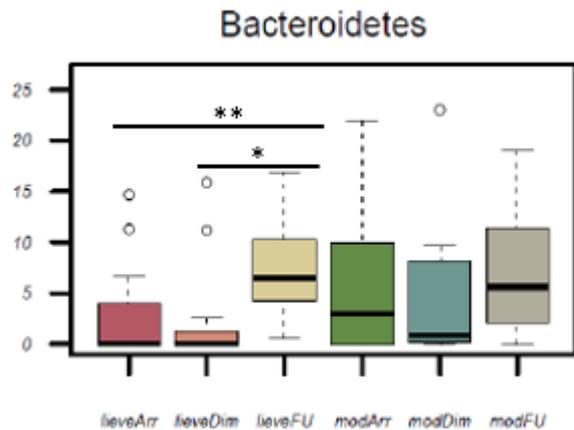


Grafico 22B: analisi del phylum dei Bacteroidetes, con differenze significative tra i vari gruppi e timepoint (test di Kruskal-Wallis con $p = 0.028$), nonché maggior presenza a 6 mesi rispetto alla dimissione (* $p = 0.003$) e all'arruolamento (** $p = 0.01$) nei pazienti con score clinico lieve.

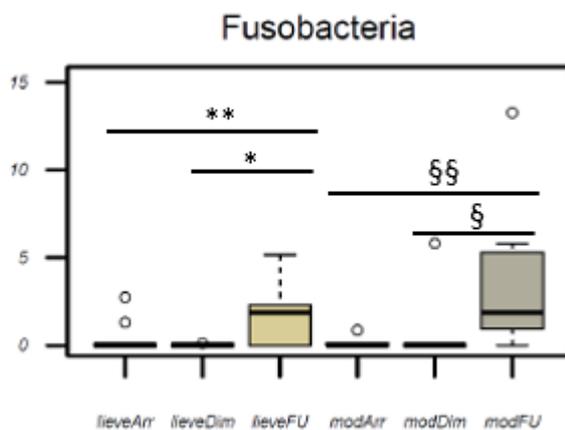


Grafico 22C: analisi del phylum dei Fusobacteria, con differenze tra i vari gruppi (test di Kruskal-Wallis con $p = 4e-04$) e maggior presenza a 6 mesi rispetto a dimissione (rispettivamente * $p = 0.001$ e § $p = 0.03$) e arruolamento (rispettivamente ** $p = 0.01$ e §§ $p = 0.02$) nei pazienti con score lieve e moderato.

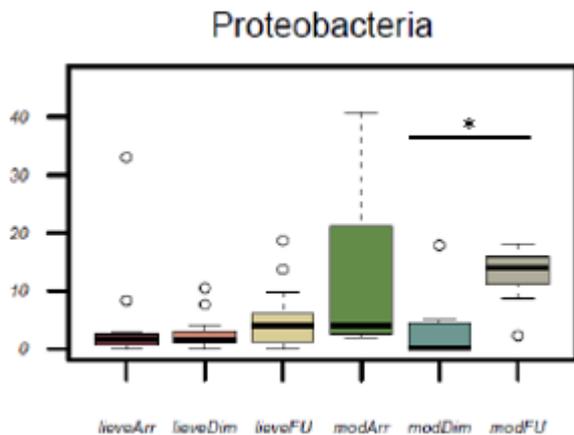


Grafico 22D: analisi del phylum dei Proteobacteria, con differenze significative tra i vari gruppi e timepoint (test di Kruskal-Wallis con $p = 0.013$), nonché maggior presenza a 6 mesi rispetto alla dimissione nel gruppo score moderato-severo (* $p = 0.04$).

All'analisi delle famiglie batteriche sono emersi risultati significativi a carico di Actinomycetaceae, Carnobacteriaceae, Streptococcaceae, Fusobacteriaceae, Leptotrichiaceae, Neisseriaceae, Paraprevotellaceae e Pasteurellaceae (Grafici 23A – 23H).

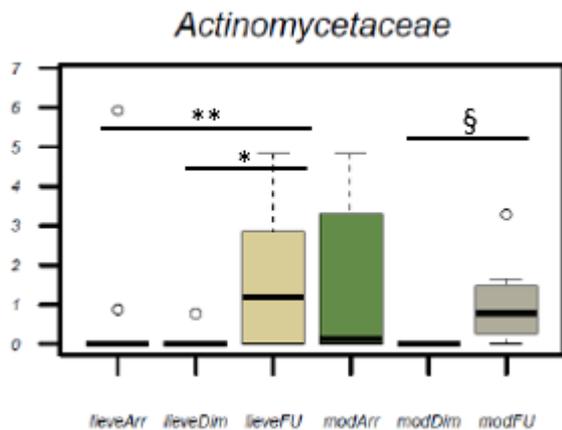


Grafico 23A: analisi delle Actinomycetaceae, con differenze tra gruppi (test di Kruskal-Wallis con $p = 0.002$). Nei pazienti con score lieve presenza maggiore a 6 mesi rispetto ai precedenti timepoint (* $p = 0.001$, ** $p = 0.02$), nei pazienti con score moderato-severo presenza maggiore a 6 mesi rispetto alla dimissione (§ $p = 0.01$).

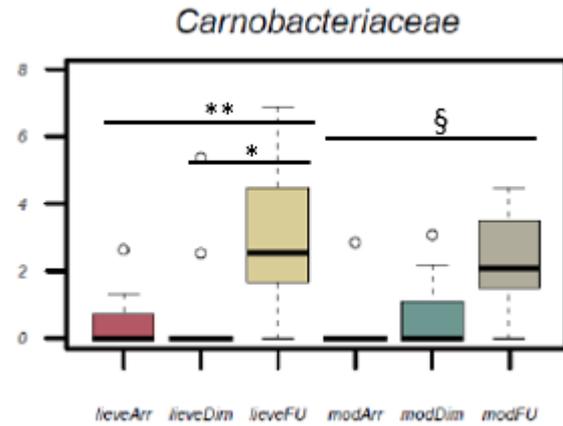


Grafico 23B: analisi delle Carnobacteriaceae, con differenze tra gruppi (test di Kruskal-Wallis con $p = 3.2e-04$). Nei pazienti con score lieve presenza maggiore a 6 mesi rispetto ai precedenti campioni (* $p = 0.001$, ** $p = 6e-04$), nei pazienti con score moderato-severo presenza maggiore a 6 mesi rispetto all'arruolamento (§ $p = 0.03$).

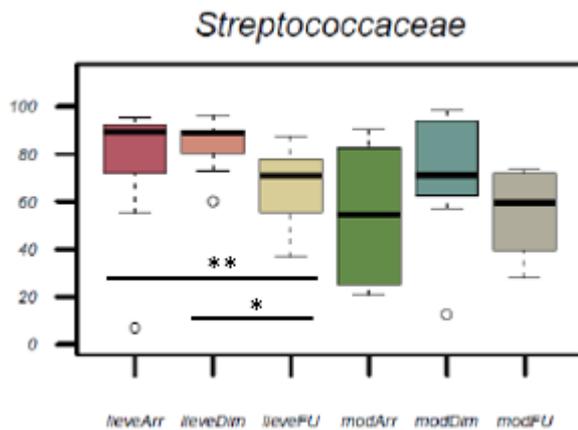


Grafico 23C: analisi delle Streptococcaceae, con differenze tra gruppi (test di Kruskal-Wallis con $p = 0.008$). Nel gruppo score lieve presenza maggiore a 6 mesi rispetto ai precedenti timepoint (* $p = 0.002$, ** $p = 0.02$).

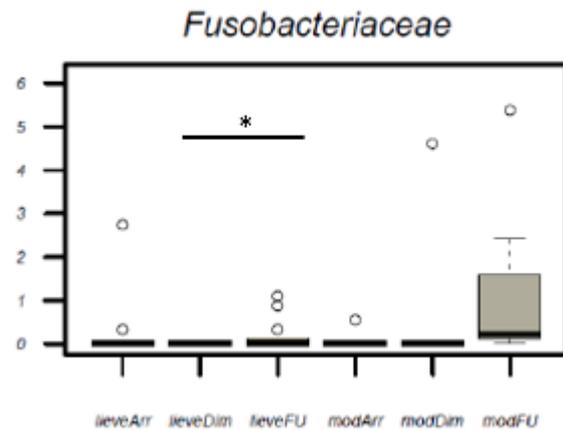


Grafico 23D: analisi delle Fusobacteriaceae, con differenze tra gruppi (test di Kruskal-Wallis con $p = 0.018$). Nel gruppo score lieve presenza maggiore a 6 mesi rispetto alla dimissione (* $p = 0.03$).

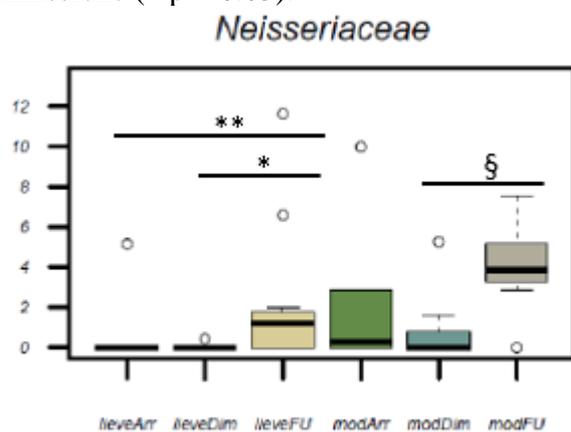
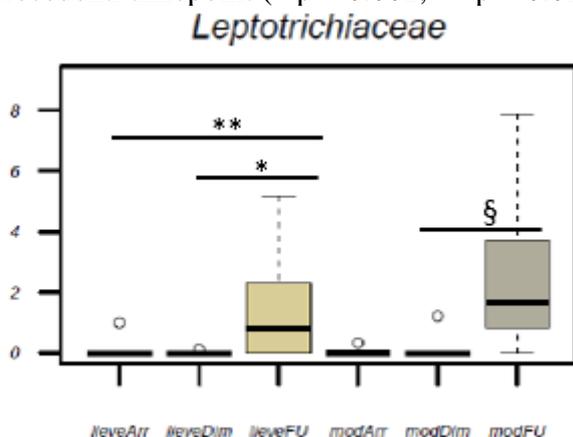


Grafico 23E: analisi delle Leptotrichiaceae, con differenze tra gruppi (test di Kruskal-Wallis con $p = 2.6e-04$). Nel gruppo score lieve presenza maggiore a 6 mesi rispetto ai precedenti timepoint (* $p = 0.001$, ** $p = 0.003$), nel gruppo score moderato-severo presenza maggiore a 6 mesi rispetto alla dimissione (§ $p = 0.02$).

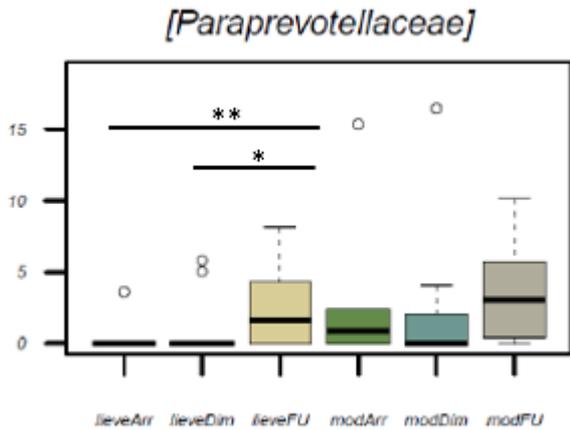


Grafico 23G: analisi delle Paraprevotellaceae, con differenze tra gruppi (test di Kruskal-Wallis con $p = 0.028$). Nel gruppo score lieve presenza maggiore a 6 mesi rispetto ai precedenti timepoint (* $p = 0.03$, ** $p = 0.009$).

Grafico 23F: analisi delle Neisseriaceae, con differenze tra gruppi (test di Kruskal-Wallis con $p = 7.8e-04$). Nel gruppo score lieve presenza maggiore a 6 mesi rispetto ai precedenti timepoint (* $p = 0.003$, ** $p = 0.01$), nel gruppo score moderato-severo presenza maggiore a 6 mesi rispetto alla dimissione (§ $p = 0.03$).

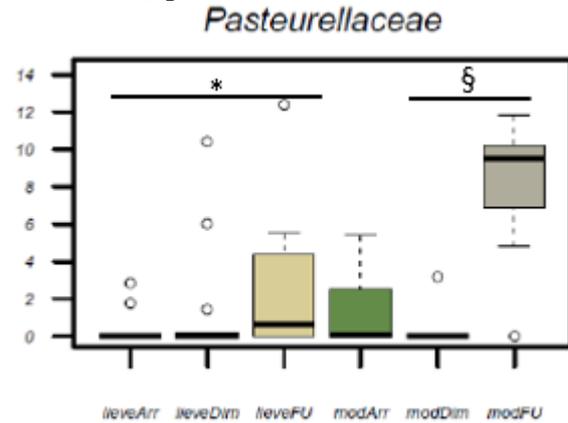


Grafico 23H: analisi delle Pasteurellaceae, con differenze tra gruppi (test di Kruskal-Wallis con $p = 0.003$). Nel gruppo score lieve presenza maggiore a 6 mesi rispetto all'arruolamento (* $p = 0.02$), nel gruppo score moderato-severo presenza maggiore a 6 mesi rispetto alla dimissione (§ $p = 0.006$).

All'analisi dei generi batterici sono emersi risultati significativi a carico di Actinomyces, Granulicatella, Leptotrichia, Streptococcus, Fusobacterium, Haemophilus e Neisseria (Grafici 24A – 24G).

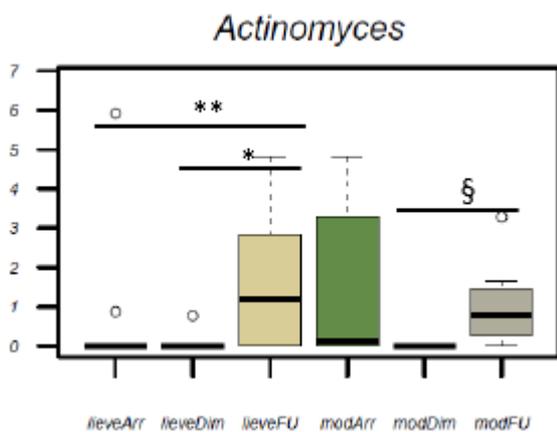


Grafico 24A: analisi del genus Actinomyces, con differenze tra gruppi (test di Kruskal-Wallis con $p = 0.002$). Nel gruppo score lieve presenza maggiore a 6 mesi rispetto ai precedenti timepoint (* $p = 0.001$, ** $p = 0.02$), nel gruppo moderato-severo presenza maggiore a 6 mesi rispetto alla dimissione (§ $p = 0.01$).

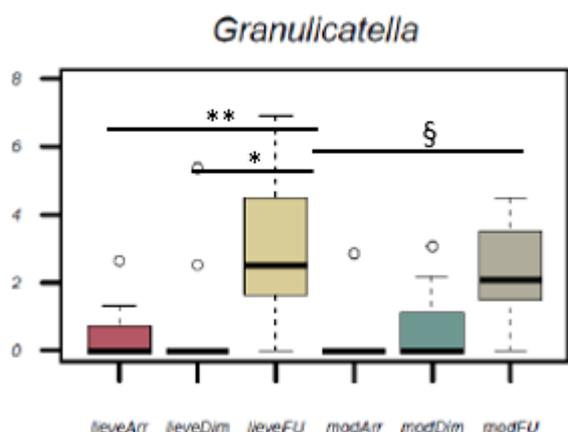


Grafico 24B: analisi del genus Granulicatella, con differenze tra gruppi (test di Kruskal-Wallis con $p = 3.2e-04$). Nel gruppo score lieve presenza maggiore a 6 mesi rispetto ai precedenti tamponi (* $p = 0.001$, ** $p = 6e-04$), nel gruppo moderato-severo presenza maggiore a 6 mesi rispetto all'arruolamento (§ $p = 0.03$).

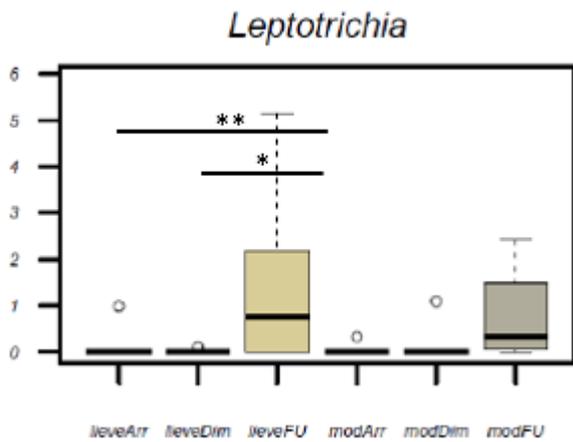


Grafico 24C: analisi del genus *Leptotrichia*, con differenze tra gruppi (test di Kruskal-Wallis con $p = 3e-04$). Nel gruppo score lieve presenza maggiore a 6 mesi rispetto ai precedenti timepoint (* $p = 0.001$, ** $p = 0.003$).

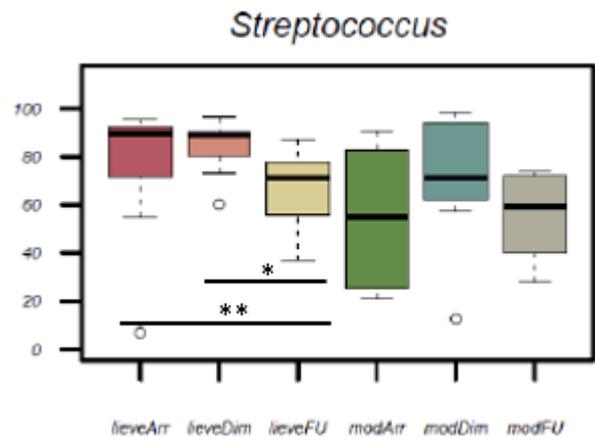


Grafico 24D: analisi del genus *Streptococcus*, con differenze tra gruppi (test di Kruskal-Wallis con $p = 0.008$). Nel gruppo score lieve presenza maggiore all'arruolamento e alla dimissione rispetto al controllo a 6 mesi (rispettivamente ** $p = 0.02$ e * $p = 0.002$).

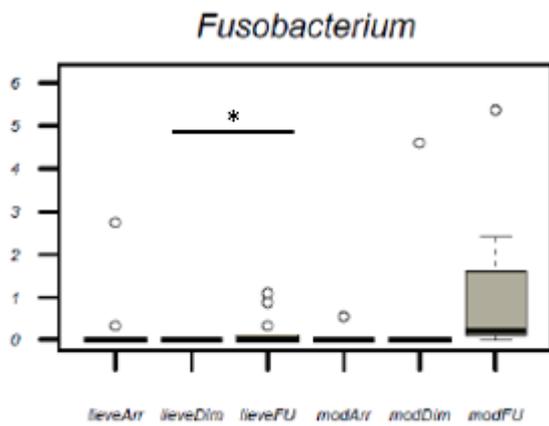


Grafico 24E: analisi del genus *Fusobacterium*, con differenze tra gruppi (test di Kruskal-Wallis con $p = 0.018$). Nel gruppo score lieve presenza maggiore a 6 mesi rispetto alla dimissione (* $p = 0.03$).

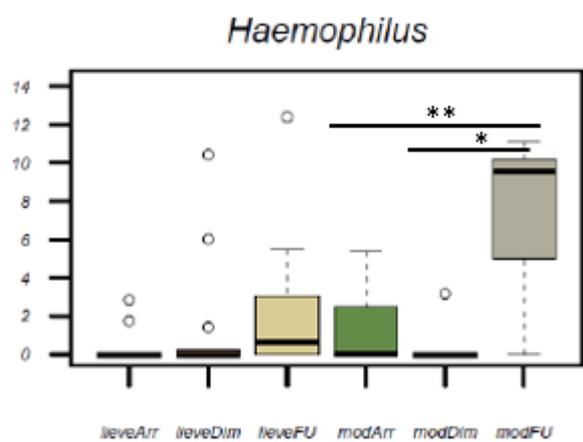


Grafico 24F: analisi del genus *Haemophilus*, con differenze tra gruppi (test di Kruskal-Wallis con $p = 0.005$). Nel gruppo score moderato-severo presenza maggiore a 6 mesi rispetto ai precedenti timepoint (* $p = 0.006$, ** $p = 0.03$).

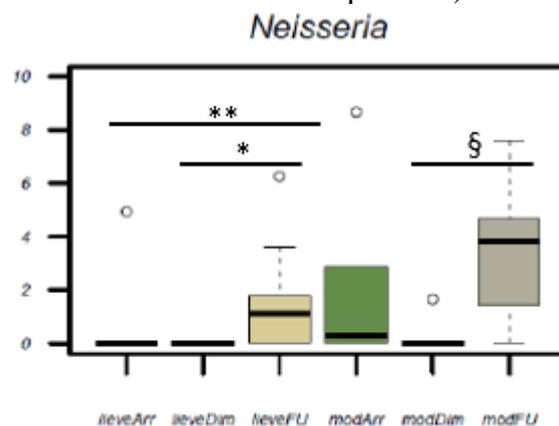


Grafico 24G: analisi del genus *Neisseria*, con differenze tra gruppi (test di Kruskal-Wallis con $p = 0.001$). Nel gruppo score lieve presenza maggiore a 6 mesi rispetto ai precedenti timepoint (* $p = 0.001$).

= 0.003, ** $p = 0.03$), nel gruppo score moderato-severo presenza maggiore a 6 mesi rispetto alla dimissione (§ $p = 0.02$).

5. Discussione

RMB2018 nasce come studio osservazionale prospettico monocentrico, spontaneo, con impiego di tessuti umani in vitro, senza uso di medicinali, volto a indagare la relazione tra severità del decorso clinico del lattante con bronchiolite, durante il periodo del ricovero, e la carica virale (RNA-VRS), la risposta immunitaria dell'ospite, il microbiota nasofaringeo ed intestinale, nonché di studiare le modificazioni evolutive nel tempo (follow-up a breve e lungo termine) del microbiota nei primi anni di vita dei pazienti che sono stati affetti da bronchiolite, in relazione particolarmente con lo sviluppo di wheezing ricorrente entro i 3 anni successivi all'evento acuto.

Purtroppo, il dilagare della pandemia COVID-19 ha causato una riduzione sensibile dell'arruolamento dei casi in metà delle stagioni epidemiche del VRS finora attraversate dallo studio e portato ad un aumento inatteso del drop out durante il follow-up a causa dei lockdown imposti alla popolazione durante gli anni 2020 e 2021 ed il timore delle famiglie dei piccoli pazienti di esporsi a contagio da SARS-CoV-2 accedendo al nostro nosocomio per il follow-up. (Grafici 1-3).

Questo imprevedibile e catastrofico sconvolgimento mondiale ha inoltre influito sull'impegno delle varie Unità coinvolte nella ricerca, determinando la necessità di convertire molte risorse, sia assistenziali, che laboratoristiche, verso altri settori di lavoro. La mia personale attività di ricerca durante il triennio di Dottorato, inoltre, si è arricchita di molteplici pubblicazioni, la maggior parte delle quali aventi come focus il VRS, ma alcune inerenti anche al SARS-CoV-2 e alle manifestazioni di questo virus in età pediatrica.¹²⁵⁻¹³⁸

Considerando che la metà delle stagioni epidemiche finora attraversate dallo studio è risultata influenzata dalla pandemia COVID-19, si è provveduto ad analizzare l'intero campione di popolazione arruolata finora stratificato nei 2 sottogruppi "pre COVID-19" e "COVID-19" per verificare il mantenimento dell'omogeneità del campione ai fini delle variabili anamnestiche, cliniche e terapeutiche indagate dallo studio (Tabelle 10A e 10B). Tale omogeneità è conservata, in quanto le differenze significative osservate a carico delle variabili anamnestiche (etnia, allattamento materno) sono ininfluenti ai fini delle analisi condotte dallo studio, così come le differenze (maggior valore di PCR all'ingresso in Reparto, maggior ricorso a ossigenoterapia a bassi flussi, e contestualmente ad un minor ricorso a terapia farmacologica inalatoria e ad antibioticoterapia durante l'epoca COVID-19). Questi dati, oltre a suggerire forse un arrivo del paziente alla valutazione medica in una fase leggermente più avanzata dell'infiammazione (maggior valore di PCR all'ingresso in Reparto), magari per il timore di accesso in ospedale in epoca COVID-19, sono espressione di una maggior aderenza alle Linee Guida nazionali ed internazionali sulla gestione della bronchiolite acuta negli anni più recenti (che sono anche quelli segnati dalla pandemia), come già evidenziato peraltro dal nostro gruppo di lavoro ultimamente.¹³⁹

Tra gli obiettivi secondari dello studio figura comparare i dati ottenuti nei lattanti con bronchiolite acuta da VRS con quelli ottenuti in pazienti della medesima età con bronchiolite acuta causata da altri microrganismi patogeni, popolazione di controllo (Tabelle 9A e 9B). Una volta operato il confronto tra questi due sottogruppi (pazienti con bronchiolite VRS positiva, 68 casi, e lattanti con bronchiolite VRS negativa, 21 pazienti), questi sono risultati omogenei per quanto riguarda tutte le variabili anamnestiche analizzate, mentre per le caratteristiche cliniche e terapeutiche si è osservata una differenza significativa nella mediana della durata di tempo intercorso tra l'esordio dei sintomi ed il ricovero in Reparto (maggiore nei pazienti con bronchiolite VRS negativa), variabile comunque ininfluente ai fini dello studio, e la frequenza di casi con Bronchiolitis Clinical Score ≥ 5 , ovvero moderato o severo (maggiore nei lattanti con bronchiolite da VRS), variabile per la quale va

comunque sottolineato che non risultano differenze in termini di valori di mediana dello Score stesso tra i due sottogruppi.

Stanti le difficoltà sopraelencate, al termine del periodo di Dottorato di ricerca è stato possibile avviare solo alcune analisi, e cioè lo studio di eventuali correlazioni tra la carica del VRS e gli outcome misura di severità del decorso clinico durante la bronchiolite acuta, nonché lo studio della composizione del microbiota nasofaringeo, salivare ed intestinale durante l'evento bronchiolite ed in corso di follow-up a breve termine (entro i 6 mesi dalla dimissione).

Stanti le difficoltà sopraelencate, al termine del periodo di Dottorato di ricerca è stato possibile condurre le analisi su limitati sottogruppi di pazienti. Allo stato attuale, per esempio, pur avendo raccolto e conservato numerosi campioni biologici ad hoc, non è stato possibile avviare le analisi delle citochine e dell'infiltrato infiammatorio su AFN, né delle PMBC su sangue venoso periferico, da parte della Clinical Research Division di Seattle precedentemente menzionata. Analogamente, non è ancora stato possibile avviare l'analisi del metaboloma sui campioni biologici raccolti finora. Tali ricerche verranno espletate in futuro.

Per l'analisi della carica virale e la correlazione con gli outcome clinici relativi alla bronchiolite nella fase di arruolamento e ricovero dello studio è stato necessario selezionare un campione di 41 lattanti dai 68 con bronchiolite VRS positiva (60.3%) per i quali sono risultati disponibili i campioni biologici per le analisi a più timepoint. Questo sottogruppo è stato sottoposto a confronto con il campione totale per verificare l'omogeneità del sottocampionamento ed è risultato del tutto omogeneo e comparabile con il campione totale di partenza, differendo in maniera significativa da quest'ultimo unicamente per la frequenza di soggetti vaccinati secondo calendario vaccinale al momento del ricovero, variabile ininfluyente ai fini delle analisi condotte (Tabelle 11A e 11B). Analogamente, per le analisi relative al microbiota nasofaringeo, salivare ed intestinale, è stato selezionato un campione di 20 soggetti (29.4%) di cui si dispone dei campioni biologici di tutti i timepoint previsti per le fasi di arruolamento, ricovero e follow-up a breve termine. Anche questo sottogruppo è stato sottoposto a confronto con il campione totale ed è risultato omogeneo al gruppo di partenza per tutte le variabili anamnestiche, cliniche e terapeutiche, eccezion fatta per il maggior ricorso ad aerosolterapia con soluzione fisiologica nel gruppo sottoposto ad analisi del microbiota, variabile ininfluyente ai fini delle indagini (Tabelle 11A e 11B).

Per quanto concerne le analisi relative alla carica virale, si è concentrata l'attenzione sui campioni raccolti durante l'arruolamento ed il ricovero dei 41 pazienti, i quali presentano campioni ottenuti in 3 timepoint differenti: V1 (ovvero ingresso in Reparto), V2 (ovvero in 3° giornata di ricovero), V4 (dimissione).

L'analisi della carica virale ripetuta nel tempo rappresenta un punto di forza di questo studio ed è finora stata valutata in pochi lavori presenti in letteratura.^{58,60,64,67,75-76,78}

I vari studi differiscono nei metodi di raccolta dei campioni biologici (aspirato nasale o faringonasale – talora aspirato tracheale nei pazienti intubati, ma anche liquido ottenuto da lavaggio nasale o nasofaringeo) e nella quantificazione della carica virale (titolo colturale espresso come \log_{10} TCID₅₀/mL nel primissimo studio, in lavori successivi adozione della misura in \log_{10} PFU/mL, carica virale vera e propria calcolata mediante RT-PCR ed espressa come numero di copie di VRS-RNA/mL o μ L, talora in scala logaritmica, nei lavori più recenti), e forse anche per questo ottengono risultati differenti. Infatti, se il primissimo lavoro di Hall e Colleghi pone l'attenzione su un declino del quantitativo virale particolarmente lento nel tempo, in assenza di calo significativo prima del 6° giorno di ricovero⁵⁸, i lavori successivi sono invece concordi nel rilevare riduzione della carica virale già nei primi 5 giorni⁶⁷, con differenze significative tra i valori addirittura tra l'ingresso in Reparto ed il 3° giorno di ricovero^{64,67}, l'ingresso ed il 2° giorno⁶⁰, addirittura ogni giorno di ricovero rispetto al precedente⁷⁶. I risultati ottenuti dalle nostre analisi sembrano confermare i precedenti lavori in merito osservando un declino della carica virale in un arco di

tempo di ricovero mediano di 5.5 giorni, sebbene in assenza di differenze statisticamente significative (Grafico 4).

Dalle analisi condotte sulla variabile “carica VRS al timepoint V1” è emerso un trend di associazione, in assenza di vera e propria significatività statistica, tra valori di mediana di carica maggiori e necessità di supporto respiratorio, in particolare di HFNC ($p = 0.09$, Tabella 12A e Grafico 5). Un trend di associazione, ai limiti della significatività statistica, è emerso anche dall’analisi di correlazione tra i valori di picco di VRS durante il ricovero e pazienti che hanno ricevuto supporto respiratorio con HFNC ($p = 0.05$, Tabella 12A e Grafico 6). La specifica necessità di alti flussi (HFNC) come tipo di supporto respiratorio esprime una maggior severità della dinamica respiratoria del paziente e al fallimento di questa modalità può rendersi necessario il passaggio ad una ventilazione non invasiva o invasiva, con necessità di trasferimento del paziente in ambiente intensivo. In questi termini, i nostri risultati, pur non raggiungendo significatività statistica, sembrano concordi con quanto osservato in altri lavori, in cui la carica virale elevata risulta associata ad una maggior severità della bronchiolite intesa come ricovero in TIP e/o ricorso a ventilazione invasiva.^{59,61-62,64,68-69} Va precisato che tutti gli altri studi che hanno indagato tale correlazione e trovato valori di associazione significativi si sono basati su valori di carica virale ottenuti da un unico campione biologico raccolto all’arruolamento (e in questo senso i loro risultati sono comparabili alla nostra analisi della carica virale analizzata al timepoint V1). El Saleeby e Colleghi, invece, hanno effettuato campionamenti ripetuti a cadenza quotidiana durante il ricovero e ciò ha permesso agli Autori di riscontrare associazioni significative in specifici timepoint: ad esempio, hanno individuato una correlazione significativa tra elevata carica di VRS al giorno 3 di degenza e ricovero in TIP ($p = 0.009$).⁶⁴ In questi termini, appare interessante il nostro riscontro di trend di associazione non solo tra carica di VRS all’ingresso in Reparto (timepoint V1), ma anche di picco di carica di VRS (indipendentemente dal timepoint del campionamento) con il nostro outcome di severità clinica (necessità di HFNC), associazione che quasi raggiunge significatività statistica ($p = 0.05$, Tabella 12A, Grafico 6). Questo elemento suggerisce che una valutazione seriata della carica virale risulti maggiormente informativa rispetto all’analisi condotta su un singolo timepoint in quanto la carica varia nel tempo, non necessariamente con immediato declino, ma potendo dapprima raggiungere un’acme (picco): proprio questo potrebbe influire sulla severità del decorso clinico. Potrebbe essere utile analizzare anche la durata di tempo intercorso tra l’esordio dei sintomi ed il ricovero per ottenere un’idea ancora più chiara dell’andamento della carica virale in relazione al decorso clinico fin dall’inizio della patologia, identificare correttamente il raggiungimento del picco di carica virale e relazionarlo all’andamento clinico dei pazienti.

Le nostre analisi documentano invece assenza di significatività nella relazione tra carica di VRS all’ingresso in Reparto, ma anche picco di carica di VRS, ed altri outcome clinici utilizzati in letteratura come misura di severità come la durata di supporto respiratorio e la durata di ricovero (Tabelle 12A e 12B). In questo senso, i nostri dati differiscono da quanto dimostrato dalla maggior parte dei lavori della letteratura, che osservano una correlazione diretta tra carica virale e durata di supporto respiratorio⁷⁷, nonché tra la carica virale e la maggior durata di ricovero^{61,64,66,68-69,77}. Sembrano invece allinearsi con quanto osservato da Hall e Colleghi che, pur riscontrando correlazione tra carica virale e maggior severità della bronchiolite (intesa come riscontro di addensamento alle indagini radiografiche), non osservano correlazione con maggior durata di ricovero⁵⁸, così come van Leeuwen et al.⁶⁵, Watanabe et al.⁷⁸ e de Souza et al.⁷⁰, gruppo di lavoro, quest’ultimo, che riporta un’assenza di correlazione anche con la durata di ossigenoterapia.

Per quanto riguarda l’analisi della carica virale al timepoint V1, infine, dal nostro studio non emerge associazione significativa con i valori di Bronchiolitis Clinical Score rilevati all’ingresso in Reparto (stesso timepoint di raccolta dei campioni biologici, Tabella 12B). L’assenza di associazione fa differire i nostri risultati da quanto riscontrato da numerosi lavori, che invece

rilevano una correlazione diretta tra carica di VRS maggiore all'arruolamento e valori più elevati di severità al diverso score clinico utilizzato di volta in volta dai vari studi.^{63,66-67,73} I nostri dati sembrano invece concordi con quanto rilevato da altri due lavori che non documentano correlazione con i valori degli score clinici utilizzati.^{60,71} Come già ampiamente osservato nel capitolo introduttivo di questa trattazione, esistono in letteratura numerosi score impiegati in ambito clinico per la valutazione della severità della bronchiolite, ma revisioni recenti dimostrano che ben pochi di questi possono essere ritenuti sufficientemente validabili da un punto di vista metodologico.¹⁸ La scelta di impiegare score clinici differenti nei diversi studi (compreso il nostro) rende difficile valutare se le osservazioni in merito ad eventuali associazioni con variabili di interesse come la carica virale siano attendibili o meno. Dal nostro studio non emerge alcuna associazione significativa tra la carica virale ed il punteggio ottenuto allo score clinico quando applicato nello stesso timepoint (V1, ovvero ingresso in Reparto).

Va infine precisato che nemmeno alle analisi condotte utilizzando il valore di Bronchiolitis Clinical Score (ed in particolare la suddivisione tra score < 5 punti, lieve, e ≥ 5 punti, moderato-severo) come variabile in relazione agli altri outcome clinici (necessità di supporto respiratorio, ed in particolare di HFNC, durante la degenza, con durata di supporto respiratorio ≤ 48 ore o > 48 ore, con durata di ricovero ≤ 5 giorni oppure > 5 giorni) non emerge alcuna correlazione significativa. Potrebbe quindi essere utile considerare in futuro un'eventuale sostituzione dello score clinico attualmente in uso con altri che in anni più recenti e successivi alla partenza del presente studio si sono affacciati in letteratura come strumenti promettenti e validati per la misura della severità clinica della bronchiolite.

Infine, per quanto riguarda l'analisi condotta sulla variabile clearance del VRS, è emersa dallo studio una correlazione significativa tra presenza di valori di mediana di clearance maggiori nei pazienti che hanno necessitato di HFNC (p = 0.03, Tabella 12A, Grafico 7). Questo risultato non trova una chiara spiegazione, in quanto a prima vista si sarebbe portati a pensare che i pazienti che necessitano di supporto con HFNC, assunti come pazienti con decorso clinico più severo, potrebbero presentare declino virale più lento, e quindi clearance virale minore. In effetti, l'unico altro lavoro che a nostra conoscenza indaga la clearance del VRS ed i suoi effetti sul decorso clinico della bronchiolite (El Saleeby et al.) giunge a conclusioni del genere, in quanto attesta un'associazione tra ridotta clearance virale (Δ carica giorni 1-3) e maggiore durata ricovero.⁶⁴ E' tuttavia vero che, avendo nel nostro studio considerato la categoria "clearance VRS" come il risultato della differenza tra picco del VRS (a prescindere dal timepoint in cui tale valore è stato ottenuto) ed il valore della carica di VRS alla dimissione, l'associazione da noi riscontrata tra maggiori valori di clearance e necessità di HFNC potrebbe semplicemente riflettere valori molto elevati di picco raggiunti dai pazienti che hanno necessitato di tale tipo di supporto respiratorio e che poi alla dimissione hanno raggiunto valori di carica virale inferiori. Va inoltre specificato che nel sottogruppo di 41 lattanti sottoposti alle analisi relative alla carica virale, soltanto 4 hanno necessitato di supporto respiratorio con HFNC. È quindi necessario ampliare il campione di studio per poter verificare la persistenza o meno di questi primi risultati.

Non sono state riscontrate invece differenze significative in termini di clearance del VRS tra i pazienti sottoposti a supporto respiratorio per < 48 ore o ≥ 48 ore, né per durata di ricovero ≤ 5 giorni oppure > 5 giorni, così come non sono emerse associazioni significative per la variabile di carica virale alla dimissione – timepoint V4 (Tabelle 12A e 12B).

In definitiva, dalle analisi condotte su un sottogruppo di 41 dei 68 lattanti arruolati finora nello studio non emergono significative associazioni tra i valori di carica virale all'ingresso in Reparto (timepoint V1), di picco di carica virale e di carica virale alla dimissione (timepoint V4) con quasi tutti gli outcome impiegati nello studio come espressione di severità clinica. Questi dati pongono allo stato attuale i risultati del nostro lavoro in linea con quanto rilevato da altri 5 studi in letteratura.^{60,65,70-71,78}

La presenza di trend di associazione tra carica virale all'ingresso in Reparto e picco di carica VRS con necessità di HFNC, pur in assenza di significatività, nonché l'associazione significativa di clearance di VRS (forse influenzata dal picco) con HFNC, nel loro insieme suggeriscono che la carica virale potrebbe in realtà influenzare in maniera diretta il decorso clinico della bronchiolite acuta dei lattanti ospedalizzati in corso di infezione da VRS, così come riscontrato da più numerosi lavori.^{58-59,61-64,66-69,73,77}

Non è da escludere che la relazione tra la carica virale ed il decorso clinico dell'ospite si inserisca in un più ampio e complesso sistema che vede probabilmente l'influenza anche di altre variabili quali ad esempio la risposta infiammatoria dell'ospite.

Si renderà quindi necessario in futuro ampliare il campione di studio per poter confermare o meno quanto repertato finora ed avviare le analisi complementari sui campioni biologici raccolti per identificare gli eventuali ulteriori protagonisti della complessa e affascinante interazione tra VRS e ospite nella bronchiolite acuta.

Per quanto riguarda invece le analisi condotte sul microbiota nasofaringeo, salivare ed intestinale, è stato finora possibile effettuare indagini sui campioni biologici prelevati all'arruolamento (timepoint V1), alla dimissione dal Reparto (timepoint V4), al controllo di follow-up a 6 mesi dalla dimissione (timepoint V7). Il campione di studio è stato inoltre finora stratificato in 2 sottogruppi, basandosi sul punteggio del Bronchiolitis Clinical Score rilevato all'arruolamento (timepoint V1): sono stati identificati 7 pazienti con score lieve e 13 con score moderato-severo.

Dalle nostre analisi sono emersi comportamenti differenti per quanto riguarda la ricchezza delle specie batteriche nei vari distretti indagati. Tali risultati sono comparabili soltanto con i pochi lavori che in letteratura hanno riportato i risultati dello studio dell' α -diversity del microbiota in relazione all'evento bronchiolite.^{97,101,104,106,109-110} Alcuni di questi lavori sono studi caso-controllo che hanno confrontato la ricchezza dell'ecosistema durante l'evento bronchiolite (casi) con controlli sani.^{97,101,110} Se i nostri risultati non sono direttamente con questi lavori, non avendo il nostro studio una popolazione di controllo sana, lo sono invece con quelli di altri lavori che, in maniera analoga alla nostra, hanno effettuato queste indagini su pazienti con differenti gradi di severità clinica nel contesto dell'infezione da VRS.^{104,106,109}

L'analisi dell' α -diversity tra i vari gruppi e time point ha riportato differenze significative al test di Kruskal-Wallis per tutti e 3 i distretti esaminati. Altro elemento comune tra tutti e 3 i distretti è stato il riscontro di generale recupero di α -diversity (trend) ai campioni di follow-up a 6 mesi rispetto ai precedenti timepoint in entrambi i gruppi di pazienti. Tali dati sono stati confermati anche dalle analisi quantitative delle specie batteriche per tutti i tipi di campione analizzato ed in entrambi i gruppi di pazienti e dalle analisi di β -diversity. Questo andamento potrebbe essere influenzato a fattori ambientali non direttamente collegati all'evento bronchiolite (es. divezzamento, vedere sotto).

Per quanto riguarda il microbiota nasofaringeo, all'analisi dei phyla batterici non sono emerse differenze significative né tra categorie di pazienti, né tra i vari timepoint di collezione dei campioni di AFN, così come all'analisi delle varie famiglie batteriche, eccezion fatta per la famiglia delle Aerococcaceae (maggiore ai campioni raccolti al follow-up a 6 mesi rispetto al timepoint dimissione, come osservato per molti batteri), di cui nessuno studio in letteratura ha riportato osservazioni in merito nel contesto della bronchiolite, a nostra conoscenza.

All'analisi dei generi batterici riscontrati all'AFN sono emerse alcune differenze significative nella distribuzione di *Alloiococcus* tra i vari gruppi e timepoint (test di Kruskal-Wallis con $p = 0.035$) e maggiormente presente al timepoint follow-up 6 mesi dalla dimissione rispetto alla dimissione nei pazienti con score clinico moderato ($p = 0.02$). Anche questo batterio, abituale commensale del

lattante sano,⁸⁴ è poco noto nella letteratura della bronchiolite, citato in un unico lavoro relativo allo studio del microbiota auricolare di pazienti affetti da otite media effusiva ricorrente, dove tuttavia viene riscontrato con presenza significativamente minore proprio nei pazienti che presentano anche eventi respiratori quali bronchiolite o asma.¹⁴⁰

Anche per quanto riguarda il genus *Leptotrichia* è emersa una significativamente differente distribuzione di presenza tra i vari gruppi e timepoint (test di Kruskal-Wallis con $p = 0.03$), nonché tra i valori ottenuti dai campioni prelevati al follow-up a 6 mesi dalla dimissione, significativamente maggiori rispetto alla dimissione nei pazienti con score lieve ($p = 0.01$) e all'arruolamento nei pazienti con score moderato ($p = 0.02$). A nostra conoscenza questi sono i primi risultati in merito a questo genus batterico nella letteratura relativa alla bronchiolite.

Particolare attenzione è stata posta ovviamente ai genera che in letteratura presentano associazioni con outcome clinici a breve o a lungo termine in merito alla bronchiolite: *Haemophilus*, *Moraxella*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* e *Veilonella*.

Alle analisi relative di tutti questi genera non sono emerse differenze tra pazienti con score clinico lieve e moderato, tranne che per *Moraxella* e *Veilonella*, su cui si è osservata una tendenza alla significatività per una presenza maggiore alla dimissione tra i pazienti con score clinico moderato rispetto a quelli con score clinico lieve (per *Veilonella* solo al timepoint dimissione). Questi dati sono difficilmente confrontabili con i lavori della letteratura, la maggior parte dei quali ha effettuato paragoni tra casi di bronchiolite con i controlli sani, ed in generale differiscono dai riscontri finora ottenuti dai diversi studi che vedono i genera *Haemophilus*, *Streptococcus* e *Staphylococcus* tendenzialmente associati, ma non sempre, ad outcome di severità clinica maggiore, differentemente da *Moraxella*, *Corynebacterium* e *Veilonella*, che invece sembrano associarsi tendenzialmente, ma non sempre, a minor severità clinica durante l'evento bronchiolite.^{87,91-92,96,99,104,108}

Dalle analisi sono emersi inoltre quantitativi batterici aumentati al follow-up a 6 mesi rispetto ai precedenti timepoint per tutti i genera, eccetto che per *Haemophilus*, che ha presentato un trend ai limiti della significatività di maggior presenza all'arruolamento rispetto alla dimissione per i pazienti con score moderato. Questi dati, che sembrerebbero differire da quanto noto nei lavori della letteratura che hanno effettuato analisi anche successivamente all'evento bronchiolite e documentato ritorno a profili comparabili con i controlli sani, sono a nostro giudizio influenzati da due elementi: in primo luogo la mancanza, allo stato attuale, di un gruppo di controllo nello studio per comparare le modifiche alla luce di un campione "normale", in secondo luogo da fattori ambientali che possono essere avvenuti nel corso dei 6 mesi dopo i quali il paziente giunge al controllo (ad esempio l'avvio del divezzo, vedere successivamente).

Le analisi condotte sul microbiota intestinale analizzato da campioni fecali hanno prodotto risultati variegati, principalmente a carico di batteri appartenenti ai phyla dei Firmicutes e dei Proteobacteria (significatività al test di Kruskal-Wallis nel confronto generale tra gruppi e timepoint per molti batteri analizzati, tranne che per le famiglie delle Staphylococcaceae, Coriobacteriaceae ed Enterobacteriaceae e per il genus *Eggerthella*).

In letteratura il microbiota intestinale è stato indagato su campioni fecali in corso di evento bronchiolite da pochi studi finora.^{88,94,97,106-107}

Da questi lavori emerge che i pazienti con bronchiolite presentano un microbiota intestinale differente dai controlli sani, con aumento di popolazioni batteriche quali *Bacteroides* e *Streptococcus* ed una riduzione di *Blautia*, *Veilonella* e *Staphylococcus*.

I nostri risultati non sono direttamente comparabili con quelli emersi da questi lavori poiché il nostro studio non prevede una popolazione di controlli sani.

Anche dalle analisi del microbiota intestinale sono emerse associazioni significative o ai limiti per aumento di popolazioni batteriche al follow-up a 6 mesi rispetto ai precedenti timepoint nei gruppi di pazienti analizzati, in particolare a carico dell'ordine dei Clostridiales, delle famiglie delle

Peptostreptococcaceae, Ruminococcaceae, Veilonellaceae, Coriobacteriaceae e dei generi Blautia, Ruminococcus, Veilonella, Faecalibacterium, Eubacterium, Eggerthella, Haemophilus. Per contro, soltanto due famiglie hanno mostrato valori maggiori al timepoint arruolamento o dimissione rispetto al controllo al follow-up: Staphylococcaceae ed Enterobacteriaceae. Questi dati, non direttamente confrontabili con la letteratura analizzata relativamente all'evento bronchiolite, in quanto gli altri studi non hanno previsto controlli a distanza di 6 mesi dalla patologia acuta, appaiono a nostro giudizio influenzati probabilmente da eventi ambientali, in primis l'introduzione del divezzo, avvenuta ragionevolmente per tutti i pazienti al controllo a 6 mesi, essendo il ricovero avvenuto ad un'età mediana di 2.8 mesi (1.4 – 3.8). In effetti, andando ad analizzare la letteratura relativa a modifiche evolutive del microbiota intestinale in relazione all'introduzione del divezzo nel lattante sano, si osserva un aumento di Bacteroidaceae, Lachnospiraceae (famiglia a cui appartengono i generi Blautia ed Eubacterium, che nel nostro studio risultano aumentati a 6 mesi) e Ruminococcaceae (famiglia a cui appartengono i generi Ruminococcus e Faecalibacterium, anch'essi aumentati a 6 mesi nel nostro studio).¹⁴¹

Occorrerà in futuro aggiungere le analisi sui campioni raccolti a 1 mese dalla dimissione per ottenere maggiori informazioni in merito all'evoluzione del microbiota in un momento ancora non influenzato da un grosso cambiamento quale l'avvio del divezzo, nonché valutare di introdurre specifiche domande anamnestiche per identificare il preciso momento temporale dell'avvio dello svezzamento e dei macronutrienti introdotti per accertare eventuali influenze sul microbiota.

Nel nostro studio abbiamo infine analizzato il microbiota salivare, per la prima volta nella letteratura relativa alla bronchiolite, per quanto a nostra conoscenza.

I nostri risultati hanno evidenziato differenze tra gruppi e timepoint valutate al test di Kruskal-Wallis per i phyla Firmicutes, Bacteroidetes, Fusobacteria e Proteobacteria.

Anche l'analisi delle famiglie batteriche ha mostrato risultati variegati, con test di Kruskal-Wallis significativo per Actinomycetaceae, Carnobacteriaceae, Streptococcaceae, Fusobacteriaceae, Leptotrichiaceae, Neisseriaceae, Paraprevotellaceae e Pasteurellaceae. Fatta eccezione per le Streptococcaceae (per la quale è emersa una riduzione significativa al follow-up a 6 mesi rispetto ai precedenti timepoint) per tutte le altre famiglie si è osservato un aumento dei vari batteri, talvolta solo ai limiti della significatività, al controllo a 6 mesi rispetto ai precedenti timepoint sia nei pazienti con score clinico lieve che moderato.

Infine, l'analisi dei generi batterici ha mostrato test di Kruskal-Wallis significativo per Actinomyces, Granulicatella, Leptotrichia, Streptococcus, Fusobacterium, Haemophilus e Neisseria. Eccezion fatta per il genus Streptococcus (con riduzione significativa al follow-up a 6 mesi rispetto a dimissione e arruolamento nei pazienti con score clinico lieve) per tutte le altre famiglie si è osservato un aumento dei vari batteri, talvolta solo ai limiti della significatività, al follow-up a 6 mesi rispetto ai precedenti timepoint sia nei pazienti con score clinico lieve che moderato.

Tutti questi risultati non sono comparabili direttamente con la letteratura a noi nota in quanto nessun lavoro, a nostra conoscenza, ha condotto analisi su microbiota salivare. A prima vista, i dati ottenuti su microbiota salivare sono diversi da quelli ottenuti dalle analisi del microbiota intestinale e nasofaringeo.

Per quanto riguarda il confronto con microbiota intestinale, soltanto Hu e Colleghi hanno effettuato analisi su tampone orofaringeo, comparandole con analisi su microbiota ottenuto da tampone fecale. Non emerge chiaramente dalla sezione dei metodi del lavoro, tuttavia, se il tampone orofaringeo abbia collezionato saliva o piuttosto mucosa del cavo orale.⁹⁷ I dati ottenuti nel nostro studio non sono quindi direttamente confrontabili con questo lavoro.

Per quanto riguarda il confronto tra microbiota salivare e faringonasale, nessun lavoro è presente in letteratura in merito, a nostra conoscenza. Soltanto Luna e Colleghi conducono una comparazione tra microbiota da tampone nasale e da aspirato faringonasale su parte della coorte MARC-35,

evidenziando una sostanziale sovrapposizione, tranne che per elevata presenza di *Staphylococcus* esclusivamente nei tamponi nasali.⁹⁹

Occorrerà in futuro effettuare analisi comparative tra il microbiota salivare e le altre due tipologie da noi analizzate per evidenziare le effettive sovrapposizioni e differenze.

Occorre inoltre specificare che, alle analisi condotte relativamente alla carica virale, la stratificazione per valori di Bronchiolitis Clinical Score non si è dimostrata outcome di severità clinica correlabile agli altri indici di severità. Per questo motivo, occorrerà innanzitutto valutare l'eventuale persistenza o meno dei dati ottenuti finora a carico del microbiota alla luce di altri outcome di severità (necessità e tipologia di supporto respiratorio in primis) per poter confermare o meno i dati ottenuti finora, solo parzialmente confrontabili con la letteratura.

Infine, nulla si è potuto osservare al momento nel nostro studio in relazione al follow-up a lungo termine, i cui campioni biologici finora raccolti non sono ancora stati analizzati, per la verifica di eventuali associazioni tra composizione del microbiota dei vari distretti e outcome a lungo termine quali sviluppo di wheezing e asma.

Riassumendo, il nostro studio presenta alcuni pregi in entrambe le tipologie di ricerca condotte finora.

Per quanto riguarda l'analisi della carica virale, valore dello studio consiste nell'indagine effettuata su campioni raccolti a più timepoint, che permette di monitorare l'andamento della carica virale nel tempo e di ragionare anche su variabili come il picco di carica e la clearance del VRS. I prelievi a più timepoint anche per le analisi relative al microbiota rappresentano un pregio dello studio, così come lo studio (per la prima volta in letteratura, a nostra conoscenza) del microbiota salivare. Sono tuttavia presenti anche delle limitazioni in questo studio, alcune intrinseche allo stesso (il carattere monocentrico dello studio, ad esempio, nonché la mancanza di una popolazione di controllo sana, con la possibilità invece di utilizzare i pazienti ricoverati per bronchiolite non da VRS come controllo, comunque affetto da patologia acuta), altre legate invece allo stato attuale delle ricerche condotte finora (mancanza delle analisi su citochine infiammatorie, PMBC e metaboloma dai campioni comunque già raccolti) che non permettono al momento una lettura completa e più chiara dei risultati ottenuti su carica virale e su microbiota.

Per quanto riguarda l'analisi della carica virale e la relazione col decorso clinico della bronchiolite, poi, sarà utile analizzare anche la durata di tempo intercorso tra l'esordio dei sintomi ed il ricovero per ottenere un'idea ancora più chiara dell'andamento della carica virale in relazione al decorso clinico fin dall'inizio della patologia. Sarà utile inoltre indagare anche il ruolo svolto da coinfezioni, presenti in una percentuale ridotta, ma non assente, dei nostri casi.

Le analisi del microbiota nel nostro studio evidenziano numerosi risultati mai descritti nella letteratura finora prodotta nell'ambito dell'infezione/bronchiolite da VRS per quanto a nostra conoscenza. Tali risultati, estremamente variegati, saranno sicuramente da rileggere alla luce di un ampliamento del campione di studio, necessario per valutare eventuali persistenze o meno delle associazioni finora riscontrate. Risulta necessario inoltre effettuare queste analisi anche alla luce di altri outcome clinici, essendo risultato lo score clinico utilizzato nello studio poco efficace come misura di severità clinica nello studio della relazione tra carica virale e decorso della bronchiolite. Sarà poi da valutare l'analisi dei pazienti con bronchiolite non da VRS come eventuale controllo. Occorrerà inoltre ampliare i timepoint analizzati, indagando ad esempio i campioni raccolti a 1 mese dalla dimissione, per ottenere un'idea più chiara delle modifiche dell'ecosistema dei 3 distretti e l'impatto di importanti modifiche ambientali quali l'avvio del divezzo. Sarà necessario infine condurre le analisi sui campioni raccolti al follow-up a lungo termine per la verifica di eventuali associazioni tra composizione del microbiota dei vari distretti e outcome a lungo termine quali sviluppo di wheezing e asma.

6. Conclusioni e prospettive future

Dalle analisi condotte su un sottogruppo di 41 dei 68 lattanti arruolati finora nello studio non emergono significative associazioni tra i valori di carica virale all'ingresso in Reparto (timepoint V1), di picco di carica virale e di carica virale alla dimissione (timepoint V4) con quasi tutti gli outcome impiegati nello studio come espressione di severità clinica. Tuttavia, la presenza di trend di associazione tra carica virale all'ingresso in Reparto e picco di carica VRS con necessità di HFNC, pur in assenza di significatività, nonché l'associazione significativa di clearance di VRS (forse influenzata dal picco) con HFNC, nel loro insieme suggeriscono che la carica virale potrebbe in realtà influenzare in maniera diretta il decorso clinico della bronchiolite acuta dei lattanti ospedalizzati in corso di infezione da VRS. Non è da escludere che la relazione tra la carica virale ed il decorso clinico dell'ospite si inserisca in un più ampio e complesso sistema che vede probabilmente l'influenza anche di altre variabili quali la ad esempio la risposta infiammatoria dell'ospite: ciò potrebbe spiegare il perché di semplici tendenze senza l'emergere di associazioni significative vere e proprie.

Risulta sicuramente utile ampliare il campione di studio, nonché implementare i risultati con quelli che otterremo dallo studio delle citochine infiammatorie e PMBC dai campioni già raccolti, analizzare la durata di tempo intercorso tra l'esordio dei sintomi ed il ricovero per ottenere un'idea ancora più chiara dell'andamento della carica virale in relazione al decorso clinico fin dall'inizio della patologia, indagare infine anche il ruolo svolto da coinfezioni, presenti in una percentuale ridotta, ma non assente, dei nostri casi.

Le analisi del microbiota condotte su 20 lattanti nel nostro studio evidenziano al momento numerosi risultati mai descritti nella letteratura finora prodotta nell'ambito dell'infezione/bronchiolite da VRS per quanto a nostra conoscenza (ad esempio quelli relativi a genera come *Alloiococcus* e *Leptotrichia* su AFN, nonché tutti i dati emersi dallo studio della saliva, finora mai effettuato in letteratura).

Tali risultati, estremamente variegati, saranno sicuramente da rileggere alla luce di un ampliamento del campione di studio, necessario per valutare eventuali persistenze o meno delle associazioni finora riscontrate. Risulta necessario inoltre effettuare queste analisi anche alla luce di altri outcome clinici, essendo risultato lo score clinico utilizzato nello studio poco efficace come misura di severità clinica nello studio della relazione tra carica virale e decorso della bronchiolite. Sarà poi da valutare l'analisi dei pazienti con bronchiolite non da VRS come eventuale controllo. Occorrerà inoltre ampliare i timepoint analizzati, indagando ad esempio i campioni raccolti a 1 mese dalla dimissione, per ottenere un'idea più chiara delle modifiche dell'ecosistema dei 3 distretti e l'impatto di importanti modifiche ambientali quali l'avvio del divezzo. Sarà necessario infine condurre le analisi sui campioni raccolti al follow-up a lungo termine per la verifica di eventuali associazioni tra composizione del microbiota dei vari distretti e outcome a lungo termine quali sviluppo di wheezing e asma.

7. Bibliografia

1. National Institute for Health and Care Excellence: Bronchiolitis in children. NG9. London: National Institute for Health and Clinical Excellence, 2021.
2. Baraldi E, Lanari M, Manzoni P, et al. Inter-society consensus document on treatment and prevention of bronchiolitis in newborns and infants. *Ital J Pediatr.* 2014 Oct 24;40:65. doi: 10.1186/1824-7288-40-65. PMID: 25344148; PMCID: PMC4364570.
3. Ralston SL, Lieberthal AS, Meissner HC, et al. American Academy of Pediatrics. Clinical practice guideline: the diagnosis, management, and prevention of bronchiolitis. *Pediatrics.* 2014 Nov;134(5):e1474-502. doi: 10.1542/peds.2014-2742. Erratum in: *Pediatrics.* 2015 Oct;136(4):782. PMID: 25349312.
4. Meissner HC. Viral Bronchiolitis in Children. *N Engl J Med.* 2016 Jan 7;374(1):62-72. doi: 10.1056/NEJMra1413456. PMID: 26735994.
5. Calvo C, García-García ML, Pozo F, et al. Clinical characteristics of human bocavirus infections compared with other respiratory viruses in Spanish children. *Pediatr Infect Dis J.* 2008 Aug;27(8):677-80. doi: 10.1097/INF.0b013e31816be052. PMID: 18574440.
6. Midulla F, Scagnolari C, Bonci E, et al. Respiratory syncytial virus, human bocavirus and rhinovirus bronchiolitis in infants. *Arch Dis Child.* 2010 Jan;95(1):35-41. doi: 10.1136/adc.2008.153361. Epub 2009 Oct 11. PMID: 19822538.
7. Camporesi A, Morello R, Ferro V, et al. Epidemiology, Microbiology and Severity of Bronchiolitis in the First Post-Lockdown Cold Season in Three Different Geographical Areas in Italy: A Prospective, Observational Study. *Children (Basel).* 2022 Apr 1;9(4):491. doi: 10.3390/children9040491. PMID: 35455535; PMCID: PMC9024462.
8. Avadhanula V, Piedra PA. The Prevention of Common Respiratory Virus Epidemics in 2020-21 during the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Pandemic: An Unexpected Benefit of the Implementation of Public Health Measures. *Lancet Reg Health Am.* 2021 Oct;2:100043. doi: 10.1016/j.lana.2021.100043. Epub 2021 Aug 20. PMID: 34430955; PMCID: PMC8377442.
9. Stera G, Pierantoni L, Masetti R, et al. Impact of SARS-CoV-2 Pandemic on Bronchiolitis Hospitalizations: The Experience of an Italian Tertiary Center. *Children (Basel).* 2021 Jun 28;8(7):556. doi: 10.3390/children8070556. PMID: 34203542; PMCID: PMC8304517.
10. Hall CB, Weinberg GA, Iwane MK, et al. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *N Engl J Med.* 2009 Feb 5;360(6):588-98. doi: 10.1056/NEJMoa0804877. PMID: 19196675; PMCID: PMC4829966.
11. Mauskopf J, Margulis AV, Samuel M, et al. Respiratory Syncytial Virus Hospitalizations in Healthy Preterm Infants: Systematic Review. *Pediatr Infect Dis J.* 2016 Jul;35(7):e229-38. doi: 10.1097/INF.0000000000001163. PMID: 27093166; PMCID: PMC4927309.
12. Lanari M, Anderson EJ, Sheridan-Pereira M, et al. Burden of respiratory syncytial virus hospitalisation among infants born at 32-35 weeks' gestational age in the Northern

- Hemisphere: pooled analysis of seven studies. *Epidemiol Infect.* 2020 Aug 17;148:e170. doi: 10.1017/S0950268820001661. PMID: 32799945; PMCID: PMC7439292.
13. Paes B, Fauroux B, Figueras-Aloy J, et al. Defining the Risk and Associated Morbidity and Mortality of Severe Respiratory Syncytial Virus Infection Among Infants with Chronic Lung Disease. *Infect Dis Ther.* 2016 Dec;5(4):453-471. doi: 10.1007/s40121-016-0137-7. Epub 2016 Nov 18. PMID: 27864751; PMCID: PMC5125140.
 14. Checchia PA, Paes B, Bont L, et al. Defining the Risk and Associated Morbidity and Mortality of Severe Respiratory Syncytial Virus Infection Among Infants with Congenital Heart Disease. *Infect Dis Ther.* 2017 Mar;6(1):37-56. doi: 10.1007/s40121-016-0142-x. Epub 2017 Jan 9. PMID: 28070870; PMCID: PMC5336417.
 15. Manzoni P, Figueras-Aloy J, Simões EAF, et al. Defining the Incidence and Associated Morbidity and Mortality of Severe Respiratory Syncytial Virus Infection Among Children with Chronic Diseases. *Infect Dis Ther.* 2017 Sep;6(3):383-411. doi: 10.1007/s40121-017-0160-3. Epub 2017 Jun 26. PMID: 28653300; PMCID: PMC5595774.
 16. Vandini S, Bottau P, Faldella G, et al. Immunological, Viral, Environmental, and Individual Factors Modulating Lung Immune Response to Respiratory Syncytial Virus. *Biomed Res Int.* 2015;2015:875723. doi: 10.1155/2015/875723. Epub 2015 May 6. PMID: 26064963; PMCID: PMC4438160.
 17. Lanari M, Prinelli F, Adorni F, et al. Study Group of Italian Society of Neonatology on Risk Factors for RSV Hospitalization. Risk factors for bronchiolitis hospitalization during the first year of life in a multicenter Italian birth cohort. *Ital J Pediatr.* 2015 May 26;41:40. doi: 10.1186/s13052-015-0149-z. PMID: 26006025; PMCID: PMC4453833.
 18. Rodriguez-Martinez CE, Sossa-Briceño MP, Nino G. Systematic review of instruments aimed at evaluating the severity of bronchiolitis. *Paediatr Respir Rev.* 2018 Jan;25:43-57. doi: 10.1016/j.prrv.2016.12.006. Epub 2017 Feb 15. PMID: 28258885; PMCID: PMC5557708.
 19. van Miert C, Abbott J, Verheoff F, et al. Development and validation of the Liverpool infant bronchiolitis severity score: a research protocol. *J Adv Nurs.* 2014 Oct;70(10):2353-62. doi: 10.1111/jan.12387. Epub 2014 Mar 26. PMID: 24673581.
 20. Justicia-Grande AJ, Pardo-Seco J, Cebey-López M, et al. Respiratory Syncytial Virus network (ReSVinet). Development and Validation of a New Clinical Scale for Infants with Acute Respiratory Infection: The ReSVinet Scale. *PLoS One.* 2016 Jun 21;11(6):e0157665. doi: 10.1371/journal.pone.0157665. PMID: 27327497; PMCID: PMC4915666.
 21. Camacho-Cruz J, Briñez S, Alvarez J, et al. Use of the ReSVinet Scale for parents and healthcare workers in a paediatric emergency service: a prospective study. *BMJ Paediatr Open.* 2021 May 28;5(1):e000966. doi: 10.1136/bmjpo-2020-000966. PMID: 34131594; PMCID: PMC8166609.
 22. Hakizimana B, Kalimba E, Ndatinya A, et al. Field testing two existing, standardized respiratory severity scores (LIBSS and ReSViNET) in infants presenting with acute respiratory illness to tertiary hospitals in Rwanda - a validation and inter-rater reliability

- study. PLoS One. 2021 Nov 4;16(11):e0258882. doi: 10.1371/journal.pone.0258882. PMID: 34735488; PMCID: PMC8568200.
23. Alejandre C, Guitart C, Balaguer M, et al. Use of procalcitonin and C-reactive protein in the diagnosis of bacterial infection in infants with severe bronchiolitis. *Eur J Pediatr*. 2021 Mar;180(3):833-842. doi: 10.1007/s00431-020-03790-6. Epub 2020 Sep 14. PMID: 32929531.
 24. Alejandre C, Balaguer M, Guitart C, et al. Procalcitonin-guided protocol decreased the antibiotic use in paediatric patients with severe bronchiolitis. *Acta Paediatr*. 2020 Jun;109(6):1190-1195. doi: 10.1111/apa.15148. Epub 2020 Feb 4. PMID: 31876302.
 25. Friedman JN, Davis T, Somaskanthan A, et al. Avoid doing chest x rays in infants with typical bronchiolitis. *BMJ*. 2021 Oct 22;375:e064132. doi: 10.1136/bmj-2021-064132. PMID: 34686495.
 26. Biagi C, Pierantoni L, Baldazzi M, et al. Lung ultrasound for the diagnosis of pneumonia in children with acute bronchiolitis. *BMC Pulm Med*. 2018 Dec 7;18(1):191. doi: 10.1186/s12890-018-0750-1. PMID: 30526548; PMCID: PMC6286612.
 27. La Regina DP, Bloise S, Pepino D, et al. Lung ultrasound in bronchiolitis. *Pediatr Pulmonol*. 2021 Jan;56(1):234-239. doi: 10.1002/ppul.25156. Epub 2020 Nov 24. PMID: 33151023.
 28. Mussman GM, Parker MW, Statile A, et al. Suctioning and length of stay in infants hospitalized with bronchiolitis. *JAMA Pediatr*. 2013 May;167(5):414-21. doi: 10.1001/jamapediatrics.2013.36. PMID: 23460088; PMCID: PMC6291830.
 29. Beggs S, Wong ZH, Kaul S, et al. High-flow nasal cannula therapy for infants with bronchiolitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014 Jan 20;(1):CD009609. doi: 10.1002/14651858.CD009609.pub2. PMID: 24442856.
 30. Dafydd C, Saunders BJ, Kotecha SJ, et al. Efficacy and safety of high flow nasal oxygen for children with bronchiolitis: systematic review and meta-analysis. *BMJ Open Respir Res*. 2021 Jul;8(1):e000844. doi: 10.1136/bmjresp-2020-000844. PMID: 34326153; PMCID: PMC8323377.
 31. Jat KR, Dsouza JM, Mathew JL. Continuous positive airway pressure (CPAP) for acute bronchiolitis in children. *Cochrane Database Syst Rev*. 2022 Apr 4;4(4):CD010473. doi: 10.1002/14651858.CD010473.pub4. PMID: 35377462; PMCID: PMC8978604.
 32. Gill PJ, Anwar MR, Kornelsen E, et al. Parenteral versus enteral fluid therapy for children hospitalised with bronchiolitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2021 Dec 1;12(12):CD013552. doi: 10.1002/14651858.CD013552.pub2. PMID: 34852398; PMCID: PMC8635777.
 33. Zhang L, Mendoza-Sassi RA, Wainwright C, et al. Nebulised hypertonic saline solution for acute bronchiolitis in infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017 Dec 21;12(12):CD006458. doi: 10.1002/14651858.CD006458.pub4. PMID: 29265171; PMCID: PMC6485976.
 34. Hsieh CW, Chen C, Su HC, et al. Exploring the efficacy of using hypertonic saline for nebulizing treatment in children with bronchiolitis: a meta-analysis of randomized

- controlled trials. *BMC Pediatr.* 2020 Sep 14;20(1):434. doi: 10.1186/s12887-020-02314-3. PMID: 32928154; PMCID: PMC7489028.
35. Elliott SA, Gaudet LA, Fernandes RM, et al. Comparative Efficacy of Bronchiolitis Interventions in Acute Care: A Network Meta-analysis. *Pediatrics.* 2021 May;147(5):e2020040816. doi: 10.1542/peds.2020-040816. PMID: 33893229.
36. Gadomski AM, Scribani MB. Bronchodilators for bronchiolitis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014 Jun 17;2014(6):CD001266. doi: 10.1002/14651858.CD001266.pub4. PMID: 24937099; PMCID: PMC7055016.
37. Cai Z, Lin Y, Liang J. Efficacy of salbutamol in the treatment of infants with bronchiolitis: A meta-analysis of 13 studies. *Medicine (Baltimore).* 2020 Jan;99(4):e18657. doi: 10.1097/MD.00000000000018657. PMID: 31977855; PMCID: PMC7004745.
38. AIFA - Nota Informativa importante su Broncovaleas-Salbutamolo. Disponibile al link: [http://www.agenziafarmaco.gov.it/content/nota-informativa-importante-su-broncovaleas-salbutamolo-27102014#:~:text=Tutte%20le%20attualit%C3%A0,.Nota%20Informativa%20Importante%20su%20Broncovaleas%20\(salbutamolo,\(27%2F10%2F2014\)&text=AIFA%20ha%20limitato%20l'uso,et%C3%A0%20superiore%20ai%202%20anni.](http://www.agenziafarmaco.gov.it/content/nota-informativa-importante-su-broncovaleas-salbutamolo-27102014#:~:text=Tutte%20le%20attualit%C3%A0,.Nota%20Informativa%20Importante%20su%20Broncovaleas%20(salbutamolo,(27%2F10%2F2014)&text=AIFA%20ha%20limitato%20l'uso,et%C3%A0%20superiore%20ai%202%20anni.)
39. Hartling L, Bialy LM, Vandermeer B, et al. Epinephrine for bronchiolitis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2011 Jun 15;(6):CD003123. doi: 10.1002/14651858.CD003123.pub3. PMID: 21678340.
40. Plint AC, Johnson DW, Patel H, et al. Pediatric Emergency Research Canada (PERC). Epinephrine and dexamethasone in children with bronchiolitis. *N Engl J Med.* 2009 May 14;360(20):2079-89. doi: 10.1056/NEJMoa0900544. PMID: 19439742.
41. Jat KR, Chawla D. Surfactant therapy for bronchiolitis in critically ill infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015 Aug 24;2015(8):CD009194. doi: 10.1002/14651858.CD009194.pub3. PMID: 26299681; PMCID: PMC7104667.
42. Biban P, Conti G, Wolfler AM, et al. Efficacy and safety of exogenous surfactant therapy in patients under 12 months of age invasively ventilated for severe bronchiolitis (SURFABRON): protocol for a multicentre, randomised, double-blind, controlled, non-profit trial. *BMJ Open.* 2020 Oct 19;10(10):e038780. doi: 10.1136/bmjopen-2020-038780. PMID: 33077567; PMCID: PMC7574934
43. Disponibile al link - <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03959384>
44. Enriquez A, Chu IW, Mellis C, et al. Nebulised deoxyribonuclease for viral bronchiolitis in children younger than 24 months. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012 Nov 14;11(11):CD008395. doi: 10.1002/14651858.CD008395.pub2. PMID: 23152257; PMCID: PMC7388903.
45. Linssen RSN, Ma J, Bem RA, et al. Rational use of mucoactive medications to treat pediatric airway disease. *Paediatr Respir Rev.* 2020 Nov;36:8-14. doi: 10.1016/j.prrv.2020.06.007. Epub 2020 Jun 16. PMID: 32653467; PMCID: PMC7297155.

46. Fernandes RM, Bialy LM, Vandermeer B, et al. Glucocorticoids for acute viral bronchiolitis in infants and young children. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013 Jun 4;2013(6):CD004878. doi: 10.1002/14651858.CD004878.pub4. PMID: 23733383; PMCID: PMC6956441.
47. Chandelia S, Kumar D, Chadha N, Jaiswal N. Magnesium sulphate for treating acute bronchiolitis in children up to two years of age. *Cochrane Database Syst Rev.* 2020 Dec 14;12(12):CD012965. doi: 10.1002/14651858.CD012965.pub2. PMID: 33316083; PMCID: PMC8139137.
48. Debbarma R, Khera D, Singh S, Toteja N, Choudhary B, Singh K. Nebulized Magnesium Sulphate in Bronchiolitis: A Randomized Controlled Trial. *Indian J Pediatr.* 2021 Nov;88(11):1080-1085. doi: 10.1007/s12098-021-03695-8. Epub 2021 Mar 27. PMID: 33772433; PMCID: PMC7997787.
49. Liu F, Ouyang J, Sharma AN, et al. Leukotriene inhibitors for bronchiolitis in infants and young children. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015 Mar 16;(3):CD010636. doi: 10.1002/14651858.CD010636.pub2. PMID: 25773054.
50. Liet JM, Ducruet T, Gupta V, et al. Heliox inhalation therapy for bronchiolitis in infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015 Sep 18;2015(9):CD006915. doi: 10.1002/14651858.CD006915.pub3. PMID: 26384333; PMCID: PMC8504435.
51. Kuitunen I, Kiviranta P, Sankilampi U, et al. Helium-oxygen in bronchiolitis-A systematic review and meta-analysis. *Pediatr Pulmonol.* 2022 Jun;57(6):1380-1391. doi: 10.1002/ppul.25895. Epub 2022 Mar 23. PMID: 35297227
52. Farley R, Spurling GK, Eriksson L, et al. Antibiotics for bronchiolitis in children under two years of age. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014 Oct 9;(10):CD005189. doi: 10.1002/14651858.CD005189.pub4. PMID: 25300167.
53. Kalergis AM, Soto JA, Gálvez NMS, et al. Pharmacological management of human respiratory syncytial virus infection. *Expert Opin Pharmacother.* 2020 Dec;21(18):2293-2303. doi: 10.1080/14656566.2020.1806821. Epub 2020 Aug 18. PMID: 32808830.
54. Roqué i Figuls M, Giné-Garriga M, Granados Rugeles C, et al. Chest physiotherapy for acute bronchiolitis in paediatric patients between 0 and 24 months old. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012 Feb 15;(2):CD004873. doi: 10.1002/14651858.CD004873.pub4. Update in: *Cochrane Database Syst Rev.* 2016;2:CD004873. PMID: 22336805.
55. Combret Y, Prieur G, Medrinal C, et al. Chest physiotherapy for children with acute bronchiolitis: Do we need more evidence? *Hong Kong Physiother J.* 2022 Jun;42(1):1-2. doi: 10.1142/S1013702522750014. Epub 2021 Sep 30. PMID: 35782698; PMCID: PMC9244604.
56. Rima B, Collins P, Easton A, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Pneumoviridae. *J Gen Virol.* 2017 Dec;98(12):2912-2913. doi: 10.1099/jgv.0.000959. Epub 2017 Oct 31. PMID: 29087278; PMCID: PMC5775899.
57. Vandini S, Biagi C, Lanari M. Respiratory Syncytial Virus: The Influence of Serotype and Genotype Variability on Clinical Course of Infection. *Int J Mol Sci.* 2017 Aug 6;18(8):1717. doi: 10.3390/ijms18081717. PMID: 28783078; PMCID: PMC5578107.

58. Hall CB, Douglas RG Jr, Geiman JM. Respiratory syncytial virus infections in infants: quantitation and duration of shedding. *J Pediatr.* 1976 Jul;89(1):11-5. doi: 10.1016/s0022-3476(76)80918-3. PMID: 180274.
59. Buckingham SC, Bush AJ, Devincenzo JP. Nasal quantity of respiratory syncytial virus correlates with disease severity in hospitalized infants. *Pediatr Infect Dis J.* 2000 Feb;19(2):113-7. doi: 10.1097/00006454-200002000-00006. PMID: 10693996.
60. Wright PF, Gruber WC, Peters M, et al. Illness severity, viral shedding, and antibody responses in infants hospitalized with bronchiolitis caused by respiratory syncytial virus. *J Infect Dis.* 2002 Apr 15;185(8):1011-8. doi: 10.1086/339822. Epub 2002 Apr 1. PMID: 11930309.
61. DeVincenzo JP, El Saleeby CM, Bush AJ et al. Respiratory syncytial virus load predicts disease severity in previously healthy infants. *J Infect Dis.* 2005 Jun 1;191(11):1861-8. doi: 10.1086/430008. Epub 2005 Apr 21. PMID: 15871119.
62. 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 Dec;79(12):1951-8. doi: 10.1002/jmv.21026. PMID: 17935185.
63. Houben ML, Coenjaerts FE, Rossen JW, et al. Disease severity and viral load are correlated in infants with primary respiratory syncytial virus infection in the community. *J Med Virol.* 2010 Jul;82(7):1266-71. doi: 10.1002/jmv.21771. PMID: 20513094; PMCID: PMC7167003.
64. El Saleeby CM, Bush AJ, Harrison LM, et al. Respiratory syncytial virus load, viral dynamics, and disease severity in previously healthy naturally infected children. *J Infect Dis.* 2011 Oct 1;204(7):996-1002. doi: 10.1093/infdis/jir494. PMID: 21881113; PMCID: PMC3203391.
65. Van Leeuwen JC, Goossens LK, Hendrix RM, et al. Equal virulence of rhinovirus and respiratory syncytial virus in infants hospitalized for lower respiratory tract infection. *Pediatr Infect Dis J.* 2012 Jan;31(1):84-6. doi: 10.1097/INF.0b013e31823345bf. PMID: 21909047.
66. Scagnolari C, Midulla F, Selvaggi C, et al. Evaluation of viral load in infants hospitalized with bronchiolitis caused by respiratory syncytial virus. *Med Microbiol Immunol.* 2012 Aug;201(3):311-7. doi: 10.1007/s00430-012-0233-6. Epub 2012 Mar 10. PMID: 22406873; PMCID: PMC7086883.
67. Zhou L, Xiao Q, Zhao Y, et al. The impact of viral dynamics on the clinical severity of infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Med Virol.* 2015 Aug;87(8):1276-84. doi: 10.1002/jmv.24111. Epub 2015 Apr 23. PMID: 25907780; PMCID: PMC7166664.
68. Hasegawa K, Jartti T, Mansbach JM, et al. Respiratory syncytial virus genomic load and disease severity among children hospitalized with bronchiolitis: multicenter cohort studies in the United States and Finland. *J Infect Dis.* 2015 May 15;211(10):1550-9. doi: 10.1093/infdis/jiu658. Epub 2014 Nov 25. PMID: 25425699; PMCID: PMC4481613.

69. Skjerven HO, Megremis S, Papadopoulos NG, et al. Virus Type and Genomic Load in Acute Bronchiolitis: Severity and Treatment Response With Inhaled Adrenaline. *J Infect Dis.* 2016 Mar 15;213(6):915-21. doi: 10.1093/infdis/jiv513. Epub 2015 Oct 27. PMID: 26508124; PMCID: PMC7107341.
70. Souza AP, Leitão LA, Luisi F, et al. Lack of association between viral load and severity of acute bronchiolitis in infants. *J Bras Pneumol.* 2016 Jul-Aug;42(4):261-265. doi: 10.1590/S1806-37562015000000241. PMID: 27832233; PMCID: PMC5063442.
71. Yan XL, Li YN, Tang YJ, et al. Clinical characteristics and viral load of respiratory syncytial virus and human metapneumovirus in children hospitalized for acute lower respiratory tract infection. *J Med Virol.* 2017 Apr;89(4):589-597. doi: 10.1002/jmv.24687. Epub 2016 Sep 28. PMID: 27632796; PMCID: PMC7166468.
72. Larrañaga CL, Ampuero SL, Luchsinger VF, et al. Impaired immune response in severe human lower tract respiratory infection by respiratory syncytial virus. *Pediatr Infect Dis J.* 2009 Oct;28(10):867-73. doi: 10.1097/INF.0b013e3181a3ea71. PMID: 19738511.
73. Espinosa Y, San Martín C, Torres AA, et al. Genomic Loads and Genotypes of Respiratory Syncytial Virus: Viral Factors during Lower Respiratory Tract Infection in Chilean Hospitalized Infants. *Int J Mol Sci.* 2017 Mar 21;18(3):654. doi: 10.3390/ijms18030654. PMID: 28335547; PMCID: PMC5372666.
74. Piedra FA, Mei M, Avadhanula V, et al. The interdependencies of viral load, the innate immune response, and clinical outcome in children presenting to the emergency department with respiratory syncytial virus-associated bronchiolitis. *PLoS One.* 2017 Mar 7;12(3):e0172953. doi: 10.1371/journal.pone.0172953. PMID: 28267794; PMCID: PMC5340370.
75. Thwaites RS, Coates M, Ito K, et al. Reduced Nasal Viral Load and IFN Responses in Infants with Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis and Respiratory Failure. *Am J Respir Crit Care Med.* 2018 Oct 15;198(8):1074-1084. doi: 10.1164/rccm.201712-2567OC. PMID: 29688024; PMCID: PMC6221568.
76. Garcia-Mauriño C, Moore-Clingenpeel M, Thomas J, et al. Viral Load Dynamics and Clinical Disease Severity in Infants With Respiratory Syncytial Virus Infection. *J Infect Dis.* 2019 Apr 8;219(8):1207-1215. doi: 10.1093/infdis/jiy655. PMID: 30418604; PMCID: PMC6452299.
77. De Paulis M, Oliveira DBL, Thomazelli LM, et al. The importance of viral load in the severity of acute bronchiolitis in hospitalized infants. *Clinics (Sao Paulo).* 2021 Dec 6;76:e3192. doi: 10.6061/clinics/2021/e3192. PMID: 34878030; PMCID: PMC8610217.
78. Watanabe RAS, Cruz JS, de Souza Luna LK, et al. Respiratory syncytial virus: viral load, viral decay, and disease progression in children with bronchiolitis. *Braz J Microbiol.* 2022 Apr 1. doi: 10.1007/s42770-022-00742-0. Epub ahead of print. PMID: 35362939.
79. Vandini S, Calamelli E, Faldella G, Lanari M. Immune and inflammatory response in bronchiolitis due to respiratory Syncytial Virus and Rhinovirus infections in infants. *Paediatr Respir Rev.* 2017 Sep;24:60-64. doi: 10.1016/j.prrv.2016.11.006. Epub 2017 Jan 16. PMID: 28159510.

80. Barnes MVC, Openshaw PJM, Thwaites RS. Mucosal Immune Responses to Respiratory Syncytial Virus. *Cells*. 2022 Mar 29;11(7):1153. doi: 10.3390/cells11071153. PMID: 35406717; PMCID: PMC8997753.
81. Vu LD, Siefker D, Jones TL, You D, Taylor R, DeVincenzo J, Cormier SA. Elevated Levels of Type 2 Respiratory Innate Lymphoid Cells in Human Infants with Severe Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019 Dec 1;200(11):1414-1423. doi: 10.1164/rccm.201812-2366OC. PMID: 31237777; PMCID: PMC6884055.
82. Gill MA, Long K, Kwon T, Muniz L, Mejias A, Connolly J, Roy L, Banchereau J, Ramilo O. Differential recruitment of dendritic cells and monocytes to respiratory mucosal sites in children with influenza virus or respiratory syncytial virus infection. *J Infect Dis*. 2008 Dec 1;198(11):1667-76. doi: 10.1086/593018. PMID: 18847373; PMCID: PMC2696361.
83. Zhang X, Zhang X, Zhang N, Wang X, Sun L, Chen N, Zhao S, He Q. Airway microbiome, host immune response and recurrent wheezing in infants with severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Pediatr Allergy Immunol*. 2020 Apr;31(3):281-289. doi: 10.1111/pai.13183. Epub 2020 Jan 22. PMID: 31788862.
84. Rossi GA, Ballarini S, Silvestri M, et al. Respiratory syncytial virus and airway microbiota - A complex interplay and its reflection on morbidity. *Pediatr Allergy Immunol*. 2021 Aug;32(6):1141-1151. doi: 10.1111/pai.13524. Epub 2021 May 7. PMID: 33896042.
85. 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 Apr;133(4):1220-2. doi: 10.1016/j.jaci.2013.10.049. Epub 2013 Dec 22. PMID: 24365140; PMCID: PMC3972371.
86. Mansbach JM, Hasegawa K, Henke DM, et al. Respiratory syncytial virus and rhinovirus severe bronchiolitis are associated with distinct nasopharyngeal microbiota. *J Allergy Clin Immunol*. 2016 Jun;137(6):1909-1913.e4. doi: 10.1016/j.jaci.2016.01.036. Epub 2016 Apr 6. PMID: 27061249; PMCID: PMC4899255.
87. Hasegawa K, Mansbach JM, Ajami NJ, et al. Association of nasopharyngeal microbiota profiles with bronchiolitis severity in infants hospitalised for bronchiolitis. *Eur Respir J*. 2016 Nov;48(5):1329-1339. doi: 10.1183/13993003.00152-2016. Epub 2016 Oct 6. PMID: 27799386; PMCID: PMC5459592.
88. Hasegawa K, Linnemann RW, Mansbach JM, et al. The Fecal Microbiota Profile and Bronchiolitis in Infants. *Pediatrics*. 2016 Jul;138(1):e20160218. doi: 10.1542/peds.2016-0218. PMID: 27354456; PMCID: PMC4925084.
89. Rosas-Salazar C, Shilts MH, Tovchigrechko A, et al. Nasopharyngeal Microbiome in Respiratory Syncytial Virus Resembles Profile Associated with Increased Childhood Asthma Risk. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016 May 15;193(10):1180-3. doi: 10.1164/rccm.201512-2350LE. PMID: 27174483; PMCID: PMC4872668.
90. Rosas-Salazar C, Shilts MH, Tovchigrechko A, et al. Differences in the Nasopharyngeal Microbiome During Acute Respiratory Tract Infection With Human Rhinovirus and

- Respiratory Syncytial Virus in Infancy. *J Infect Dis*. 2016 Dec 15;214(12):1924-1928. doi: 10.1093/infdis/jiw456. PMID: 27923952; PMCID: PMC5142087.
91. de Steenhuijsen Piters WA, Heinonen S, Hasrat R, et al. Nasopharyngeal Microbiota, Host Transcriptome, and Disease Severity in Children with Respiratory Syncytial Virus Infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016 Nov 1;194(9):1104-1115. doi: 10.1164/rccm.201602-0220OC. PMID: 27135599; PMCID: PMC5114450.
 92. Hasegawa K, Linnemann RW, Mansbach JM, et al. Nasal Airway Microbiota Profile and Severe Bronchiolitis in Infants: A Case-control Study. *Pediatr Infect Dis J*. 2017 Nov;36(11):1044-1051. doi: 10.1097/INF.0000000000001500. PMID: 28005692; PMCID: PMC5479744.
 93. Stewart CJ, Mansbach JM, Wong MC, et al. Associations of Nasopharyngeal Metabolome and Microbiome with Severity among Infants with Bronchiolitis. A Multiomic Analysis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017 Oct 1;196(7):882-891. doi: 10.1164/rccm.201701-0071OC. PMID: 28530140; PMCID: PMC5649976.
 94. Hasegawa K, Stewart CJ, Mansbach JM, et al. Sphingolipid metabolism potential in fecal microbiome and bronchiolitis in infants: a case-control study. *BMC Res Notes*. 2017 Jul 26;10(1):325. doi: 10.1186/s13104-017-2659-9. PMID: 28747215; PMCID: PMC5530560.
 95. Hasegawa K, Mansbach JM, Ajami NJ, et al. Serum cathelicidin, nasopharyngeal microbiota, and disease severity among infants hospitalized with bronchiolitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2017 Apr;139(4):1383-1386.e6. doi: 10.1016/j.jaci.2016.09.037. Epub 2016 Nov 12. PMID: 27845236; PMCID: PMC5385272.
 96. Hasegawa K, Mansbach JM, Ajami NJ, et al. The relationship between nasopharyngeal CCL5 and microbiota on disease severity among infants with bronchiolitis. *Allergy*. 2017 Nov;72(11):1796-1800. doi: 10.1111/all.13160. Epub 2017 Apr 12. PMID: 28306146; PMCID: PMC5601014.
 97. Hu Q, Dai W, Zhou Q, et al. Dynamic oropharyngeal and faecal microbiota during treatment in infants hospitalized for bronchiolitis compared with age-matched healthy subjects. *Sci Rep*. 2017 Sep 12;7(1):11266. doi: 10.1038/s41598-017-11311-z. PMID: 28900158; PMCID: PMC5595837.
 98. Toivonen L, Hasegawa K, Ajami NJ, et al. Circulating 25-hydroxyvitamin D, nasopharyngeal microbiota, and bronchiolitis severity. *Pediatr Allergy Immunol*. 2018 Dec;29(8):877-880. doi: 10.1111/pai.12977. Epub 2018 Nov 13. PMID: 30152883; PMCID: PMC6294653.
 99. Luna PN, Hasegawa K, Ajami NJ, et al. The association between anterior nares and nasopharyngeal microbiota in infants hospitalized for bronchiolitis. *Microbiome*. 2018 Jan 3;6(1):2. doi: 10.1186/s40168-017-0385-0. PMID: 29298732; PMCID: PMC5751828.
 100. Stewart CJ, Hasegawa K, Wong MC, et al. Respiratory Syncytial Virus and Rhinovirus Bronchiolitis Are Associated With Distinct Metabolic Pathways. *J Infect Dis*. 2018 Mar 13;217(7):1160-1169. doi: 10.1093/infdis/jix680. PMID: 29293990; PMCID: PMC5939849.

101. Ederveen THA, Ferwerda G, Ahout IM, et al. Haemophilus is overrepresented in the nasopharynx of infants hospitalized with RSV infection and associated with increased viral load and enhanced mucosal CXCL8 responses. *Microbiome*. 2018 Jan 11;6(1):10. doi: 10.1186/s40168-017-0395-y. PMID: 29325581; PMCID: PMC5765694.
102. Mansbach JM, Hasegawa K, Piedra PA, et al. Haemophilus-Dominant Nasopharyngeal Microbiota Is Associated With Delayed Clearance of Respiratory Syncytial Virus in Infants Hospitalized for Bronchiolitis. *J Infect Dis*. 2019 May 5;219(11):1804-1808. doi: 10.1093/infdis/jiy741. PMID: 30590603; PMCID: PMC6500556.
103. Stewart CJ, Mansbach JM, Ajami NJ, Petrosino JF, Zhu Z, Liang L, Camargo CA, Hasegawa K. Serum Metabolome Is Associated With the Nasopharyngeal Microbiota and Disease Severity Among Infants With Bronchiolitis. *J Infect Dis*. 2019 May 24;219(12):2005-2014. doi: 10.1093/infdis/jiz021. PMID: 30629185; PMCID: PMC6534192.
104. Sonawane AR, Tian L, Chu CY, et al. Microbiome-Transcriptome Interactions Related to Severity of Respiratory Syncytial Virus Infection. *Sci Rep*. 2019 Sep 25;9(1):13824. doi: 10.1038/s41598-019-50217-w. PMID: 31554845; PMCID: PMC6761288.
105. Fujiogi M, Camargo CA Jr, Bernot JP, et al. In infants with severe bronchiolitis: dual-transcriptomic profiling of nasopharyngeal microbiome and host response. *Pediatr Res*. 2020 Aug;88(2):144-146. doi: 10.1038/s41390-019-0742-8. Epub 2020 Jan 6. PMID: 31905367; PMCID: PMC7335686.
106. Harding JN, Siefker D, Vu L, et al. Altered gut microbiota in infants is associated with respiratory syncytial virus disease severity. *BMC Microbiol*. 2020 Jun 1;20(1):140. doi: 10.1186/s12866-020-01816-5. PMID: 32487019; PMCID: PMC7268675.
107. Alba C, Aparicio M, González-Martínez F, et al. Nasal and Fecal Microbiota and Immunoprofiling of Infants With and Without RSV Bronchiolitis. *Front Microbiol*. 2021 Jun 1;12:667832. doi: 10.3389/fmicb.2021.667832. PMID: 34140944; PMCID: PMC8203809.
108. Fujiogi M, Raita Y, Pérez-Losada M, et al. Integrated relationship of nasopharyngeal airway host response and microbiome associates with bronchiolitis severity. *Nat Commun*. 2022 Aug 30;13(1):4970. doi: 10.1038/s41467-022-32323-y. PMID: 36042194; PMCID: PMC9427849.
109. Rosas-Salazar C, Tang ZZ, Shilts MH, et al. Upper respiratory tract bacterial-immune interactions during respiratory syncytial virus infection in infancy. *J Allergy Clin Immunol*. 2022 Mar;149(3):966-976. doi: 10.1016/j.jaci.2021.08.022. Epub 2021 Sep 14. PMID: 34534566; PMCID: PMC9036861.
110. De Maio F, Buonsenso D, Bianco DM, et al. Comparative Fecal Microbiota Analysis of Infants With Acute Bronchiolitis Caused or Not Caused by Respiratory Syncytial Virus. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022 Mar 7;12:815715. doi: 10.3389/fcimb.2022.815715. PMID: 35330643; PMCID: PMC8940166.

111. Antunes KH, Stein RT, Franceschina C, et al. Short-chain fatty acid acetate triggers antiviral response mediated by RIG-I in cells from infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis. *EBioMedicine*. 2022 Mar;77:103891. doi: 10.1016/j.ebiom.2022.103891. Epub 2022 Feb 24. PMID: 35220042; PMCID: PMC8871125.
112. Zhou Y, Bacharier LB, Isaacson-Schmid M, et al. Azithromycin therapy during respiratory syncytial virus bronchiolitis: Upper airway microbiome alterations and subsequent recurrent wheeze. *J Allergy Clin Immunol*. 2016 Oct;138(4):1215-1219.e5. doi: 10.1016/j.jaci.2016.03.054. Epub 2016 May 18. PMID: 27339392; PMCID: PMC5056860.
113. Srinivasan M, Bacharier LB, Goss CW, et al. The azithromycin to prevent wheezing following severe RSV bronchiolitis-II clinical trial: Rationale, study design, methods, and characteristics of study population. *Contemp Clin Trials Commun*. 2021 Jun 9;22:100798. doi: 10.1016/j.conctc.2021.100798. PMID: 34189338; PMCID: PMC8219746.
114. Rosas-Salazar C, Shilts MH, 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 Clin Immunol*. 2018 Nov;142(5):1447-1456.e9. doi: 10.1016/j.jaci.2017.10.049. Epub 2018 Jan 10. PMID: 29330010; PMCID: PMC6039278.
115. Liwen Z, Yu W, Liang M, et al. A low abundance of *Bifidobacterium* but not *Lactobacillus* in the feces of Chinese children with wheezing diseases. *Medicine (Baltimore)*. 2018 Oct;97(40):e12745. doi: 10.1097/MD.00000000000012745. PMID: 30290688; PMCID: PMC6200502.
116. Zhang X, Zhang X, Zhang N, et al. Airway microbiome, host immune response and recurrent wheezing in infants with severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Pediatr Allergy Immunol*. 2020 Apr;31(3):281-289. doi: 10.1111/pai.13183. Epub 2020 Jan 22. PMID: 31788862.
117. Dumas O, Erkkola R, Bergroth E, et al. Severe Bronchiolitis Profiles and Risk of Developing Recurrent Wheezing by Age 3 Years. *J Allergy Clin Immunol*. 2022 Apr;149(4):1281-1285.e1. doi: 10.1016/j.jaci.2021.08.035. Epub 2021 Oct 5. PMID: 34624392.
118. Mansbach JM, Luna PN, Shaw CA, et al. Increased *Moraxella* and *Streptococcus* species abundance after severe bronchiolitis is associated with recurrent wheezing. *J Allergy Clin Immunol*. 2020 Feb;145(2):518-527.e8. doi: 10.1016/j.jaci.2019.10.034. Epub 2019 Nov 15. PMID: 31738994; PMCID: PMC7010548.
119. Raita Y, Pérez-Losada M, Freishtat RJ, et al. Integrated omics endotyping of infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis and risk of childhood asthma. *Nat Commun*. 2021 Jun 14;12(1):3601. doi: 10.1038/s41467-021-23859-6. PMID: 34127671; PMCID: PMC8203688.
120. Raita Y, Pérez-Losada M, Freishtat RJ, et al. Nasopharyngeal metatranscriptome profiles of infants with bronchiolitis and risk of childhood asthma: a multicentre prospective study. *Eur Respir J*. 2022 Jul 13;60(1):2102293. doi: 10.1183/13993003.02293-2021. PMID: 34916264; PMCID: PMC9206513.

121. Zhu Z, Camargo CA Jr, Raita Y, et al. Nasopharyngeal airway dual-transcriptome of infants with severe bronchiolitis and risk of childhood asthma: A multicenter prospective study. *J Allergy Clin Immunol*. 2022 Oct;150(4):806-816. doi: 10.1016/j.jaci.2022.04.017. Epub 2022 Apr 26. PMID: 35483507; PMCID: PMC9547815.
122. Basile V, Di Mauro A, Scalini E, et al. Lung ultrasound: a useful tool in diagnosis and management of bronchiolitis. *BMC Pediatr*. 2015 May 21;15:63. doi: 10.1186/s12887-015-0380-1. PMID: 25993984; PMCID: PMC4494717.
123. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J*. 2012 Aug;6(8):1621-4. doi: 10.1038/ismej.2012.8. Epub 2012 Mar 8. PMID: 22402401; PMCID: PMC3400413.
124. De Filippis F, Pellegrini N, Vannini L. High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome. *Gut*. 2016 Nov;65(11):1812-1821. doi: 10.1136/gutjnl-2015-309957. Epub 2015 Sep 28. PMID: 26416813.
125. Manuale di Infettivologia Neonatale, 3ª ed. – Tzialla, Pedicino, Stolfi, Antonio Delfino Editore, 2022.
126. Zama D, Totaro C, Biscardi L, et al. The Relationship between Gut Microbiota and Respiratory Tract Infections in Childhood: A Narrative Review. *Nutrients*. 2022 Jul 21;14(14):2992. doi: 10.3390/nu14142992. PMID: 35889952; PMCID: PMC9323999.
127. Camporesi A, Morello R, Ferro V, et al. Epidemiology, Microbiology and Severity of Bronchiolitis in the First Post-Lockdown Cold Season in Three Different Geographical Areas in Italy: A Prospective, Observational Study. *Children* 2022, 9, 491. <https://doi.org/10.3390/children9040491>.
128. Fabi M, Chessa MA, Panizza D, et al. Psoriasis and Cardiovascular Risk in Children: The Usefulness of Carotid Intima-Media Thickness. *Pediatr Cardiol*. 2022 Mar 22. doi: 10.1007/s00246-022-02869-1. Epub ahead of print. PMID: 35316356.
129. Fetta A, Di Pisa V, Ruscelli M, et al. Sleep in Children With Pallister Killian Syndrome: A Prospective Clinical and Videopolysomnographic Study. *Front Neurol*. 2021 Dec 16;12:796828. doi: 10.3389/fneur.2021.796828. PMID: 34975740; PMCID: PMC8716439.
130. Biagi C, Cavallo A, Rocca A, et al. Pulmonary and Extrapulmonary Manifestations in Hospitalized Children with Mycoplasma Pneumoniae Infection. *Microorganisms*. 2021 Dec 10;9(12):2553. doi: 10.3390/microorganisms9122553. PMID: 34946154; PMCID: PMC8707942.
131. Biserni GB, Scarpini S, Dondi A, et al. Potential Diagnostic and Prognostic Biomarkers for Adenovirus Respiratory Infection in Children and Young Adults. *Viruses*. 2021 Sep 21;13(9):1885. doi: 10.3390/v13091885. PMID: 34578465; PMCID: PMC8472906.

132. Rocca A, Zarbo C, Fabi M, et al. Case reports of annular erythema: A diagnostic clue of multisystem inflammatory syndrome in children related to coronavirus disease 2019? *J Dermatol*. 2021 Sep;48(9):e454-e455. doi: 10.1111/1346-8138.16019. Epub 2021 Jun 14. PMID: 34128580; PMCID: PMC8420359.
133. Dondi A, Fetta A, Lenzi J, et al. Sleep disorders reveal distress among children and adolescents during the Covid-19 first wave: results of a large web-based Italian survey. *Ital J Pediatr*. 2021 Jun 4;47(1):130. doi: 10.1186/s13052-021-01083-8. PMID: 34088351; PMCID: PMC8176278.
134. Rocca A, Biagi C, Scarpini S, et al. Passive Immunoprophylaxis against Respiratory Syncytial Virus in Children: Where Are We Now? *Int J Mol Sci*. 2021 Apr 2;22(7):3703. doi: 10.3390/ijms22073703. PMID: 33918185; PMCID: PMC8038138.
135. Ciuca C, Fabi M, Di Luca D, et al. Myocarditis and coronary aneurysms in a child with acute respiratory syndrome coronavirus 2. *ESC Heart Fail*. 2021 Feb;8(1):761-765. doi: 10.1002/ehf2.13048. Epub 2020 Dec 17. PMID: 33332751; PMCID: PMC7835580.
136. Biagi C, Dondi A, Scarpini S, et al. Current State and Challenges in Developing Respiratory Syncytial Virus Vaccines. *Vaccines (Basel)*. 2020 Nov 11;8(4):672. doi: 10.3390/vaccines8040672. PMID: 33187337; PMCID: PMC7711987.
137. Biagi C, Rocca A, Poletti G, et al. Rhinovirus Infection in Children with Acute Bronchiolitis and Its Impact on Recurrent Wheezing and Asthma Development. *Microorganisms*. 2020 Oct 21;8(10):1620. doi: 10.3390/microorganisms8101620. PMID: 33096703; PMCID: PMC7589781.
138. Lanari M, Chierighin A, Biserni GB, et al. Children and SARS-CoV-2 infection: innocent bystanders...until proven otherwise [published online ahead of print, 2020 Jun 25]. *Clin Microbiol Infect*. 2020;26(9):1130-1132. doi:10.1016/j.cmi.2020.06.017.
139. Biagi C, Scarpini S, Paleari C, et al. Impact of Guidelines Publication on Acute Bronchiolitis Management: 10-Year Experience from a Tertiary Care Center in Italy. *Microorganisms*. 2021 Oct 26;9(11):2221. doi: 10.3390/microorganisms9112221. PMID: 34835347; PMCID: PMC8625287.
140. Kolbe AR, Castro-Nallar E, Preciado D, et al. Altered Middle Ear Microbiome in Children With Chronic Otitis Media With Effusion and Respiratory Illnesses. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019 Oct 4;9:339. doi: 10.3389/fcimb.2019.00339. PMID: 31637220; PMCID: PMC6787523.
141. Laursen MF. Gut Microbiota Development: Influence of Diet from Infancy to Toddlerhood. *Ann Nutr Metab*. 2021 Aug 30:1-14. doi: 10.1159/000517912. Epub ahead of print. PMID: 34461613.