

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

SCUOLA DI DOTTORATO
in
“SCIENZE BIOMEDICHE CLINICHE E SPERIMENTALI”

DIPARTIMENTO
di Scienze Biomediche e Cliniche “Luigi Sacco”

CORSO DI DOTTORATO IN MALATTIE INFETTIVE

XXVI CICLO



**IMPATTO DI RINOVIRUS ED ENTEROVIRUS NELLA POLMONITE DI
COMUNITA' IN ETA' PEDIATRICA: STUDIO DEI CEPPI VIRALI
CIRCOLANTI E CORRELAZIONE CON IL QUADRO CLINICO**

MED/38 – MED/17

CLAUDIA TAGLIABUE matricola R09292

TUTOR

Dr. Stefano RUSCONI

COORDINATORE DEL DOTTORATO

Chiar.ma Prof.ssa Antonella D'ARMINO MONFORTE

ANNO ACCADEMICO 2012 – 2013

INDICE

1. INTRODUZIONE	pag. 3
1.1 La polmonite di comunità' in età pediatrica	
1.1.1 La diagnosi di CAP in età pediatrica	
1.1.2 I requisiti per l'ospedalizzazione	
1.1.3 Identificare i casi che necessitano della terapia	
2. CASISTICA PERSONALE.....	pag. 10
2.1 Premesse e scopo della tesi	
2.2 Materiali e metodi	
2.3 Risultati	
2.4 Discussione	
3. BIBLIOGRAFIA.....	pag. 55

1. INTRODUZIONE

1.1 La polmonite di comunità in età pediatrica

La polmonite di comunità (Community-Acquired Pneumonia, CAP) è una delle principali cause di mortalità in età pediatrica nei Paesi in via di sviluppo e, nonostante la disponibilità di misure di prevenzione e trattamento efficaci, rimane una causa importante di morbidità e ospedalizzazione nei Paesi industrializzati [1]. Diversi tentativi sono stati effettuati per stendere delle linee guida ufficiali per la razionalizzazione e standardizzazione dell'approccio alla CAP [2, 3], e una dettagliata analisi di queste sottolinea il fatto che, nonostante ciascuna di esse definisca il problema come risolto, le diverse soluzioni suggerite raramente sono basate su evidenze di elevata qualità. È importante assicurare che tutti i bambini con un quadro sospetto o confermato di CAP ricevano il più appropriato trattamento e abbiano la più elevata probabilità di cura.

1.1.1 La diagnosi di CAP in età pediatrica

Uno dei problemi principali della CAP in età pediatrica è quello della sua diagnosi. La CAP è solitamente definita come la presenza di segni e sintomi di patologia polmonare in un bambino precedentemente sano causata da un'infezione acquisita fuori dall'ospedale [2, 3]. In accordo con le indicazioni dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO), la presenza di tosse o difficoltà nel respirare e la presenza di tachipnea (corretta per età) sono parametri clinici sufficienti per la diagnosi di CAP da lieve a moderata [4]. Comunque, poiché questi aspetti si possono riscontrare in diverse patologie a carico delle basse vie aeree, una diagnosi di CAP è fatta frequentemente in modo erraneo, e ciò ha delle conseguenze negative in termini di richiesta di esami di laboratorio e radiologici, richiesta di ospedalizzazione e, soprattutto, prescrizione di terapie antibiotiche.

La bassa sensibilità che i parametri fisici hanno nell'identificare le CAP lievi o moderate è stata chiaramente sottolineata in un recente studio sull'associazione tra storia clinica e parametri fisici e i casi di CAP con conferma radiologica, la quale ha mostrato come nessun parametro fisico era perfettamente sensibile in età pediatrica [5]. Inoltre, Bilkis *et al.* [6] hanno mostrato che la combinazione di febbre, rantoli localizzati, riduzione del

murmure vesciolaree tachipnea erano associati con una polmonite radiologicamente dimostrata solo nel 69% dei casi. Spesso si è pensato che il numero di errori commessi nella diagnosi di CAP possa essere ridotto attraverso l'uso sistematico della radiografia del torace in tutti i bambini con sospetto di CAP. Sfortunatamente questo approccio evidenzia i cambiamenti a livello polmonare indicativi di CAP in meno del 20% dei bambini con CAP da lieve a moderata [1]. Inoltre, l'interpretazione del dato radiologico in bambini con sospetto di CAP varia enormemente, persino in radiologi esperti, soprattutto in presenza di un infiltrato interstiziale [7]. L'esposizione a radiazioni non necessarie dovrebbe essere evitata per il potenziale rischio associato di indurre cancerogenesi [1]. Questo spiega perché tutti gli esperti pensano che la radiografia del torace eseguita di routine non sia essenziale per confermare la diagnosi di una sospetta CAP in bambini che siano in buone condizioni tali da poter essere trattati a domicilio, ma dovrebbe essere fortemente raccomandata nei bambini con quadro respiratorio grave poiché il quadro radiologico può non solo confermare la diagnosi ma anche documentare le caratteristiche degli infiltrati parenchimali e la presenza di eventuali complicanze. Questo significa che la diagnosi di CAP in soggetti con segni e sintomi lievi rimane un problema difficile ed è possibile che un numero considerevole di soggetti senza CAP (soprattutto quelli gestiti a domicilio) siano trattati nello stesso modo di quelli con la patologia (determinando così dei trattamenti antibiotici non necessari).

1.1.2 I requisiti per l'ospedalizzazione

Le linee guida ufficiali indicano che i bambini con CAP da moderata a grave debbano essere ospedalizzati [2, 3]. L'ospedalizzazione è raccomandata per i bambini più piccoli con sospetto di CAP batterica, per i bambini con sospetto di CAP dovuta a patogeni più aggressivi come *Staphylococcus aureus* e bambini che non possano adeguatamente essere seguiti a domicilio [3]. La Tabella 1 riassume i criteri per l'ospedalizzazione. Comunque, in molti casi, non è possibile inserire i diversi soggetti in uno di questi gruppi poiché la definizione di gravità può essere incerta, e spesso non è possibile distinguere tra forme batteriche e forme virali di CAP o valutare la patogenicità dell'agente(i) infettivo(i) coinvolto(i). Infine, la capacità della famiglia di seguire le prescrizioni mediche non sempre è facile da stabilire. Di conseguenza, un numero maggiore rispetto al necessario di bambini vengono ospedalizzati poiché, nei casi dubbi, i pediatri preferiscono evitare rischi e preferiscono tenere il bambino sotto stretta osservazione.

Diversi tentativi sono stati fatti per correlare i dati clinici con la severità di malattia. Comunque, diversamente dal soggetto adulto, non vi è nessun sistema di *score* validato che possa predire quali bambini abbiano una CAP sufficientemente grave da richiedere una ospedalizzazione [1,2,3,]. Inoltre, i criteri della WHO che definiscono la gravità sulla base della presenza e rilevanza di alcuni segni e sintomi clinici si applicano a tutti i tipi di infezione delle basse vie aeree e non sono stati validati per la CAP pediatrica [4]. L'ipossiemia è solitamente considerata l'indice più importante di valutazione per la necessità di ospedalizzazione ma, benchè sia frequente in pazienti con CAP grave, può essere del tutto assente nei casi di CAP moderata. Inoltre, gli esperti non trovano accordo sui valori di *cut-off* che identificano i casi che necessitano di ospedalizzazione: la maggior parte considera un marker per l'ospedalizzazione immediata una saturazione dell'ossigeno che sia inferiore al 90% in aria ambiente al livello del mare in un soggetto precedentemente sano [8,9], ma alcuni preferiscono considerare come *cut-off* un valore di saturazione pari al 93% se associato ad una temperatura corporea superiore ai 39°C, tachicardia e ad un refill capillare superiore ai 2 secondi [10]. Inoltre, benchè la maggior parte degli esperti considerino la giovane età un altro fattore di rischio associato a CAP grave, non vi è accordo generale riguardo all'età al di sotto della quale l'ospedalizzazione sia necessaria [1,2,3]. Alcuni suggeriscono che i bambini sotto i tre mesi di vita debbano essere sempre ospedalizzati, mentre altri indicano un età di 6 mesi [1,2,3].

TABELLA 1. Criteri per l'ospedalizzazione in bambini con CAP

Distress respiratorio	Tachipnea SatO ₂ <90–93% in aria ambiente (se sono richieste una FiO ₂ > 0,50 per mantenere una saturazione>92%, cure intensive o monitoraggio cardiorespiratorio continuo) Cianosi Rientramenti Alitamento delle pinne nasali
Refill capillare superiore ai 2 secondi	
Disidratazione	
Vomito/ inappetenza	
Comorbidità	

Agente eziologico (es. MRSA, co-infezione batterica/virale)	
Ambiente familiare non affidabile	

MRSA, *Staphylococcus aureus* meticillino- resistente.

1.1.3 Identificare i casi che necessitano della terapia

Teoricamente, gli antibiotici dovrebbero essere dati solo in caso di CAP di origine batterica. In ogni modo, differenziare le forme di origine batterica da quelle di origine virale è molto difficile e molto spesso impossibile nei bambini più piccoli. Non vi sono esami ematici che possano essere considerati il test standard di riferimento per l'identificazione delle forme batteriche di CAP e nemmeno diversi tipologie di test possono essere del tutto informativi. La conta totale dei globuli bianchi non è specifica per la diagnosi di CAP e lo stesso è stato ampiamente dimostrato per le proteine di fase acuta, compresa la velocità di eritrosedimentazione e i livelli di proteina C-reattiva. Una meta-analisi di Flood *et al.* [11] ha concluso che la proteina C-reattiva era solo debolmente predittiva di una CAP di origine batterica poiché il valore predittivo positivo di una concentrazione compresa tra 40 e 60 mg/dL era solo del 64%. I valori sierici dell'procalcitonina, che sono stati trovati marcatamente elevati in casi pediatrici di CAP batterica grave e normali o solo lievemente modificati nei casi di CAP virali, non è molto efficace nel distinguere tra forme lievi o moderate di CAP batteriche e virali poiché i valori presentano un'ampia distribuzione [12, 13]. Identificare la causa di una CAP pediatrica è anche un problema quando metodi microbiologici sono utilizzati per identificare i batteri. Il rischio di complicanze limita la puntura polmonare, il lavaggio broncoalveolare e la biopsia toracoscopica solo ai casi complicati ed a rischio che non rispondono ad una terapia antibiotica adeguata [2, 14]. Le emocolture sono positive nel 13-26,5% dei bambini con CAP complicata, ma in meno del 5% di quelli con malattia lieve o moderata [15]. Il basso tasso di positività delle emocolture è dovuto al fatto che la maggior parte delle CAP non sono batteriemiche in origine e gli antibiotici sono dati frequentemente prima dell'ospedalizzazione [15, 16]. Le metodiche di biologia

molecolare possono aumentare la sensibilità nell'identificare i patogeni batterici nei campioni ematici, ma non sono utilizzati di routine [17,18]. La colorazione di Gram e la coltura dell'espettorato sono ampiamente utilizzati nel soggetto adulto per identificare i batteri responsabili di CAP, ma in età pediatrica (soprattutto nel primo anno di vita) la quantità di campione fornita per l'analisi non è sufficiente. Bambini per il resto sani frequentemente sono portatori nel nasofaringe di quei batteri che possono causare CAP [2,3] e così, quando viene indotto l'espettorato, vi può essere spesso la contaminazione così da rendere il risultato non valutabile [19]. Infine, la scarsa correlazione tra i batteri di cui un soggetto è portatore e i batteri coinvolti nella CAP, comporta che i dati derivanti dalla coltura delle secrezioni del nasofaringe non siano spesso affidabili per la diagnosi di CAP batterica [19]. E' molto difficile l'identificazione dei batteri atipici come causa di CAP. La coltura delle secrezioni respiratorie per l'identificazione di *Mycoplasma pneumoniae* non è praticabile nella maggior parte dei laboratori di diagnostica poiché richiede specifici terreni di coltura e la lenta crescita del batterio richiede un tempo troppo lungo per poter ottenere informazioni utili per l'applicazione terapeutica. I metodi sierologici (in particolare i test immunoenzimatici) possono identificare le immunoglobuline specifiche di tipo IgG e IgM, e la loro sensibilità e specificità è buona se valutate in due campioni raccolti rispettivamente nella fase acuta e nella fase di convalescenza [20]. Tuttavia, ancora una volta, tali test, benchè utili dal punto di vista epidemiologico, non sono utilizzabili nella pratica di routine per decisioni terapeutiche. Infine, le tecniche di *polymerase chain reaction* (PCR), benchè teoricamente molto sensibili e specifiche, non sono prontamente disponibili o di facile realizzazione e quindi non sono considerate un test standard per l'identificazione di *M. pneumoniae* [2,3].

La possibilità di una associazione tra virus e batteri in soggetti con infezioni respiratorie e il loro diverso ruolo nel determinare lo sviluppo e l'andamento di una CAP è chiaramente esemplificato dai dati riguardanti le complicanze dell'infezione da virus influenzali. E' stato dimostrato come una significativa proporzione dei soggetti deceduti durante l'epidemia di influenza spagnola era dovuta ad un'infezione batterica secondaria determinante una CAP, con *S. pneumoniae* come causa principale di un *outcome* sfavorevole di patologia [21, 22]. Più recentemente, è stato riscontrato che un numero considerevole di bambini con infezione da virus influenzale pandemico A/H1N1/2009 che hanno sviluppato un'insufficienza respiratoria che abbia necessitato

di un ricovero in terapia intensiva pediatrica, presentavano una coinfezione precoce da *S. aureus* [23]. Inoltre, la possibilità di una coinfezione virale- batterica è stata mostrata non solo nel caso dei virus influenzali ma anche per altri virus, quali ad esempio il virus respiratorio sinciziale (RSV). Levin *et al.* [24] hanno mostrato che la maggior parte dei loro pazienti pediatrici con necessità di ventilazione in corso di infezione da RSV presentava una concomitante infezione batterica documentata dalla presenza del batterio patogeno nella coltura dell'aspirato tracheale.

Infine, la radiografia del torace non è apparsa molto utile nel differenziare le CAP batteriche da quelle virali [25]. Un tempo considerate patognomiche di un'infezione batterica, le CAP alveolari sono state frequentemente riscontrate in pazienti con un'infezione virale documentata [26,27]. Inoltre, l'RX del torace non è sempre utile nel distinguere tra CAP dovute ad infezione da batteri tipici da quelle da batteri atipici [2,3]. In conclusione, identificare la causa di una CAP pediatrica non è spesso possibile, soprattutto nelle forme lievi o moderate, e ciò può portare spesso ad inutili prescrizioni antibiotiche.

È possibile stendere delle raccomandazioni per la maggior parte dei problemi che insorgono in bambini con CAP grave, i quali vengono identificati sulla base di parametri clinici e che possono essere rapidamente ospedalizzati mentre vengono sottoposti a tutti i necessari esami di laboratorio e strumentali. In ogni modo, l'identificazione dell'agente causale non è semplice in molti di questi casi poiché i metodi microbiologici e radiologici attualmente disponibili sono spesso incapaci di informazioni precise (almeno nei primi giorni di malattia), e così spesso vengono prescritte terapie antibiotiche combinate.

Dall'altro lato, l'approccio raccomandato per le forme lievi-moderate (le più comuni in età pediatrica), è sempre basato principalmente su evidenze di bassa o moderata qualità. Ciò può condurre ad un numero esagerato di diagnosi e di ospedalizzazioni, ad un aumento nelle prescrizioni di terapie antibiotiche non necessarie, che può determinare conseguenze significative dal punto di vista medico e socio-economico. Tuttavia esistono delle lacune nell'ambito della gestione della CAP che dovrebbero essere colmate. (Tabella 2).

TABELLA 2. Lacune nella gestione della CAP in età pediatrica.

Lacune nella diagnosi	La diagnosi di CAP in bambini con segni e sintomi lievi rimane un problema diagnostico
Lacune nei criteri per l'ospedalizzazione	La definizione di gravità della CAP può rimanere incerta La capacità della famiglia di seguire le indicazioni prescritte non sempre è di facile definizione Non vi è uno score validato per predire quali bambini hanno una CAP sufficientemente grave da richiedere l'ospedalizzazione Gli esperti non hanno accordo sul cut-off del livello di ipossiemia che indentifica i casi che necessitano di ospedalizzazione Non vi è un accordo generale riguardo all'età al di sotto della quale l'ospedalizzazione è necessaria
Lacune nell'identificazione dei casi che necessitano di trattamento antibiotico	Frequentemente non è possibile distinguere tra CAP di origine batterica da quelle di origine virale Spesso è difficile valutare la virulenza di un agente infettivo Non vi è un test ematico che possa essere considerato lo standard di riferimento per identificare le Cap di origine batterica e talvolta anche multipli test possono essere non esaustivi RX del torace non è molto efficace nel differenziare tra casi lievi e moderati di CAP batteriche e virali
Lacune nella terapia antibiotica	Un certo numero di casi di CAP riceve un trattamento errato Un problema aperto rimane la durata della terapia antibiotica

2. CASISTICA PERSONALE

2.1 Premesse e scopo della tesi

Conoscere l'eziologia delle CAP permette di formulare raccomandazioni per il trattamento ed implementare le misure di prevenzione. Inoltre, la valutazione dell'importanza di ciascun singolo patogeno può anche contribuire ad incrementare la nostra comprensione sulla patogenesi della malattia. I virus sono stati a lungo considerati i patogeni principalmente coinvolti nell'eziologia delle CAP, soprattutto in bambini di età inferiore ai 5 anni [28, 29]. A causa, però, della limitata sensibilità e specificità delle precedenti tecniche di diagnostica virologica basate sulle colture o sulla microscopia ad immunofluorescenza e sulla valutazione della risposta anticorpale in coppie di campioni di siero, un numero rilevante di casi di CAP non trovava una diagnosi eziologica. I recenti progressi della diagnostica molecolare hanno reso possibile l'identificazione di agenti virali precedentemente sconosciuti e la definizione più precisa dell'epidemiologia delle più comuni infezioni respiratorie virali [30], ma rimangono aperte ancora molte domande riguardo il ruolo dei virus nelle CAP pediatriche. Poco si sa circa la reale prevalenza di alcune infezioni virali, soprattutto di quei virus di più recente indentificazione, e la frequenza e l'importanza delle coinfezioni virali non è stata ancora totalmente studiata. Per poter rispondere a queste domande sono necessari studi che utilizzino metodi che permettano l'identificazione del maggior numero di potenziali agenti virali patogeni.

Un altro problema aperto rimane la distinzione tra eziologia virale e batterica di una CAP, soprattutto in bambini nel primo anno di vita [31]. Ciò ha un certo numero di implicazioni dal punto di vista pratico, la più importante delle quali riguarda l'utilizzo o meno della terapia antibiotica. Per poter superare questo problema e permettere una valutazione precisa dell'impatto che i vaccini coniugati contro *Haemophilus influenzae* di tipo b (Hib) e *Streptococcus pneumoniae* hanno sulla incidenza di CAP, la WHO ha prodotto una definizione di caso per la CAP causata da questi due batteri basata su una comune interpretazione della radiografia del torace (prima pubblicazione nel 2001 [32] e poi confermata nel 2005 [33]). In particolare, si afferma che la chiara dimostrazione di

un coinvolgimento polmonare alveolare indica che la CAP è probabilmente dovuta ad uno di questi batteri. Successivi studi sui vaccini pneumococcici hanno confermato come l'uso di questa definizione di caso identifichi la maggior parte dei casi di CAP dovuti a *S. pneumoniae* [34, 35]. Nel trial gambiense [34], l'efficacia misurata del vaccino pneumococcico coniugato (PCV) nei confronti dei casi di CAP confermata radiologicamente e definita sulla base dei criteri della WHO era del 37%, il che indica che la specificità della definizione di caso è molto alta particolarmente se si pensa che l'efficacia del vaccino contro tutte le forme pneumococciche invasive era solo del 50%.

Comunque, la CAP alveolare è stata descritta anche in bambini con una o più infezioni respiratorie virali nelle vie aeree superiori [36, 26, 27], come vederemo in seguito. Il reale significato del coinvolgimento alveolare in questi casi non è stato ancora ben stabilito poiché non si conosce se i virus possano di per se causare tali alterazioni polmonari (seppur raramente) o se tale aspetto sia dovuto principalmente ad una coinfezione batterica/virale nella quale il batterio gioca un ruolo di primo piano nel determinare il danno alveolare.

Le coinfezioni virali/batteriche sono state più volte descritte in bambini con CAP [37-41] e tra gli agenti più spesso coinvolti vi erano *S. pneumoniae* con rhinovirus (RV) e virus respiratorio sinciziale (RSV). Benchè vi sia una certa evidenza che le infezioni miste virali e batteriche possano indurre una patologia più grave che la singola infezione virale o batterica [42, 43], è importante dal punto di vista terapeutico chiarificare il vero significato di un reperto radiografico di coinvolgimento alveolare in bambini con CAP e infezione virale. La colonizzazione nasofaringea da pneumococco in bambini sani è frequente, ma la colonizzazione è significativamente più frequente [44] e la carica di pneumococco significativamente maggiore [45] in bambini con CAP. E' stato trovato che soggetti con co-infezione virale e da *S. pneumoniae* mostrano persino una maggiore probabilità di colonizzazione batterica nasofaringea [45]. Tutti questi dati suggeriscono che la valutazione di *S. pneumoniae* nel nasofaringe di bambini con CAP alveolare ed infezione virale può essere un utile strumento per l'identificazione dei casi di eziologia mista pneumococcica e virale e di questi pazienti che realmente necessitano di una terapia antibiotica nonostante la concomitante infezione virale.

Lo scopo dello studio è stato quello di descrivere i dati raccolti da bambini con CAP radiologicamente confermata nei quali è stata effettuata l'analisi delle secrezioni

respiratorie, raccolte durante la fase acuta della malattia, per 17 virus respiratori attraverso la metodica Luminex xTAG Respiratory Virus Panel (RVP) Fast Assay.

Inoltre, sui campioni raccolti è stata eseguita un'analisi specifica relativamente alla circolazione dei RV e delle diverse specie e genotipi presenti. Studi recenti hanno, infatti, evidenziato come tali virus siano la causa principale non solo del raffreddore comune (come si pensava sin dal momento in cui furono identificati per la prima volta alcune decadi fa), ma anche tra gli agenti eziologici delle infezioni delle vie aeree inferiori (IVAI), come la bronchiolite e la CAP [26, 27, 46, 47, 48, 49], e spesso trovati in associazione con le riacacerbazioni asmatiche [50, 51]. Questi aspetti hanno così aumentato l'interesse per tali virus per poter meglio definirne l'epidemiologia e poter chiarire la possibile associazione tra alcuni sottotipi specifici e lo sviluppo di forme respiratorie gravi. Diversi studi epidemiologici condotti su popolazioni adulte e pediatriche hanno trovato che genotipi diversi di RV circolano contemporaneamente in un dato periodo di tempo in una specifica area geografica, in particolare i RV appartenenti ai sottotipi A e C [26, 27, 49, 52, 53, 54, 55]; inoltre, i genotipi appartenenti al sottotipo A erano principalmente associati a CAP e quelli appartenenti al sottotipo C erano principalmente associati a wheezing. Tuttavia, la maggior parte di questi studi sono stati condotti su un solo anno e hanno coinvolto un ridotto numero di casi, e solo pochi di essi hanno analizzato nello specifico le IVAI. Di conseguenza, pochi sono i dati relativamente alla circolazione dei HRV su un lungo periodo di tempo o sul ruolo reale delle diverse specie e genotipi nel determinare le IVAI.

Ci siamo, inoltre, concentrati sulla caratterizzazione delle sequenze di alcuni Enterovirus C-104 (EV-C104) (5 sequenze) provenienti dalla nostra casistica. EV-C104 è un membro della specie degli *Enterovirus umani C* (Famiglia *Picornaviridae*, genere *Enterovirus*) insieme ad altri 23 tipi. Il genoma di EV-C104, che ha una lunghezza di circa 7300 nucleotidi (nt), consiste di una singola catena (ORF, *open reading frame*) racchiusa dai terminali 5' e 3' non letti (UTR). La sequenza principale consiste di una regione codificante la proteina strutturale P1 (VP4-VP2-VP3-VP1) seguite dalle regioni P2 (2A-2B-2C) e P3 (3A-3B-3C-3Dpol) non strutturali [56,57,58]. La proteina VP1 è localizzata sulla superficie del virione e mostra la maggior variabilità di sequenza se confrontata con le altre regioni genomiche. Comprendere l'evoluzione del gene VP1 potrebbe fornire nuove informazioni relativamente all'origine di EV-C104. Inoltre,

l'analisi genomica completa potrebbe fornire ulteriori informazioni sulle caratteristiche genetiche di tale virus. Al momento, solo due sequenze genomiche complete di EV-C104 identificate in Svizzera e Giappone, sono state depositate nella GenBank. Si è così indagato sulla relazione filogenetica tra le sequenze analizzate e le altre EV-C note.

Per aggiungere informazioni relativamente alla conoscenza dei casi di co-infezione batterica/virale, poiché RSV e RV sono le più comuni cause di infezione respiratoria nei bambini, sono stati studiati nel dettaglio i soggetti con CAP confermata radiologicamente e infezione da RSV o da RV.

2.2 Materiali e metodi

1. Arruolamento dei pazienti

Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico della Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano ed è stato condotto nel Dipartimento di Scienze Materno – Infantili dell'Università di Milano tra il primo Novembre e il 30 Aprile di quattro anni consecutivi (2007-2008, 2008- 2009, 2009-2010, 2010-2011). E' stata richiesta la firma del consenso informato da parte dei genitori o rappresentanti legali del soggetto, mentre ai bambini più grandi è stato richiesto di dare il loro consenso. Relativamente all'analisi specifica sui RV sono stati utilizzati i campioni raccolti nelle 4 stagioni sopradette e i campioni di secrezioni nasofaringee raccolti in una stagione successiva (dal 1 novembre 2011 al 30 giugno 2012). Relativamente ad Enterovirus, è stata eseguita, inoltre, una caratterizzazione genomica completa delle sequenze VP1 di cinque EV-C104 provenienti dalla nostra casistica (le sequenze MI46, MI560, MI1276 e MI1768); queste sono state analizzate insieme a sette sequenze provenienti da una casistica di Pavia, raccolte tra l'aprile 2009 e il maggio 2009, di pazienti ospedalizzati presso il Policlinico San Matteo di Pavia con un quadro respiratorio di modesta entità (le sequenze Pavia259-7712, Pavia260-9210, Pavia263-11230, Pavia264-16291, Pavia261-9570, Pavia68-10804B, e Pavia262-11228) [56, 57]. Il totale delle 12 sequenze EV-C104 analizzate può essere considerato rappresentativo di quelle circolanti nel Nord Italia.

Sono stati arruolati nello studio tutti i bambini di età compresa tra 1 mese e 14 anni visti presso il Pronto Soccorso (PS) del Dipartimento di Scienze Materno-Infantili e che si presentavano con febbre (temperatura ascellare $> 38^{\circ}\text{C}$), e segni e sintomi suggestivi di CAP (quali tosse, tachipnea, dispnea, o distress respiratorio e wheezing respiratorio associato a rantoli). I criteri di esclusione comprendevano le patologie croniche associate ad un aumentato rischio di infezioni respiratorie, inclusa a prematurità; patologie croniche dell'apparato cardiovascolare o polmonare, compreso l'asma; patologie croniche del metabolismo, compreso il diabete mellito; neoplasie; patologie renali od epatiche; emoglobinopatie; immunosoppressione; patologie richiedenti trattamenti prolungati con acido acetilsalicilico e disordini genetici o neurologici. Sono

stati esclusi anche i bambini con il sospetto di CAP nosocomiale (cioè con quadro di CAP che si presenta dopo 48 ore o più dall'ospedalizzazione o entro le due settimane dalla dimissione ospedaliera).

Tutte le radiografie del torace sono state valutate da un radiologo esperto in cieco che le ha classificate in accordo con i criteri della WHO per una interpretazione standardizzata delle radiografie del torace per la diagnosi di polmonite [32]. Le radiografie del torace sono state suddivise in: polmonite alveolare, polmonite non alveolare, o non presenza di polmonite. E' stata definita come polmonite alveolare una opacità densa di una parte o di tutto il lobo o dell'intero polmone, spesso contenente aria come evidenziato dalla broncografia e talvolta associata ad effusione pleurica [32].

Sono stati raccolti i campioni delle secrezioni respiratorie di bambini con un quadro radiologico che confermava la diagnosi di CAP. I campioni sono stati raccolti attraverso l'utilizzo di un tampone floccato nasofaringeo e conservati in un tubo contenente il media UTM-RT (Cat.No. 360c; Copan Italia, Brescia, Italia) [59, 60, 61, 62, 63]. Al momento dell'arruolamento sono state raccolte informazioni dettagliate riguardanti i dati demografici del paziente, la storia clinica e le manifestazioni cliniche della patologia; inoltre, è stato raccolto anche un campione ematico per valutare i paraetri di laboratorio quali la cota dei globuli bianchi, la proteina C-reattiva e l'emocoltura. Il trattamento farmacologico è stato scelto dal pediatra che ha valutato il paziente, in accordo con le linee guida della Società Italiana di Pediatria [64]. I bambini con patologia lieve sono stati inviati al domicilio con indicazioni dettagliate riguardo il proseguimento della terapia e la raccomandazione di tornare in ospedale in caso di persistenza della febbre o peggioramento dei segni e sintomi respiratori. I bambini con patologia grave o con scarsa affidabilità della famiglia circa la *compliance* alla terapia prescritta sono stati, invece, ospedalizzati.

Durante tutta l'ospedalizzazione sono stati raccolti i dati clinici quotidianamente e tutti i bambini (sia quelli ospedalizzati che quelli inviati al domicilio subito dopo l'arruolamento) sono stati rivalutati dopo 15 ± 2 giorni attraverso l'uso di un questionario standardizzato ed un esame clinico effettuato da personale formato, che ha raccolto informazioni riguardanti anche i contatti familiari e l'eventuale presenza di patologie simili in essi.

2. Identificazione virale

L'RNA o il DNA virale sono stati estratti dai campioni delle secrezioni respiratorie attraverso il sistema automatizzato di estrazione Nuclisens EasyMAG (Biomeri ux, Craponne, Francia) e sono stati poi testati utilizzando la metodica Luminex xTAG Respiratory Virus Panel (RVP) Fast Assay in accordo con le indicazioni dell'azienda (Luminex Molecular Diagnostics Inc., Toronto, ON, Canada). Tutti i reagenti necessari per xTAG RVP Fast sono stati forniti da Abbott GmbH & Co. (Wiesbaden-Delkenheim, Germania). Il test RVP Fast consiste di una singola PCR con *primers* marcati, seguita da uno *step* di ibridizzazione dei prodotti della PCR con marcatori fluorescenti e incubazione con i reagenti. La piastra   stata, quindi, analizzata utilizzando il sistema Bio-Plex 200 (Bio-rad laboratories, Milano, Italia) e con il suo software associato Luminex xPONENT versione 3.1 (Luminex Molecular Diagnostics Inc., fornito da Abbott). E' stata, quindi, calcolata l'intensit  media della fluorescenza (MFI) emessa dalla piastra. Una MFI sopra il valore base fornito dal produttore per un particolare target indicava un risultato positivo per quello specifico target. Le intensit  pi  basse della fluorescenza determinanti la positivit  sono state stabilite utilizzando Tag-It data analysis software (TDAS, Luminex).

Il test RVP Fast   in grado di identificare contemporaneamente il virus influenzale A (sototipi H1 e H3), il virus influenzale B, il virus respiratorio sinciziale (RSV)- A e -B, i parainfluenzavirus -1, -2, -3, e -4, adenovirus, metapneumovirus umano (hMPV), i coronavirus 229E, NL63, OC43, e HKU1, gli enterovirus/RV e il bocavirus umano [65, 66]. Il saggio, inoltre, testa un controllo interno positivo che viene aggiunto a ciascun campione al momento dell'estrazione (un fago di *Escherichia coli* MS2 RNA) e un controllo positivo della fase di replicazione aggiunto ad ogni piastra (batteriofago lambda DNA).

I campioni risultati positivi per enterovirus/rhinovirus sono stati poi ritestati per identificare i HRV. Questo test di real-time PCR   stato eseguito usando iAg-Path-ID one-step RT-PCR Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), e le sequenze dei primers e dei probe sono quelle indicate da Lu *et al.* Ciascuna miscela di reazione da

25 µl conteneva 1 µm di primers per la sequenza forward e reverse, 0,1 µm di probe, e 5 µl di estratto di acido nucleico. L'amplificazione è stata effettuata utilizzando il sistema 7900 HT Fast real-Time PCR (Applied Biosystems) e con le seguenti condizioni di temperatura: 10 minuti a 48°C per la trascrittasi inversa, 3 minuti a 95°C per l'attivazione della polimerasi, e poi 45 cicli di 15 secondi ciascuno a 95°C e 1 minuto a 60°C. Ciascuna processazione prevedeva sia template che non-template controlli.

3. Sequenziamento, filogenesi e classificazione di RV

La parte ipervariabile di 5' NCR (regione non-codificante), l'intero gene VP4 e il terminale 5' del gene VP2 nei campioni RV-positivi sono stati amplificati attraverso tecniche di RT-PCR, come precedentemente descritto [26, 67]. I prodotti della PCR sono stati purificati utilizzando il sistema Wizard SV Gel e PCR Clean-up (Promega, Milano, Italia) e poi sequenziati in entrambe le direzioni utilizzando gli stessi *forward* e *reverse primers* di quelli utilizzati nella PCR. Le sequenze nucleotidiche sono state ottenute attraverso il sequenziamento automatizzato del DNA utilizzando l'analizzatore genetico ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Le sequenze così determinate sono state caricate utilizzando il Sequencher software e allineate utilizzando il programma ClustalW integrato nel pacchetto MEGA versione 5.0 [68]. I frammenti analizzati erano 393 nt nella regione VP4/VP2. Il RV in ciascun campione è stato determinato sulla base dell'albero filogenetico e dal confronto di ciascun RV trovato con tutti i prototipi di RV codificanti per le proteine VP4/VP2 recuperati su GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). L'albero filogenetico è stato costruito utilizzando il metodo *neighbour-joining* e i parametri selezionati attraverso il programma MEGA. Branch support was assessed by means of bootstrap analysis with 1000 replicates. I genotipi sono stati assegnati sulla base del loro raggruppamento con sequenze note di riferimento presenti su GenBank. La distanza genetica tra ed entro RV-A, RV-B e RV-C è stata testata utilizzando il programma MEGA e confrontata attraverso il test statistico t-Student. I grafici sono stati costruiti utilizzando GraphPad Prism versione 5.01 per Windows (GraphPAD Software, San Diego, CA).

Le 151 sequenze VP4/VP2 descritte in questo studio sono state depositate in GenBank sotto il numero di accesso KF427709 – KF427859.

La quota rimanente di acido nucleico è stata poi conservata a -80°C e successivamente utilizzata per le analisi su pneumococco.

4. Analisi delle sequenze VP1 di EV-C104

L'RNA virale è stato estratto dai tamponi nasali attraverso il kit di estrazione automatizzato Nuclisens easyMAG™ (BioMerieux, Lione, Francia).

Il gene VP1 è stato amplificato utilizzando il kit di amplificazione SuperScriptIII One-Step RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, USA) e gli specifici *primers* EV-C104F1 5'-GGTACCCCTGAACACAGTGGATGCTG-3' e EV-C104R1 5' – GGCTAGCACGGTAATGGAGTCCTCGTA-3'. La sequenza nucleotidica, inclusi la 5'-UTR, 3-UTR e l'intera sequenza codificante le proteine sono state ottenute attraverso tre amplificazioni. I *primers* sono stati disegnati sulla base dell'allineamento di due genomi completi di EV-C104 riportati nel database GenBank. Le reazioni di RT-PCR sono state eseguite utilizzando il kit di amplificazione SuperScriptIII One-Step RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, USA) con il seguente profilo termico: la sintesi di cDNA per 40 minuti a 58°C e 2 minuti a 94°C, amplificazione con 45 cicli a 94°C per 30 secondi, 58°C per 30 secondi e 68°C per 3 minuti. Le sequenze 5' e 3' sono state determinate utilizzando una rapida amplificazione dei terminali di cDNA (RACE) in accordo con le indicazioni (Roche, Mannheim, Germania). I prodotti purificati sono stati sequenziati utilizzando il kit BigDye Terminator Cycle-Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, USA) con il sequenziatore di DNA ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, Foster City, USA). Le sequenze sono state assemblate utilizzando il software Sequencher, versione 4.6 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, USA).

Il genoma completo delle sette sequenze italiane EV-C104 è stato confrontato con 28 sequenze genomiche complete di HEV-C. Le sequenze VP1 sono state confrontate con le sequenze di riferimento HEV-C.

Le sequenze sono state allineate utilizzando il software ClustalW integrato dentro il pacchetto MEGA versione 5.0. Il modello di sostituzione nucleotidica è stato stimato attraverso un rapporto di somiglianza gerarchica per ciascuna regione genomica analizzata. La ricostruzione dell'albero filogenetico è stata effettuata utilizzando il metodo della massima somiglianza e ha incluso parametri selezionati dal programma MEGA. Le ramificazioni sono state stabilite attraverso l'analisi di 1000 replicati. Valori

del 70% sono stati utilizzati come cut-off per l'analisi dei cluster. L'analisi Bootscan è stata utilizzata per identificare possibili ricombinazioni, utilizzando l'allineamento nucleotidico delle sequenze genomiche di EV-C104. I plot di similarità e le analisi di ricombinazione sono state eseguite con il software SimPlot, versione 3.5.1. L'analisi delle sequenze poliproteiche ORF di EV-C104 è stata effettuata utilizzando il server NetPicoRNA, versione 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPicoRNA>) per predire il sito di clivaggio proteasico.

Le sequenze nucleotidiche dei sette genomi di EV-C104 e dei cinque geni VP1 sono state depositate nel database Genbank.

5. Identificazione pneumococcica

Per poter identificare i casi positivi per pneumococco, i campioni positivi per RSV o RV sono stati testati per i geni autolisina-A (*LytA*) e *wzg* (*cpsA*) di *S.pneumoniae* attraverso tecniche di real-time PCR, come precedentemente descritto [69]. Ciascun campione è stato testato in triplicato ed è stato considerato positivo se almeno 2 dei 3 campioni testati risultava positivo. Per poter ottimizzare la sensibilità, nella reazione non è stato utilizzato nessun controllo interno di amplificazione, ma per ciascun campione testato vi era un controllo esterno. Tutti i campioni risultati positivi sono stati sierotipizzati utilizzando primers e probes disegnati sulla base delle sequenze depositate nel database GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) per i sierotipi 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F e 23F (i sierotipi contenuti nel vaccino antipneumococcico 13-valente coinugato, PCV 13) e sintetizzati da TIB Molbiol (Genova, Italia) come precedentemente descritto [69]. La loro specificità analitica era stata pre-valutata attraverso un sistema di analisi computerizzato utilizzando i software Primer-BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast) e BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov; Blast.cgi) per confrontare le sequenze con tutte le sequenze sotto "bacteria" e "homo sapiens".

La carica batterica di *S. pneumoniae* è stata quantificata attraverso test di real-time PCR indirizzate al gene *lytA* come sopra descritto [18]. È stata costruita una curva standard usando concentrazioni che variavano da 10 ad approssimativamente 10 milioni di copie genomiche di *S. pneumoniae* ATCC 49619. Il DNA genomico di *S. pneumoniae* è stato preparato come sopra descritto. Poiché il gene *lytA* è presente in

singola copia, il numero di copie misurate era considerato essere equivalente alla carica batterica.

2.3 Risultati

1. Analisi dei 17 virus respiratori circolanti

Durante i 4 anni dello studio, su un totale di 592 bambini arruolati (311 maschi; età media \pm DS 3,2 \pm 3 anni) con quadro di CAP confermato radiologicamente, 435 (73,5%) erano positivi per almeno un virus sul campione delle secrezioni dalle vie aeree. I virus sono stati trovati in 120/132 bambini di età < 1 anno (90,9%), 235/293 di età compresa tra 1 e 3 anni (80,2%), e 89/167 di età \geq 4 anni (47,9%; $p < 0,05$ nei confronti dei gruppi di bambini < 1 anno e tra 1 – 3 anni). Nove bambini (tutti negativi per virus respiratori nelle secrezioni) avevano un'emocoltura positiva (sei per *Streptococcus pneumoniae*, due per *Staphylococcus aureus* e uno per *Haemophilus influenzae* non tipizzabile). Poiché da un'analisi preliminare dei dati sulla prevalenza dei diversi virus respiratori non si evidenziava una differenza statisticamente significativa tra i diversi anni di studio, i dati raccolti nei 4 anni sono stati considerati insieme.

La Tabella 3 mostra i virus trovati differenziati per gruppo di età e per la presenza di una co-infezione virale. Il virus maggiormente rilevato era RSV, che è stato trovato in 188 bambini (31,7%), seguito da RV (n= 144, 24,3%), bocavirus (n= 60, 10,1%) virus influenzale (n= 57, 9,6%; sei casi di influenza stagionale A/H1N1, 17 A/H3N2, otto di virus influenzale B e 26 di influenza pandemica A/H1N1), hMPV (n=49, 8,2%), coronavirus (n=33, 5,6%; 20 OC43, 5 229E, 5 NL63 e 3 HKU1), enterovirus (n= 21, 3,5%), adenovirus (n= 11, 1,8%), e virus parainfluenzale (n= 11, 1,8%; 7 parainfluenza – 4, uno parainfluenza- 1, uno parainfluenza- 2 e uno parainfluenza – 3). Tra i bambini di età compresa tra 4 e 14 anni, RV era la più comune causa di infezione.

Tutti i virus oggetto della ricerca sono stati trovati sia come agenti isolati di infezione oppure in un quadro di co-infezione. L'incidenza di co-infezione diminuiva con l'età ed era significativamente più bassa in bambini di età compresa tra 4-14 anni (10/80, 12,5%) rispetto a quelli di età < 1 anno (42/120, 35,0%; $p < 0,05$) o di quelli di età tra 1 –

3 anni (65/235, 27,7%, $p < 0,05\%$). I virus coinvolti maggiormente nei quadri di co-infezione erano i coronavirus, che sono stati trovati insieme ad altri virus in 26/33 bambini (78,8%), seguiti dai bocavirus (45/60, 75%), parainfluenza virus (6/11, 54,5%), adenovirus (6/11, 54,5%), enterovirus (11/21, 52,3%), RV (66/144, 45,8%), RSV (76/188, 40,4%), hMPV (11/749, 22,4%), e virus influenzali (9/57, 15,8%).

TABELLA 3. Caratteristiche dei virus in bambini con CAP visti presso il PS.

Virus	Età <1 anno		Età 1–3 anni		Età 4–14 anni		Totale	
	Totale no, (%)	Co-infetti no, (%)	Total no, (%)	Co-infetti no, (%)	Totale no, (%)	Co-infetti no, (%)	Totale no, (%)	Co-infetti no, (%)
RSV	66 (11,1)	27 (40,9)	105 (17,7)	44 (41,9)	17 (2,9)	5 (29,4)	188 (31,7)	76 (40,4)
RV	41 (6,9)	26 (63,4)*	69 (11,6)	33 (47,8)*	34 (5,8)	7 (20,6)	144 (24,3)	66 (45,8)
Bocavirus	12 (2,0)	11 (91,7)	45 (7,6)	31 (68,9)	3 (0,5)	3 (100,0)	60 (10,1)	60 (10,1)
Virus Influenzali	13 (2,2)	4 (30,8)*	26 (4,4)	4 (15,4)*	18 (3,0)	1 (5,6)	57 (9,6)	9 (15,8)
A/H1N1s	1 (0,1)	0	4 (0,7)	2 (50,0)	1(0,1)	1 (100,0)	6 (1,0)	3 (50,0)
A/H3N2	3 (0,5)	1 (33,3)	8 (1,3)	1 (12,5)	6	0	17 (2,9)	2 (11,8)
B	2(0,3)	1 (50,0)	3 (0,5)	0	3 (0,5)	0	8 (1,3)	1 (12,5)
A/H1N1v	7 (1,2)	2 (28,6)	11 (1,8)	1 (9,1)	8 (1,3)	0	26 (4,4)	3 (11,5)
hMPV	15 (2,5)	4 (26,7)	25 (4,2)	6 (24,0)	9 (1,5)	1 (11,1)	49 (8,2)	11 (22,4)
Coronavirus	13 (2,2)	13 (100,0)*	14 (2,4)	11 (78,6)*	6 (1,0)	2 (33,3)	33 (5,6)	26 (78,8)
OC43	9 (1,5)	9 (100,0)	7 (1,2)	6 (85,7)	4 (0,7)	2 (50,0)	20 (3,4)	17 (85,0)
229E	1 (0,1)	1 (100,0)	3 (0,5)	2 (66,6)	1 (0,1)	0	5 (0,8)	3 (60,0)
NL63	3 (0,5)	3 (100,0)	2 (0,3)	1 (50,0)	0	0	5 (0,8)	4 (80,0)
HKU1	0	0	2 (0,3)	2 (100,0)	1 (0,1)	0	3 (0,5)	2 (66,6)
Adenovirus	3 (0,5)	3 (100,0)	7 (1,2)	2 (28,6)	1 (0,1)	1 (100,0)	11 (1,8)	6 (54,5)
Enterovirus	5 (0,8)	2 (40,0)	13 (2,2)	8 (61,5)	3 (0,5)	1 (33,3)	21 (3,5)	11 (52,4)
Parainfluenza	1 (0,1)	1 (100,0)	9 (1,5)	4 (44,4)	1 (0,1)	1 (100,0)	11 (1,8)	6 (54,5)
1	0	0	1 (0,1)	0	0	0	1 (0,1)	0
2	0	0	1 (0,1)	0	1 (0,1)	1 (100,0)	2 (0,3)	1 (50,0)

3	0	0	1 (0,1)	1 (100,0)	0	0	1 (0,1)	1 (100,0)
4	1(0,1)	1 (100,0)	6 (1,0)	3 (50,0)	0	0	7 (1,2)	4 (57,1)

RSV, virus respiratorio sinciziale; RV, rinovirus; hMPV, metapneumovirus umano;
 * $p < 0,05$ vs gruppo di età 4 – 14 anni;

La Tabella 4 riporta i dati sulla co-infezione virale trovata in 117 bambini (19,7% dei bambini arruolati nello studio e 26,9% di quelli con infezione virale rilevata): 96 erano infettati da due virus, 20 da tre virus, e un bambino da quattro virus. La forma più comune di co-infezione era quella che coinvolgeva RSV e RV (32 casi, 27,3%), RV e bocavirus (11 casi, 9,4%), RSV e coronavirus (11 casi, 9,4%) e RSV e bocavirus (10 casi, 8,5%).

TABELLA 4. Co-infezioni virali.

Associazione	Prevalenza, no, (%)
Co-infezione doppia	96/592 (16,2)
RSV + RV	32
RV + bocavirus	11
RSV + coronavirus	11
RSV + bocavirus	10
hMPV + bocavirus	4
RV + parainfluenza	4
RSV + influenza	3
Enterovirus + bocavirus	3
RSV + hMPV	2
RSV + enterovirus	2
Coronavirus + bocavirus	2
RV + adenovirus	2
RV + influenza	3
RSV + adenovirus	1
RV + hMPV	1
Influenza + Enterovirus	1
Adenovirus + bocavirus	1

Adenovirus + coronavirus	1
Parainfluenza + bocavirus	1
Parainfluenza + hMPV	1
Co-infezione tripla	20/592 (3,4)
RSV + RV + coronavirus	4
RSV + RV + bocavirus	3
RSV + bocavirus + enterovirus	3
RSV + bocavirus + coronavirus	3
RV + influenza + bocavirus	2
RSV + hMPV + enterovirus	1
RV + bocavirus + coronavirus	1
RV + adenovirus + coronavirus	1
RV + hMPV + coronavirus	1
hMPV + coronavirus + enterovirus	1
Co-infezione quadrupla	1/592 (0,2)
RSV + RV + bocavirus + coronavirus	1

RSV, virus respiratorio sinciziale; RV, rinovirus; hMPV, metapneumovirus umano;

La Tabella 5 descrive le caratteristiche dei casi di CAP associati a singola infezione virale. Per poter valutare un numero sufficientemente consistente di casi, abbiamo confrontato tra di loro i casi di singola infezione virale ritrovati in almeno 15 bambini. L'analisi delle differenze tra le infezioni da RSV, RV, influenza, hMPV e bocavirus ha mostrato che l'età media dei bambini con CAP RSV-positiva era significativamente più bassa dei casi con CAP RV- o influenza-positiva ($p < 0,05$); la febbre elevata ($\geq 39^{\circ}\text{C}$) era significativamente più frequente tra i bambini con CAP hMPV-positiva che tra quelli con CAP RV positiva ($p < 0,05$); i rantoli erano significativamente più frequenti tra i bambini con CAP RSV-, hMPV- e bocavirus positiva che tra quelli con CAP rinovirus-positiva ($p < 0,05$). I casi di CAP influenza-positiva mostravano una patologia simile tra i familiari significativamente più spesso rispetto ai casi RV- e bocavirus-positivi ($p < 0,05$). Non sono state rilevate altre differenze significative tra i diversi gruppi intermini di presentazione clinica o di *outcome* clinico.

Tra i parametri di laboratorio, i livelli di proteina C-reattiva erano significativamente più elevati nei casi rhinovirus-positivi che in quelli RSV- e influenza-positivi ($p < 0,05$); non c'erano differenze nella conta dei globuli bianchi.

In riferimento all'RX del torace, la polmonite alveolare era significativamente più frequente nei casi RV-positivi rispetto a quelli influenza- e hMPV-positivi ($p < 0,05$).

Le analisi multivariate hanno mostrato che i casi RV-positivi erano significativamente meno frequentemente associati a febbre (OR 0,37, 95% CI 0,21-0,63), rantoli (OR 0,37, 95% CI 0,21-0,63) o patologia simile in altri membri familiari (OR 0,37, 95% CI 0,19-0,72) rispetto ai casi RV-negativi. All'opposto, i casi hMPV-positivi erano significativamente più frequentemente associati a febbre (OR 3,11, 95% CI 1,24- 7,80) che i casi hMPV-negativi e i casi influenza-positivi erano più frequentemente associati a patologia simile nei famliari (OR 0,38, 95% CI 0,18- 0,80) che i casi influenza-negativi.

TABELLA 5. Variabili demografiche, cliniche, di laboratorio e radiografiche per singola infezione virale.

	RSV n = 112	RV n = 78	Influenza n = 48	hMPV virus n = 36	Bocavirus n = 15
Caratteristiche demografiche e cliniche					
Maschi	67 (59,8)	46 (59,0)	20 (41,7)	19 (52,8)	8 (53,3)
Età media \pm DS, anni	1,4 \pm 2,0 [^]	3,9 \pm 3,0	4,0 \pm 3,7	2,8 \pm 2,7	1,8 \pm 0,8
Presenza di febbre ^{**} (%)	110 (98,2)	71 (91,0)	47 (97,9)	36 (100)	14 (93,3)
Febbre di grado elevato ^{***} (%)	76 (67,9)	40 (51,3)	37 (77,1)	30 (83,3) [*]	8 (53,3)
Frequenza respiratoria, atti respiratori/min	60 \pm 6	58 \pm 7	55 \pm 9	57 \pm 7	56 \pm 6
SatO ₂ in aria ambiente, media % \pm DS	91 \pm 4	91 \pm 3	93 \pm 5	92 \pm 5	93 \pm 4
Caratteristiche cliniche					
Tosse	88 (78,6)	58 (74,4)	39 (81,3)	26 (72,2)	13 (86,7)
Ronchi	4 (3,6)	6 (7,7)	3 (6,3)	5 (13,9)	0
Rantoli	90 (80,4) [*]	52 (66,7)	36 (75,0)	31 (86,1) [*]	13 (86,7) [*]

Wheezing	30 (26,8)	22 (28,2)	9 (18,8)	11 (30,6)	8 (53,3)
Decorso clinico					
Tasso di ospedalizzazione, no, (%)	65 (58,0)	46 (59,0)	24 (50,0)	17 (47,2)	11 (73,3)
Durata dell'ospedalizzazione, giorni medi \pm DS	7,2 \pm 5,7	6,9 \pm 4,2	6,0 \pm 2,8	6,2 \pm 3,1	5,5 \pm 2,3
Uso di farmaci, no, (%)					
Antibiotici	109 (97,3)	78 (100)	44 (91,7)	36 (100)	15 (100,0)
Antipiretici	76 (79,2)	56 (80,0)	34 (82,9)	28 (77,8)	7 (63,6)
Aerosol	81 (84,4)	53 (75,7)	26 (63,4)	28 (77,8)	11 (100,0)
Assenza dalla comunità, giorni medi \pm DS	10,2 \pm 6,7	11,9 \pm 6,9	9,2 \pm 10,9	11,4 \pm 10,8	12,8 \pm 6,8
Patologia simile nei familiari	34 (30,4)	14 (18,0) [^]	26 (54,2)	16 (44,4)	1 (6,7) [^]
Parametri di laboratorio					
Globuli bianchi (cell/ μ l)	11 392 \pm 7652	15 545 \pm 7640	11 086 \pm 10 306	9453 \pm 5036	14 764 \pm 7059
Neutrofili(%)	50,0 \pm 18,5	64,5 \pm 18,2	48,9 \pm 22,0	49,3 \pm 15,1	62,6 \pm 16,3
Linfociti (%)	36,9 \pm 16,7	22,4 \pm 12,9	38,1 \pm 20,1	39,0 \pm 13,8	26,1 \pm 13,0
Monociti (%)	12,3 \pm 4,5	10,4 \pm 5,5	11,9 \pm 4,0	10,7 \pm 3,5	9,4 \pm 4,9
Basofili(%)	0,5 \pm 0,4	0,3 \pm 0,2	0,5 \pm 0,6	0,5 \pm 0,3	0,4 \pm 0,3
Eosinofili (%)	0,4 \pm 0,6	1,1 \pm 1,7	0,6 \pm 0,8	0,6 \pm 1,2	1,5 \pm 1,2
Proteina C-reattiva (mg/l)	25 \pm 44 [*]	71 \pm 100	24 \pm 39 [*]	23 \pm 25 [*]	17 \pm 18 [*]
Caratteristiche radiografiche					
Polmonite non-alveolare	61 (54,5)	37 (47,4) [^] “	35 (72,9)	27 (75,0)	7 (46,7)
Polmonite alveolare	51 (45,5)	41 (52,6) [^] “	13 (27,1)	9 (25,0)	8 (53,3)

RSV, virus respiratorio sinciziale; RV, rinovirus; hMPV, metapneumovirus umano; DS, deviazione standard;

p < 0,05 vs rinovirus; [^] p < 0,05 vs influenza; “ p < 0,05 vs hMPV;

** 38,0°C o oltre ad ogni momento del decorso della malattia (prima o al momento dell'arruolamento, o durante il follow-up)

*** 39,0°C o oltre ad ogni momento del decorso della malattia (prima o al momento dell'arruolamento, o durante il follow-up)

La Tabella 6 mostra le variabili demografiche, cliniche, di laboratorio e radiografiche associate con una singola infezione virale o in caso di co-infezione. La sola differenza significativa era l'età media (che era significativamente più alta nei bambini con singola infezione virale rispetto a quelli con co-infezione) ($p < 0,001$) e le caratteristiche radiografiche di polmonite alveolare, che era significativamente più frequente in bambini con co-infezione ($p < 0,05$). L'analisi multivariata ha mostrato che la sola associazione

significativa era la maggior frequenza di polmonite alveolare in bambini con co-infezione rispetto ai bambini con infezione singola (OR 1,72, 95% CI 1,05-2,81).

TABELLA 6. Variabili demografiche, cliniche, di laboratorio e radiografiche associate alla singola infezione virale e alla co-infezione.

	Virus singolo n= 318	Co-infezione n= 117	P value
Caratteristiche demografiche e cliniche			
Maschi	174 (54,7)	59 (50,4)	0,41
Età media \pm DS, anni	2,7 \pm 2,7	1,7 \pm 1,4	<0,001
Presenza di febbre* (%)	306 (96,2)	110 (94,0)	0,32
Febbre di grado elevato** (%)	213 (67,0)	73 (62,4)	0,37
Frequenza respiratoria, atti respiratori/min	57 \pm 8	58 \pm 7	0,82
SatO ₂ in aria ambiente, media % \pm DS	92 \pm 5	91 \pm 4	0,85
Caratteristiche cliniche			
Tosse	242 (76,1)	92 (78,6)	0,57
Ronchi	19 (6,0)	8 (6,8)	0,74
Rantoli	246 (77,4)	92 (78,6)	0,78
Wheezing	88 (27,7)	32 (27,4)	0,95
Decorso clinico			
Tasso di ospedalizzazione, no. (%)	181 (56,9)	59 (50,4)	0,23
Durata dell'ospedalizzazione, giorni medi \pm DS	6,9 \pm 4,6	7,1 \pm 4,5	0,80
Uso di farmaci, no. (%)			
Antibiotici (%)	311 (97,8)	116 (99,2)	0,69
Antipiretici (%)	222 (80,4)	89 (82,4)	0,66
Aerosol (%)	212 (76,8)	90 (83,3)	0,16
Assenza dalla comunità, giorni medi \pm DS	11,1 \pm 8,4	9,7 \pm 6,1	0,42
Patologia simile nei familiari	98 (30,8)	29 (24,8)	0,22
Parametri di laboratorio			
Globuli bianchi (cell/ul)	12 825 \pm 8050	13 707 \pm 7550	0,25
Neutrofili(%)	55,0 \pm 19,4	50,9 \pm 17,5	0,11
Linfociti (%)	32,4 \pm 17,0	35,9 \pm 15,2	0,09
Monociti (%)	11,3 \pm 4,8	11,7 \pm 4,5	0,31

Basofili(%)	0,4 ± 0,4	0,4 ± 0,5	0,50
Eosinofii (%)	0,6 ± 1,1	0,9 ± 1,3	0,09
Proteina C-reattiva (mg/l)	43 ± 66	38 ± 46	0,90
Caratteristiche radiografiche			
Polmonite non-alveolare	185 (58,2)	52 (44,4)	0,03
Polmonite alveolare	133 (41,8)	65 (55,6)	

; DS, deviazione standard;

** 38,0°C o oltre ad ogni momento del decorso della malattia (prima o al momento dell'arruolamento, o durante il follow-up)

*** 39,0°C o oltre ad ogni momento del decorso della malattia (prima o al momento dell'arruolamento, o durante il follow-up)

2. Sottotipi di RV circolanti, variazione genetica e clustering

Durante i 5 anni dello studio, sono stati arruolati 643 bambini con CAP confermata radiologicamente. Di questi, 469 (72,9%) erano positivi per almeno un virus nelle secrezioni respiratorie e 174 (27,1%) erano negativi. RV è stato identificato in 198 campioni (42,2%), nel 60% dei quali era presente come singolo agente virale. La regione VP4/VP2 è stata amplificata in 151 campioni (76,3%); i rimanenti 47 campioni (23,7%) sono stati esclusi dall'analisi filogenetica per la scarsa qualità delle sequenze. Tutti e tre i sottotipi circolanti di RV erano presenti nella popolazione in studio: il sottotipo RV-A è stato indentificato in 78 campioni (51,6%), RV-B in 14 campioni (9,3%), e RV-C in 59 (39,1%).

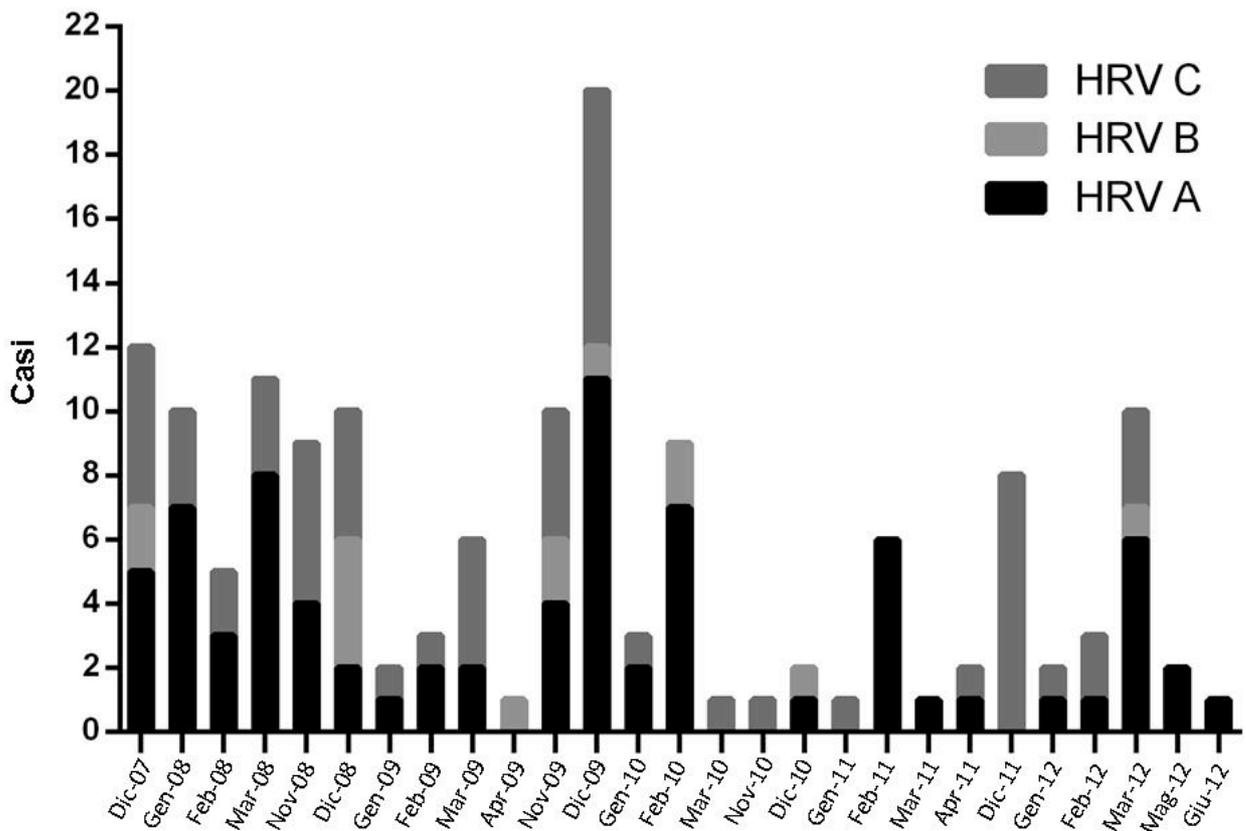
Come mostrato nella Tabella 7, 47 (31,1%) dei bambini con infezione da RV avevano un'età < 1 anno, 71 (47,0%) avevano un'età compresa tra 1 e 3 anni, e 33 (21,9%) avevano un'età superiore ai 4 anni. RV-A e RV-C erano presenti con uguale frequenza in soggetti di età < 1 anno (44,7% vs 42,6%), mentre era diversa in soggetti di età ≥ 4 anni (57,6% vs 30,3%). HRV-B era il sottotipo meno rappresentato in tutti e tre i gruppi di età.

TABELLA 7. Incidenza delle infezioni da RV nei diversi gruppi di età di bambini con CAP

Gruppo di età	No. di campioni (n=151)	No. (%) di campioni positivi		
		RV-A	RV-B	RV-C
< 1	47	21 (44,7%)	6 (12,8%)	20 (42,6%)
1-3	71	39 (54,9%)	4 (5,6%)	28 (39,4%)
≥ 4	33	19 (57,6%)	4 (12,1%)	10 (30,3%)

La Figura 1 mostra la distribuzione mensile delle specie di RV nei 5 anni di studio. RV-A e RV-C circolavano in quasi tutti i mesi in cui si è svolto studio senza alcun specifico pattern stagionale: i casi RV-A positivi erano frequentemente presenti in febbraio (20/26; 76,9%) e marzo (17/29; 58,6%), mentre i casi RV-C erano frequentemente presenti in dicembre (25/52; 48,1%). RV-B è stato riscontrato con sporadicità durante il periodo dello studio.

FIGURA 1. Distribuzione delle diverse specie di RV durate i 5 anni dello studio nei bambini con CAP



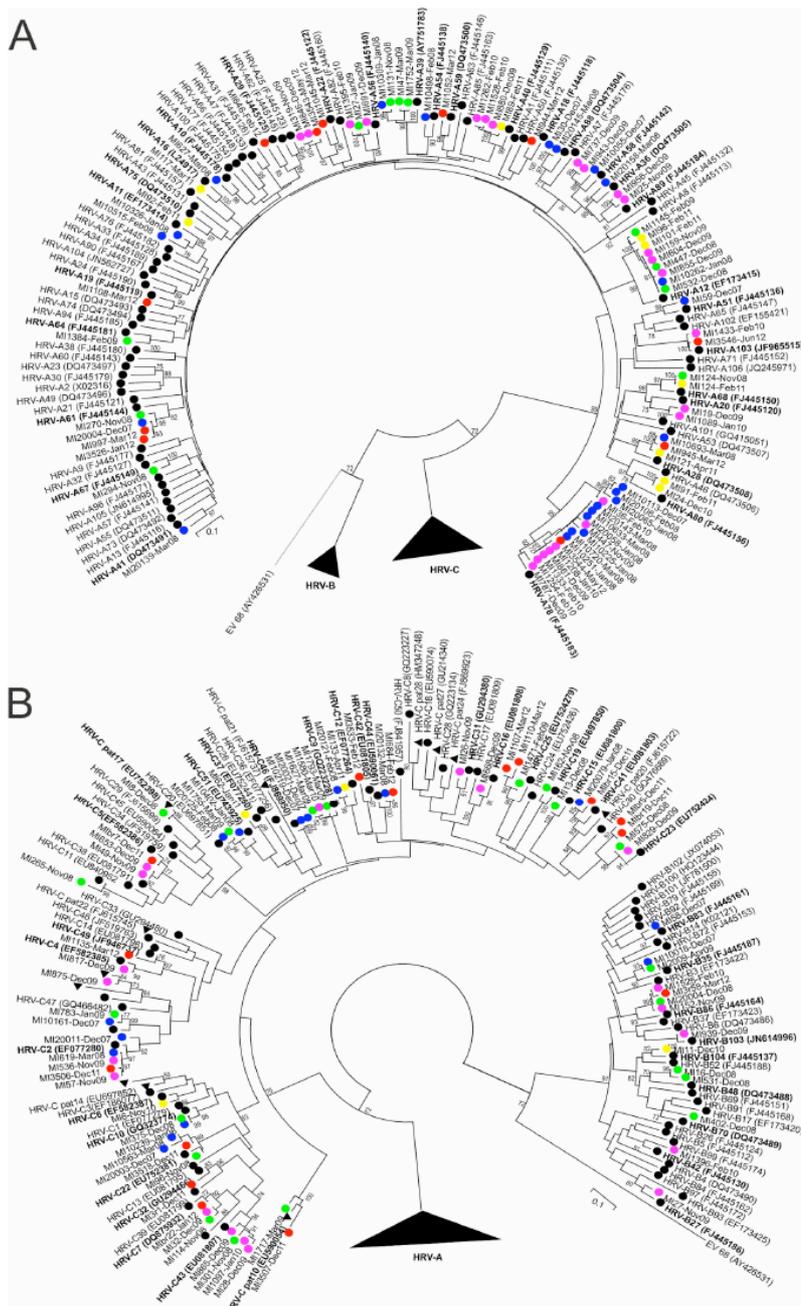
Sulla base dell'analisi filogenetica, le sequenze italiane di RV sono state poste in stretta relazione con un totale di 66 genotipi di riferimento corrispondenti a 29 RV-A, 9 RV-B e 28 RV-C. La Tabella 8 mostra le frequenze dei diversi genotipi di RV rilevati in ciascuna stagione dello studio. Le sequenze di RV mostrano una marcata diversità genetica. Le sequenze RV-C erano le più eterogenee, con una distanza- p nucleotica intraspecie di 0,25, che era maggiore della distanza- p tra i diversi RV-A (0,2s0) e gli RV-B (0,21). La variabilità nucleotidica era del 37% tra gli RV-A e gli RV-B, 37,3% tra gli RV-A e gli RV-C, e 39,9% tra gli RV-B e gli RV-C. La Figura 2 mostra l'albero filogenetico costruito sulla base delle regioni VP4/VP2 delle 151 sequenze di questo studio e delle sequenze di riferimento. Un certo numero di sequenze si raggruppavano con i genotipi noti e, all'interno di tali *clusters*, c'erano le sequenze circolanti durante diverse stagioni. I sottotipi più frequentemente ritrovati erano RV-A78 (n=17), RV-A12 (n=9) e RV-C2 (n=5).

TABELLA 8. Genotipi di RV per ciascuna specie tra i soggetti in studio.

Specie e genotipo	N° di campioni per specie e genotipo					
	Totale	07-08	08-09	09-10	10-11	11-12
Specie A						
A78	17	9		7		1
A12	9	1	3	3	2	
A22	4			2		2
A39	4	1	3			
A40	4			3	1	
A61	4	1	1			2
A58	3	1		2		
A28	3	1			1	1
A56	3		1	2		
A89	2			2		
A80	2				2	
A20	2			2		
A88	2	2				
A68	2		1		1	
A11	2	2				
A103	2			1		1
A54	1	1				
A59	1					1
A29	1					1
A75	1				1	
A67	1		1			
A18	1					1
A41	1	1				
A51	1	1				
A36	1	1				
A10	1	1				
A16	1				1	
A64	1		1			
A19	1					1
Totale	78	23	11	24	9	11
Specie B						
B86	4		1	2		1
B48	2		2			
B35	2	1	1			
B42	1			1		
B27	1			1		
B70	1		1			
B83	1	1				
B103	1			1		
B104	1				1	
Totale	14	2	5	5	1	1
Specie C						
C2	5	2		2		1
C23	4		1	1		2
C43	4		1	3		

C22	4	2	1			1
C25	3		1			2
C7	3		1	1		1
C9	3		2	1		
C5	3			2		1
C51	3	2	1			
C41	2	1				1
C12	2	1			1	
C40	2	1		1		
C10	2	1	1			
C46	2	2				
C44	2	1				1
C? (pat10)	2		1			1
C37	1				1	
C15	1		1			
pat17	1		1			
C42	1					1
pat19	1			1		
C32	1					1
C6	1				1	
C31	1			1		
C16	1			1		
C27	1		1			
C4	1			1		
C49	1					1
C19	1		1			
Totale	59	13	14	15	3	14

FIGURA 2. Albero filogenetico basato sulla neighbour-joining analisi di 78 sequenze RV- A VP4/VP2 (A) e 14 RV-B e 59 sequenze RV –C VP4/VP2 (B) dal nostro studio e dalle sequenze di riferimento del database.



I punti colorati rappresentano le diverse stagioni: blu, 2007-08; verde, 2008-09; rosa, 2009-10; giallo, 2010-11; rosso, 2011-12; nero, sequenze di riferimento;

RV-A

Le sequenze simili a RV-A78 sono state rilevate durante tre diverse stagioni (2007-08, 2009-10, 2011-12). Le sequenze Italiane di RV-A78 sembrano raggrupparsi in due diversi gruppi (A e B, Figura 3A): in confronto con le sequenze di riferimento, la divergenza nucleotidica media nel cluster B era significativamente maggiore che nel cluster A (10,2% vs 6,9%; $p < 0,001$).

La RV-A12 circolava in quattro stagioni consecutive (2007-2011). Sei delle nove sequenze RV-A12- simili (66,6%) mostravano un alto grado di indentità (media del 99%) tra loro e con le sequenze di riferimento (media del 92%); le rimanenti tre sequenze erano suddivise tra tutte quelle RV-A12- simili circolanti del mondo (Fig.3B). E' importante sottolineare che due sequenze identiche RV-A12 sono state rilevate in due diverse stagioni (MI10262-Jan08 e MI532-Dec08), e che le stesse sono state trovate anche in USA nel 2007, e in Italia e in Svizzera nel 2009.

Le sequenze RV-A22-simili si raggruppavano in due diversi gruppi con, rispettivamente, l'8,2% e l'11,6% di divergenza nucleotidica dalla sequenza di riferimento. Queste sequenze circolavano in due stagioni consecutive (2009-10 e 2011-12); in ogni modo, una sequenza trovata nella stagione 2011-12 (MI3543) mostrava un elevato grado di somiglianza nucleotidica con due sequenze RV-A22- simili circolanti nella stagione 2009-10 e con un'altra circolante nella stessa stagione. Questo potrebbe significare che le sequenze RV-A22-simili rimangono circolanti all'interno della popolazione in studio per un lungo periodo di tempo, probabilmente anche per più di due anni (Fig.3C).

Una sequenza identica ad RV-A68 è stata indentificata in campioni raccolti durante due stagioni non consecutive (MI124-Nov08 e MI124- Feb11). Inoltre, una serie di sequenze RV-A-simili mostravano una divergenza nucleotidica superiore al 10,5% rispetto alla sequenza di riferimento: MI19e MI1089 vs RV- A20 e MI24 e MI91 vs RV-A80 (Fig.2A).

RV-B

Tutte le sequenze definite come RV-B86-simili e RV-B48-simili presentavano una divergenza nucleotidica superiore al 9,5% rispetto alla sequenza di riferimento (in media

rispettivamente del 9,9% e dell'11,6%) (Fig.3D e 3E). Le sequenze RV-B86-simili erano le più frequenti del genotipo B, e circolavano in tre diverse stagioni. Le sequenze RV-B35-simili sono state trovate in due diverse stagioni con la presenza della stessa sequenza in entrambi gli anni (MI10018-Dec07 e MI2009-Apr09), e una divergenza nucleotidica dell'8,4% dalla sequenza di riferimento.

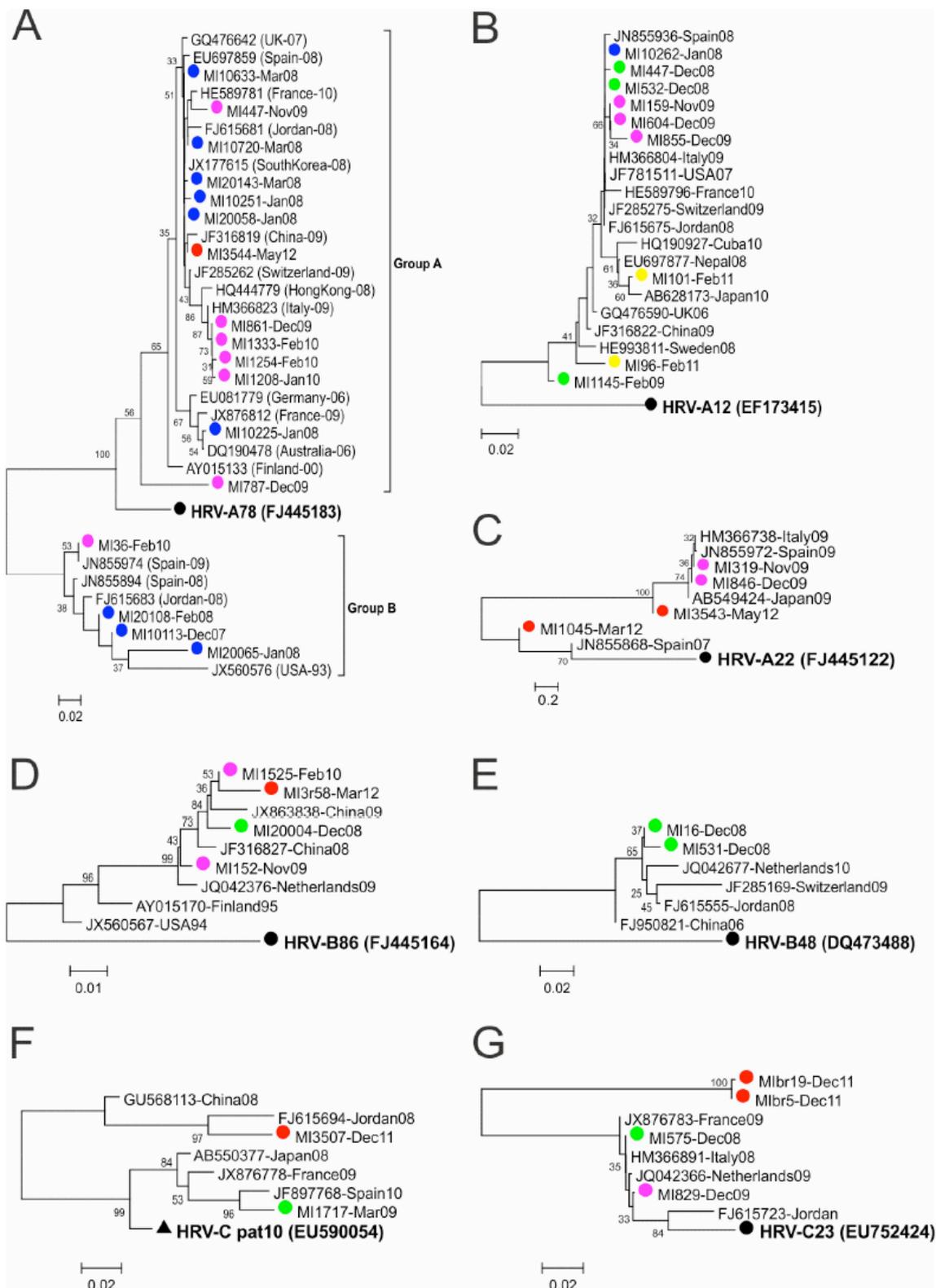
HRV-C

Due sequenze (MI1717-Mar09 e MI3507-Dec11) raggruppavano da sole senza alcuna sequenza di riferimento (Fig. 2B). L'identità nucleotidica delle due sequenze con RVC pat10 (EU590054) era > 90% (Fig. 3F).

Le quattro sequenze RV-C23-simili sono state tutte rilevate a dicembre di tre diverse stagioni. Due di queste (Mibr19-Dec11 e Mibr5-Dec11) mostravano la maggior divergenza nucleotidica dalla sequenza di riferimento rispetto alle altre due (MI829-Dec09 e MI575-Dec08) (in media dell'11,7% e del 4,2%; $p < 0,001$), il che suggerisce che esse possano appartenere ad un nuovo genotipo di HRV-C (Fig. 3G).

Le sequenze Mi8-Dec08 e MI875-Dec09 mostravano più del 10,5% di divergenza nucleotidica (14,2% e 12,9%, rispettivamente) rispetto alla loro sequenza di riferimento più simile (RV-C29 e RV-C35). Queste due sequenze raggruppavano rispettivamente con la sequenza RVC pat117 (EU752398) e RVC pat19 (FJ598096) (Fig. 2B).

FIGURA 3. Albero filogenetico basato sulla neighbour-joining analisi che ha incluso le sequenze RV- A78(A), RV-A12 (B), RV- A22 (C), RV-B86 (D), RV-B48 (E), RV-Cpat20 (F), RV-C23 (G) in confronto con quelle più strettamente vicine presenti nella GenBank.



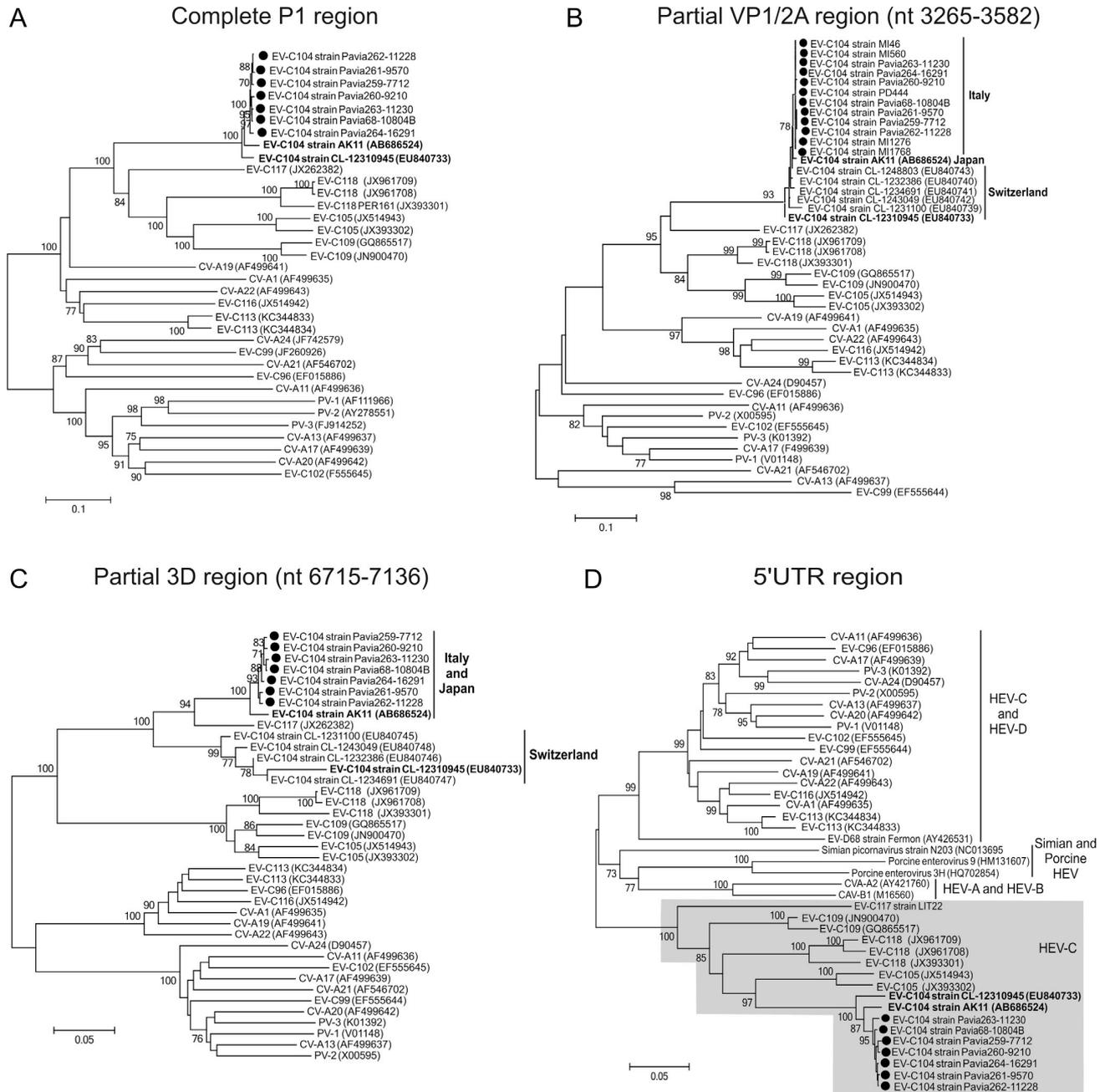
I punti colorati rappresentano le diverse stagioni: blu, 2007-08; verde, 2008-09; rosa, 2009-10; giallo, 2010-11; rosso, 2011-12; nero, sequenze di riferimento;

3. Analisi filogenetica di EV-C104 e struttura di VP1

Come mostrato nella Figura 4A le sequenze di EV-C104 si raggruppano in un *cluster* distinto rispetto agli altri genotipi di EV-C. Le sequenze della regione P1 degli EV-C104 italiani formano un singolo e ben definito *cluster* e mostrano un'elevata identità rispetto agli EV-C104 svizzeri e giapponesi. L'albero filogenetico è stato anche costruito utilizzando le sequenze di altre due regioni genomiche (VP1/2A e 3D; Fig. 4B e C) disponibili dalle sequenze EV-C104 di altri Paesi. Nell'albero VP1/2A, le sequenze italiane EV-C104 confermavano l'appartenenza ad un singolo *cluster*, mentre si osservava una chiara separazione tra le sequenze italiane e giapponesi rispetto a quelle svizzere nell'albero 3D. In dettaglio, tutte le sequenze EV-C104 svizzere si raggruppavano insieme, mentre quelle italiane e giapponesi appartenevano ad un *cluster* separato e condividevano una comune origine con EV-C117. L'incongruenza filogenetica dell'albero 3D rispetto all'albero VP1 conferma l'ipotesi di un'origine ricombinante della regione P3 per le sequenze EV-C104 giapponesi ed italiane. Infine, l'albero filogenetico costruito sulla base delle sequenze 5'UTR mostrava che i virus EV-C104 si raggruppano con EV-C109, EV-C105, EV-C117 ed EV-C118 in un ramo isolato dell'albero (Fig. 4 D).

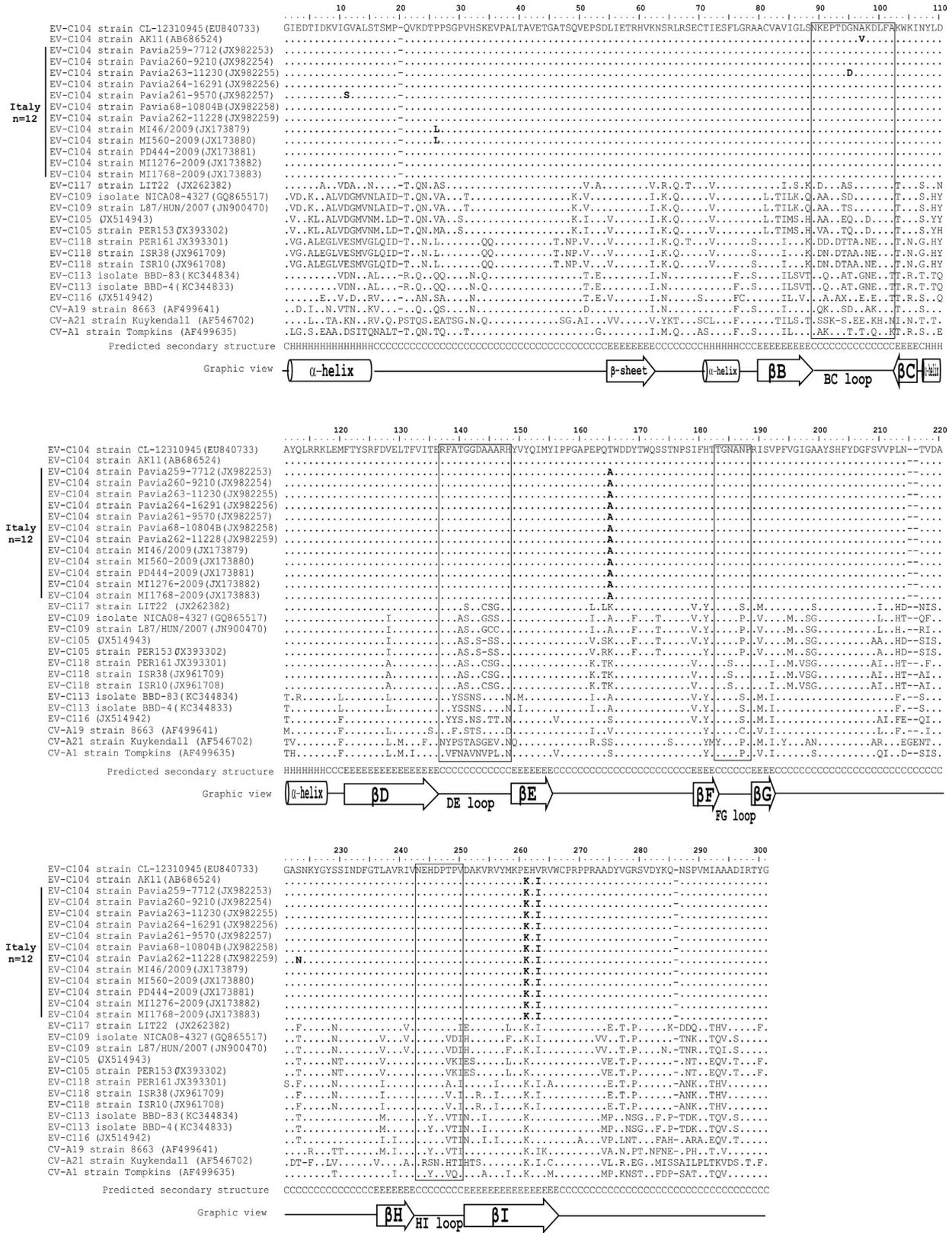
Nella Figura 5 è mostrata la struttura secondaria delle 12 sequenze italiane di VP1. La lunghezza del gene VP1 era identica (297 codoni) tra tutte le sequenze di HEV analizzate. La maggior variabilità rispetto alle sequenze HEV-C più strettamente correlate era nelle regioni ad anello che erano esposte sulla proteina di superficie così come nel terminale N e C di VP1 (Fig. 5). In dettaglio, gli otto codoni (11, 25, 94, 96, 164, 220, 258, e 260) mostravano almeno un cambiamento aminoacidico. Tra questi cambiamenti, T164A, K258E e I260V sono stati osservati in tutte le sequenze italiane. Nelle regioni ad anello (evidenziate in un riquadro nella Fig. 5), solo il cambiamento G94D è stato osservato nell'anello BC. Questo dato supporta l'ipotesi che le proprietà antigeniche delle sequenze italiane di EV-C104 possano essere simili a quelle di altre sequenze EV-C104.

FIGURA 4. Albero filogenetico basato sulle sequenze (A) P1, (B) VP1/2A, (C) 3D e (D) 5'UTR.



Le sequenze italiane EV-C104 sono contrassegnate da un cerchio nero e la sequenza EV-C104 di riferimento è riportata in grassetto;

FIGURA 5. Allineamento della sequenza aminoacidica VP1 di EV-C104 e degli altri HEV strettamente correlati



4. CAP RSV- e RV-positive e *S. pneumoniae*

Relativamente alla sottoanalisi per *S.pneumoniae*, sono stati analizzati i casi di CAP RSV-positivi e i casi di CAP RV-positivi.

La Tabella 9 mostra le caratteristiche demografiche e cliniche dei soggetti con CAP RSV-positiva che erano positivi (n= 65, 51,6%; un singolo sierotipo nella maggior parte dei casi) o negativi per stato di portatore nel nasofaringe di *S. pneumoniae*. I due gruppi avevano caratteristiche simili, inclusi il sesso e la distribuzione per età, la frequenza in comunità infantile, la storia vaccinale, il coinvolgimento alveolare come mostrato dall’RX del torace, la saturazione dell’O₂ al momento dell’arruolamento, il tasso di ospedalizzazione, il ricovero in terapia intensiva e la durata dell’ospedalizzazione.

TABELLA 9. Caratteristiche cliniche e demografiche di bambini con infezione da RSV da sola o con infezione da RSV e colonizzazione nasofaringea da *S. pneumoniae*

Caratteristiche	RSV (n=61)	RSV e colonizzazione da <i>S.pneumoniae</i> (n=65)	p*
	n (%)	n (%)	
Sesso			
Maschi	38 (63,3)	39 (60,0)	
Femmine	22 (36,7)	26 (40,0)	0,70
Età (anni)			
<1	26 (42,6)	27 (41,5)	
1-3	30 (49,2)	33 (50,8)	
≥4	5 (8,2)	5 (7,7)	0,98
Frequenza in comunità			
No	40 (65,6)	41 (63,1)	
Sì	21 (34,4)	24 (36,9)	0,77
Vaccinazione antinfluenzale			
Mai	54 (90,0)	64 (98,5)	
Sempre	6 (10,0)	1 (1,5)	0,054
Vaccinazione antipneumococcica			

No	42 (68,9)	46 (70,8)	
Sì	19 (31,1)	19 (29,2)	0,96
Tipo di CAP			
Non-alveolare	33 (54,1)	28 (43,1)	
Alveolare	28 (45,9)	37 (56,9)	0,22
Saturazione dell'O ₂ all'arruolamento			
<92%	17 (27,9)	20 (31,2)	
≥92%	44 (72,1)	44 (68,8)	0,68
Ospedalizzazione			
No	20 (32,8)	20 (30,8)	
Sì	41 (67,2)	45 (69,2)	0,81
Ricovero in terapia intensiva			
No	60 (98,4)	62 (95,4)	
Sì	1 (1,6)	3 (4,6)	0,62
Giorni di ospedalizzazione			
≤5	20 (48,8)	22 (48,9)	
>6	21 (51,2)	23 (51,1)	1,00

La Tabella 10 confronta le caratteristiche cliniche e demografiche dei bambini con infezione da RSV e colonizzazione da *S. pneumoniae* sulla base del quadro di CAP alveolare o non-alveolare (37, [56,9%] vs 28 [45,9%]; $p = 0,22$). I due gruppi avevano caratteristiche simili, ma i bambini con CAP alveolare avevano livelli significativamente minori di saturazione dell'O₂ ($p = 0,001$) di quelli senza. Non vi erano differenze significative nelle altre manifestazioni cliniche o nell'outcome clinico.

Nei bambini con infezione da RSV, la carica batterica media nei campioni positivi per pneumococco era significativamente più elevata in quelli con coinvolgimento alveolare ($4,54 \pm 1,47$ vs. $3,75 \pm 1,62$ log₁₀ copie DNA/ml; $p = 0,04$). Tuttavia, l'ampia variabilità di distribuzione impedisce l'identificazione di un valore di cut-off (quartili per le CAP non-alveolari: 2,37, 3,87, 5,27 [range: 1,02-6,83]; quartili per le CAP alveolari: 3,77, 4,87, 5,49 [range: 0,90-6,93]). Inoltre, i sierotipi inclusi nel vaccino PCV13 sono stati identificati più frequentemente in bambini con CAP alveolare (40/49 [81,6%] vs 20/34 [58,8%]; $p = 0,02$). I sierotipi 5 e 19A sono stati identificati quasi esclusivamente in bambini con CAP alveolare, ma la differenza era statisticamente significativa solo nel caso del sierotipo 19 A ($p = 0,03$).

TABELLA 10. Caratteristiche cliniche e demografiche di bambini con CAP associata con infezione da RSV e colonizzazione nasofaringea da *S. pneumoniae*, dai reperti radiologici

Caratteristiche	CAP non - alveolare (n=28)	CAP alveolare (n=37)	<i>p</i> *
	n (%)	n (%)	
Sesso			
Maschi	14 (50,0)	25 (67,6)	0,15
Femmine	14 (50,0)	12 (32,4)	
Età (anni)			
<1	13 (46,4)	14 (37,8)	0,78
1-3	13 (46,4)	20 (54,1)	
≥4	2 (7,1)	3 (8,1)	
Frequenza in comunità			
No	15 (53,6)	26 (70,3)	0,17
Sì	13 (46,4)	11 (29,7)	
Vaccinazione antinfluenzale			
Mai	28 (100,0)	36 (97,3)	1,00
Sempre	0 (0,0)	1 (2,7)	
Vaccinazione antipneumococcica			
No	22 (78,6)	24 (64,9)	0,35
Sì	6 (21,4)	13 (35,1)	
Saturazione dell'O₂ all'arruolamento			
<92%	4 (14,3)	16 (44,4)	0,001
≥92%	24 (85,7)	20 (55,6)	
Ospedalizzazione			
No	17 (60,7)	3 (8,1)	<0,001
Sì	11 (39,3)	34 (91,9)	
Ricovero in terapia intensiva			
No	27 (96,4)	35 (94,6)	1,00
Sì	1 (3,6)	2 (5,4)	
Giorni di ospedalizzazione			
≤5	5 (45,5)	17 (50,0)	0,72
>6	6 (54,5)	17 (50,0)	

La Tabella 11 mostra le caratteristiche demografiche e cliniche dei soggetti con CAP RV-positiva che erano positivi (n= 83, 61,9%; un singolo sierotipo nella maggior parte dei casi) o negativi per stato di portatore nel nasofaringe di *S. pneumoniae*. C'erano più femmine (p= 0,004) e soggetti di età ≥ 4 anni tra i bambini con infezione singola da RV, ma la frequenza nella comunità infantile, la storia vaccinale, il coinvolgimento alveolare come mostrato all'RX del torace, la saturazione dell'O₂ al momento dell'arruolamento, il tasso di ospedalizzazione, il ricovero in terapia intensiva e la durata dell'ospedalizzazione erano simili nei due gruppi.

TABELLA 11. Caratteristiche cliniche e demografiche di bambini con infezione da RV da sola o con infezione da RV e colonizzazione nasofaringea da *S. pneumoniae*

Caratteristiche	RV (n=51)	RV e colonizzazione da <i>S. pneumoniae</i> (n=83)	p *
	n (%)	n (%)	
Sesso			
Maschi	21 (41,2)	56 (67,5)	0,003
Femmine	30 (58,8)	27 (32,5)	
Età (anni)			
<1	11 (21,6)	17 (20,7)	0,04
1-3	22 (43,1)	51 (62,2)	
≥ 4	18 (35,3)	14 (17,1)	
Frequenza in comunità			
No	20 (39,2)	42 (50,6)	0,20
Sì	31 (60,8)	41 (49,4)	
Vaccinazione antinfluenzale			
Mai	43 (86,0)	72 (87,8)	0,76
Sempre	7 (14,0)	10 (12,2)	
Vaccinazione antipneumococcica			
No	31 (60,8)	44 (53,0)	0,48
Sì	20 (39,2)	39 (47,0)	
Tipo di CAP			
Non-alveolare	19 (37,2)	25 (30,1)	0,39
Alveolare	32 (62,8)	58 (69,9)	

Saturazione dell'O ₂ all'arruolamento			
<92%	12 (23,5)	14 (16,9)	
≥92%	39 (76,5)	69 (83,1)	0,34
Ospedalizzazione			
No	15 (29,4)	19 (22,9)	
Sì	36 (70,6)	64 (77,1)	0,40
Ricovero in terapia intensiva			
No	50 (98,0)	81 (97,6)	
Sì	1 (2,0)	2 (2,4)	1,00
Giorni di ospedalizzazione			
≤5	14 (38,9)	30 (46,8)	
>6	22 (61,1)	34 (53,1)	0,36

La Tabella 12 confronta le caratteristiche cliniche e demografiche dei bambini con infezione da RV e colonizzazione da *S. pneumoniae* sulla base del quadro radiografico. La prevalenza di CAP alveolare era significativamente più elevata di quella di CAP non-alveolare (58/83 [69,9%] vs 25/83 [30,1%]; $p=0,03$) ma i due gruppi avevano caratteristiche demografiche simili, e solo il tasso di ospedalizzazione era significativamente più alto ($p=0,0001$) nel gruppo con CAP alveolare. Non c'erano differenze significative nella presentazione clinica e nell'*outcome*.

Nei bambini con infezione da RV, ancora una volta la carica batterica media nei campioni positivi per pneumococco era significativamente più elevata in quelli con coinvolgimento alveolare ($4,21 \pm 1,37$ vs. $3,41 \pm 1,47$ log₁₀ copie DNA/mL; $p = 0,03$) e non è stato possibile identificare nessun livello di *cut-off* (quartili per le CAP non-alveolari: 2,53, 3,35, 4,36 [range: 0,18-6,09]; quartili per le CAP alveolari: 3,17, 4,32, 5,19 [range: 1,30-6,74]). I sierotipi inclusi nel vaccino PCV13 sono stati identificati in 28/33 bambini con CAP non-alveolare (84,8%) e 69/80 con CAP alveolare (86,2%) ($p=0,85$). I sierotipi 1, 5 e 19A erano più frequenti nei bambini con CAP alveolare, ma la differenza era statisticamente significativa solo nel caso del sierotipo 5 ($p=0,04$).

TABELLA 12. Caratteristiche cliniche e demografiche di bambini con CAP associata con infezione da RV e colonizzazione nasofaringea da *S. pneumoniae*, dai reperti radiologici

Caratteristiche	CAP non- alveolare (n=25)	CAP alveolare (n=58)	<i>p</i> *
	n (%)	n (%)	
Sesso			
Maschi	16 (64,0)	40 (69,0)	0,66
Femmine	9 (36,0)	18 (31,0)	
Età (anni)			
<1	6 (24,0)	11 (19,3)	0,89
1-3	15 (60,0)	36 (63,2)	
≥4	4 (16,0)	10 (17,5)	
Frequenza in comunità			
No	14 (56,0)	28 (48,3)	0,52
Sì	11 (44,0)	30 (51,7)	
Vaccinazione antinfluenzale			
Mai	23 (92,0)	49 (86,0)	0,72
Sempre	2 (8,0)	8 (14,0)	
Vaccinazione antipneumococcica			
No	16 (64,0)	28 (48,3)	0,28
Sì	9 (36,0)	30 (51,7)	
Saturazione dell'O₂ all'arruolamento			
<92%	6 (24,0)	8 (13,8)	0,34
≥92%	19 (76,0)	50 (86,2)	
Ospedalizzazione			
No	13 (52,0)	6 (10,3)	<0,001
Sì	12 (48,0)	52 (89,7)	
Ricovero in terapia intensiva			
No	25 (100,0)	56 (96,5)	1,00
Sì	0 (0,0)	2 (3,5)	
Giorni di ospedalizzazione			
≤5	5 (41,7)	29 (50,0)	0,60
>6	7 (58,3)	29 (50,0)	

2.4 Discussione

Nello studio sono stati utilizzati due metodi di biologia molecolare per l'identificazione di 17 virus nelle secrezioni delle alte vie aeree così da poter valutare il rapporto tra infezioni virali e sviluppo di CAP in un considerevole numero di bambini per il resto sani. L'arruolamento di un elevato numero di soggetti in età pediatrica è stato facilitato dall'utilizzo, per la raccolta dei campioni di secrezioni, di tamponi floccati nasofaringei, che erano significativamente meno invasivi dell'aspirato e del lavaggio nasofaringeo e

un mezzo valido alternativo per la raccolta di secrezioni respiratorie per l'identificazione virale, soprattutto quando associati all'utilizzo di metodiche di biologia molecolare [59, 60, 61, 62, 63]. In questo studio, per quanto noto a noi fino ad oggi, abbiamo valutato il maggior numero di virus respiratori (compresi quelli di recente scoperta) in bambini con CAP che in qualsiasi altro studio condotto in età pediatrica, incrementando così la nostra comprensione sul ruolo delle infezioni virali singole e delle co-infezioni. Questi dati non solo confermano l'importanza dei virus nel determinare le CAP in età pediatrica, come precedentemente sottolineato da altri autori, ma suggeriscono anche che i virus possono giocare un ruolo maggiore di quanto precedentemente si pensasse, dal momento che più del 75% dei bambini presenta un'infezione respiratoria virale, con picchi di oltre il 90% in quelli di età inferiore ai 12 mesi. Studi precedenti hanno sempre mostrato percentuali più basse ed hanno verosimilmente sottostimato la reale importanza che i virus hanno nella CAP pediatrica, probabilmente perché in tali studi veniva cercato un minor numero di virus [36, 37, 38, 39, 40, 41].

RSV e RV sono i patogeni più spesso associati a CAP sia in forma di infezione virale singola che di co-infezione. Essi sono stati trovati come singolo agente patogeno in più del 50% dei casi, sottolineando così il loro ruolo come causa di CAP pediatrica ed evidenziando la necessità di sviluppare vaccini sicuri ed efficaci per poter contrastare le problematiche cliniche che essi possono determinare. Questo sembra particolarmente importante nel caso dei RV che, fino a pochi anni fa, erano considerati di scarsa importanza, venivano raramente associati con le CAP e non erano solitamente inclusi nella valutazione sulla eziologia delle CAP [70]. Tuttavia, e ciò rappresenta una delle limitazioni dello studio (come verrà discusso di seguito) l'identificazione dei virus nelle secrezioni delle vie aeree superiori dei bambini con CAP potrebbe non indicare che essi siano realmente coinvolti nel causare la patologia poiché potrebbe solo indicare una contemporanea infezione delle alte vie aeree o potrebbe essere dovuta ad uno stato di portatore o ad un prolungato shedding virale di un patogeno che ha causato una precedente infezione. Questo potrebbe essere particolarmente importante nel caso di RV poiché diversi studi epidemiologici hanno mostrato che essi possono essere riscontrati nelle secrezioni respiratorie del 12-22% dei soggetti asintomatici [71, 72]. In ogni modo, nel nostro studio (nella casistica delle cinque stagioni studiate), abbiamo riscontrato RV come singolo agente in circa il 60% dei bambini nei quali questo patogeno è stato identificato. Questo suggerisce fortemente che esso fosse la causa della CAP

diagnosticata in molti dei nostri pazienti, soprattutto in quelli nei quali si riscontravano bassi valori di proteina C-reattiva e della conta dei globuli bianchi. Il RV più frequentemente identificato è stato RV-A (51,6%), seguito da RV-C (39,1%) e da RV-B (9,3%). Queste percentuali sono simili a quelle recentemente riscontrate in diversi Paesi [73, 74, 75], ma diverse da quelle che Calvo *et al.* [76] e Linsuwanon *et al.* [77], che hanno studiato soggetti con IVAI e hanno trovato che RV-B era il sottotipo predominante quando era presente una CAP. In ogni modo, è da sottolineare che in questi due studi la diagnosi di CAP non era confermata radiologicamente e ciò può aver inficiato i risultati.

Nella nostra casistica RV era più frequente in bambini di età < 1 anno (31,1%) e in quelli tra 1-3 anni (47%), rispetto a quelli di età \geq 4 anni (21,9%), come riportato in altri studi [73, 78]. In termini di specie, RV-A è stato riscontrato più frequentemente che RV-C in bambini di età compresa tra 1 e 3 anni e \geq 4 anni, mentre in un recente studio thailandese RV-C era il più frequente in bambini con IVAI negli stessi gruppi di età [79]. Nel nostro studio la circolazione di RV è stata valutata solo durante la stagione invernale e all'inizio della primavera; questo significa che i dati non indicano la reale circolazione delle diverse specie di RV durante l'intero anno. In ogni modo, questo è il primo studio che ha definito la circolazione delle diverse specie e genotipi di RV in bambini con CAP che sia basato su un così ampio numero di casi e di campioni raccolti su un periodo di 5 anni, il che è significativamente più lungo di altri studi [74, 80, 81, 82, 83] e può pertanto fornire informazioni precise sulla circolazione nel tempo delle diverse specie di RV.

I campioni positivi per RV contenevano un totale di 66 genotipi (29 RV-A, 9 RV-B e 28 RV-C), dato che risulta abbastanza simile al dato riportato in 4 recenti studi di bambini ed adulti con IVAI in Svezia [84], ma più alto rispetto ai 45 genotipi trovati in uno studio condotto in Italia centrale [82]. Tuttavia, il periodo di osservazione di questi studi era limitato ad un anno ed erano arruolati solo pochi pazienti con CAP.

Nel nostro studio abbiamo classificato i genotipi di RV utilizzando l'analisi filogenetica basata su VP4/VP2 e abbiamo distinto tra inter- e intra-sierotipi utilizzando un limite di divergenza nucleotidica recentemente proposto da McIntyre *et al.*: 10,5% per RV-A, 9,5% per RV-B e 10,5% per RV-C [85]. In assenza di una sequenza VP1, i nuovi tipi sono assegnati provvisoriamente. I nostri dati mostrano che durante ciascun periodo

osservazionale possono circolare un ampio numero di genotipi, e che alcuni possono circolare in più anni e in aree geografiche diverse. Questo è chiaramente dimostrato dalla somiglianza tra le sequenze italiane di HRV-A identificate nel nostro studio e quelle trovate in Spagna [86] e in Giordania [87] nel 2008, e dal fatto che nel nostro studio abbiamo trovato i genotipi più frequentemente rilevati in Svezia da Sansone *et al.* [84]: A78, A12, A56, A10, C9 e C43. Considerando solo la stagione 2009-10, i genotipi A12, A40, A89 e C2 che abbiamo trovato, sono stati trovati anche in uno studio condotto in Francia e che ha coinvolto una popolazione simile alla nostra [88]. Inoltre, RV-A12 è stato il genotipo più comunemente riscontrato in bambini con diagnosi principale di CAP virale a Pechino (Cina) durante la stagione 2007-08 [89].

Vi era un ampio *range* di genotipi con diversi gradi di variazione nucleotidica rispetto alla sequenza di riferimento. Un aumento della variabilità nucleotidica rispetto alla sequenza prototipo è stato riscontrato in diversi studi condotti in varie parti del mondo [75, 81, 84, 89, 90, 91]. L'attenzione data negli ultimi anni al sequenziamento e allo sviluppo di metodiche molecolari efficienti, capaci di caratterizzare le diverse specie e genotipi di RV, permetterà la scoperta di nuove varianti in un futuro prossimo.

Per quanto concerne gli EV, nel corso degli anni sono state riportate solo un numero limitato di sequenze [56, 57, 92, 93]. Per tale motivo è stata eseguita la caratterizzazione genomica completa delle sequenze italiane di EV-C104, che sono state poi confrontate poi con quelle svizzere e giapponesi. Le regioni codificanti delle sequenze italiane di EV-C104 erano strettamente correlate con quelle giapponesi. Inoltre, la somiglianza con quelle svizzere era più alta nelle regioni P1 e P2 e diminuiva nella regione P3. Basandosi sulle sequenze VP1, tutte le sequenze EV-C104 analizzate appartenevano ad un singolo *cluster*. Al contrario, l'albero filogenetico basato sulle sequenze 3D mostrava la presenza di due *clusters*, uno con le sequenze italiane e giapponesi che si raggruppavano con EV-C117 e uno costituito dalle sequenze svizzere. Questi dati sottolineano l'importanza di una analisi simultanea di più regioni genomiche [94, 95, 96, 97].

E' noto che l'evoluzione degli EV è promossa sia da eventi di ricombinazione che di *drift* genetico [96, 97, 98, 99]. La ricombinazione ha mostrato di avvenire tra gli enterovirus di tipo C, così come tra i poliovirus [98]. La ricombinazione intertipica è stata comunemente osservata nelle regioni P2 e P3 piuttosto che nella regione P1 [94, 95,

96, 97]. Al contrario, nella regione P1 l'accumulo continuo di sostituzioni nucleotidiche e la selezione naturale sono meccanismi ben noti di evoluzione genomica [96, 97]. Le analisi indicano la presenza in una regione putativa di ricombinazione tra le sequenze italiane e giapponesi di EV-C104 e le sequenze EV-C117 simili. Le nostre analisi suggeriscono che l'evento di ricombinazione inter-tipica può essere avvenuto durante l'evoluzione delle sequenze italiane EV-C104 ed EV-C117. In ogni modo, è difficile stabilire come tale ricombinazione sia avvenuta. Può essere formulata l'ipotesi che EV-C104 ed EV-C117 possano utilizzare lo stesso recettore di entrata nella cellula o possano usare due diversi recettori sulla stessa cellula.

Tra le proteine del capsido il gene VP1 sembra essere la regione con maggior variabilità. In dettaglio, la maggior parte dei cambiamenti aminoacidici sono avvenuti in posizioni esposte della superficie del capsido o nelle due regioni terminali (terminale C e terminale N). Questo in accordo con altri dati che riportano come le proteine virali differiscano maggiormente nella regione ad anello e nei terminali C- ed N- [100].

Con tale sequenziamento è stata dimostrata l'origine ricombinante di EV-C104 circolante in Italia ed in Giappone. Per poter meglio caratterizzare le nuove sequenze di EV, può essere utilizzato il gene VP1 insieme con l'analisi di altre regioni genomiche come il gene 3D.

I virus più frequentemente identificati tra quelli di recente scoperta erano bocavirus e hMPV. I dati riguardanti bocavirus sono abbastanza sovrapponibili a quelli riportati da Fry *et al.* [101] e da Don *et al.* [102], i quali hanno identificato bocavirus in circa il 12% dei bambini con CAP, in studi condotti rispettivamente in Thailandia e in Italia. Comunque, come osservato in altri studi [103, 104, 105], bocavirus è stato trovato principalmente in associazione con altri virus che sono spesso trovati singolarmente (in particolare RSV e RV). Questo suggerisce che bocavirus potrebbe non giocare un ruolo primario come causa di CAP e che la sua presenza nelle secrezioni respiratorie sembra spesso dovuta ad una precedente infezione seguita da una prolungata fase di shedding virale con bassa carica di eliminazione. Inoltre, in un precedente studio su bambini con patologia respiratoria ed infezione da bocavirus, abbiamo evidenziato che i quadri clinici più severi erano diagnosticati in bambini con co-infezione virale, mentre la maggior parte dei casi con infezione singola da bocavirus presentavano quadri di lieve entità clinica [106].

Il ruolo giocato da hMPV sembra essere più importante. In generale, la sua frequenza è abbastanza simile a quella di bocavirus, ma hMPV è stato trovato in associazione con altri virus solo nel 22% dei casi, dato questo sovrapponibile a quello trovato da Wolf *et al.* [36] in uno studio condotto in Israele. Ciò suggerisce che questo virus può giocare un ruolo patogenetico diretto nello sviluppo di CAP.

I virus influenzali erano il quarto agente infettivo più frequentemente identificato in bambini con CAP e mostravano la più bassa incidenza di co-infezione. Questo conferma l'importanza di tali virus anche nelle infezioni delle basse vie aeree e ancora una volta sottolinea la necessità della somministrazione annuale della vaccinazione antinfluenzale [107, 108, 109].

L'incidenza globale delle infezioni dovute a coronavirus era del 5,6%, più elevata di quella trovata in un ampio studio sulle polmoniti condotto in Tailandia [101]. Comunque, il fatto che tutti i coronavirus erano principalmente trovati in associazione con altri virus suggerisce che sia i vecchi che i nuovi coronavirus hanno solo un'importanza relativa della CAP pediatrica. Di conseguenza, nonostante la scoperta di nuovi coronavirus, non sembra vi sia la necessità urgente di nuove misure preventive. La stessa cosa sembra vera nel caso degli EV, che sono stati identificati in un piccolo numero di soggetti ed erano frequentemente associati ad altri virus.

Adenovirus e parainfluenza virus sono stati identificati in un piccolo numero di casi. Precedenti studi hanno mostrato che la frequenza di identificazione di adenovirus può variare dal 3% al 10% [29]. Benchè la sua prevalenza sia sempre relativamente bassa, la presenza di tale virus deve essere sistematicamente monitorata poiché è stato associato con casi severi ed ad evoluzione fatale di polmonite necrotizzante [37]. L'incidenza di infezione da virus parainfluenzale era significativamente più bassa di quanto osservato in studi precedenti [29], dato questo che può essere in parte dovuto alle differenze nelle metodiche di identificazione virale utilizzate e al fatto che nel nostro studio abbiamo cercato un maggior numero di agenti infettivi. Nella maggior parte dei casi, i virus parainfluenzali sono stati trovati in associazione con altri virus, così da suggerire una loro importanza solo relativa dal punto di vista clinico.

Le co-infezioni erano molto comuni, e non è stato possibile definire in modo preciso il ruolo che ciascun patogeno ha come causa di CAP in bambini co-infetti. In ogni modo,

benchè più elevata tra i virus più frequentemente isolati, la prevalenza delle co-infezioni non era strettamente collegata alla prevalenza assoluta di ciascun virus isolato poiché era più elevata tra i coronavirus, i parainfluenza virus, gli EV e adenovirus rispetto ad RSV, RV e virus influenzali, anche se questi ultimi sono stati riscontrati in un numero significativamente maggiore di casi. Questo dato contrasta con l'ipotesi di Cilla *et al.* [39], i quali suggeriscono che la percentuale di co-infezione dovuta a ciascun virus dipende dalla circolazione di quel virus rispetto agli altri e sembra indicare che altri fattori possano giocare un ruolo nel favorire infezioni virali multiple concomitanti nello stesso soggetto.

Solo differenze minori sono state riscontrate nelle caratteristiche demografiche, cliniche, di laboratorio e radiografiche associate con le singole infezioni virali. Benchè non vi fossero differenze significative nelle variabili individuali associate con ciascun specifico virus, la variabilità dei dati rende impossibile definire il quadro caratteristico dei casi di CAP associati a ciascun singolo virus. Inoltre, non vi erano differenze tra i virus in termini di variabili cliniche suggestive di gravità clinica (es. tasso e durata dell'ospedalizzazione e uso di farmaci), il che suggerisce che l'uso precoce della terapia antivirale nei casi di CAP associati a virus influenzali dovrebbe essere limitato in assenza di test virologici. Questo sottolinea, inoltre, l'importanza di una sorveglianza epidemiologica e dell'uso di test di diagnostica molecolare (o almeno di test rapidi) nei singoli soggetti, così da poter assicurare che la terapia antivirale venga utilizzata solo nei pochi casi per i quali sia realmente indicata [110,111].

Il confronto tra le caratteristiche delle infezioni virali singole e delle co-infezioni mostrava che l'unica differenza significativa era l'associazione tra polmonite alveolare e co-infezione virale. Mentre i parametri clinici e di laboratorio (compresa la conta dei globuli bianchi e la proteina C-reattiva) non suggerivano la presenza di una sovrainfezione batterica, questo dato può essere spiegato dal ruolo sinergico che più di un virus ha nel causare l'infiammazione del tessuto polmonare e di conseguenza i cambiamenti radiografici. Dall'altro lato, le CAP non-alveolari avevano un'aprevalenza simile o maggiore di quelle alveolari nei bambini con singola infezione virale.

Questo studio presenta due limitazioni. Innanzitutto, l'identificazione dei virus nelle secrezioni delle vie aeree superiori dei bambini con CAP potrebbe non indicare che essi siano realmente coinvolti nel causare la patologia poiché potrebbe solo indicare una

contemporanea infezione delle alte vie aeree o potrebbe essere dovuta ad uno stato di portatore o ad un prolungato shedding virale di un patogeno che ha causato una precedente infezione. Comunque, l'identificazione di un virus avviene in non più del 5% dei soggetti asintomatici, benchè la prevalenza di RV possa arrivare fino al 15%. Data la prevalenza di ciascuna infezione virale nella nostra popolazione pediatrica in studio, è altamente verosimile che i virus identificati abbiano un importante ruolo patogenetico nel determinare la CAP nella maggior parte dei casi. In ogni modo, poiché è stato dimostrato che le co-infezioni virali/batteriche sono comuni, è possibile che i casi di CAP attribuiti da noi ad infezioni virali fossero almeno in parte dovuti a concomitanti infezioni virali e batteriche. L'elevato valore della proteina C-reattiva e la maggior frequenza di CAP alveolare rilevata nei casi RV-positivi rispetto ai casi RSV- ed influenza-positivi potrebbe indicare un maggior grado di coinvolgimento batterico in alcune infezioni virali. Nel nostro studio sono state eseguite sistematicamente le emocolture per tutti i bambini arruolati così da poter identificare le infezioni batteriche, ma poiché tale procedura non è molto sensibile, nella maggior parte dei casi ha dato risultato negativo. Non è perciò possibile trarre nessuna conclusione sulla reale incidenza delle co-infezioni virali/batteriche o per valutare l'importanza che ciascun virus ha nel favorire la sovrainfezione batterica. Dall'altro lato, benchè possa essere utile la coltura dello sputo per poter identificare i batteri respiratori responsabili di CAP [112], nel nostro studio abbiamo deciso di non eseguirla poiché l'importanza di raccogliere lo sputo dai bambini è ampiamente dibattuta e, anche quando vengano utilizzate procedure di raccolta complicate e poco confortevoli per il paziente (compreso il pre-trattamento farmacologico, aerosol con soluzione salina, e l'aspirazione nasale), solo pochi campioni sono considerati adeguati [113].

Sempre nell'ambito di tale tema, importante è la sottoanalisi dello studio che abbiamo svolto per valutare se la colonizzazione nasofaringea da parte di *S. pneumoniae* in bambini con CAP alveolare ed infezione da RSV o RV dia delle indicazioni su una possibile infezione mista, definendo così quei casi che realmente necessitano di una terapia antibiotica. I casi di CAP alveolare sono stati identificati in un numero simile di soggetti con *S. pneumoniae* e infezione virale e in quelli con sola infezione virale e la prevalenza di CAP alveolare e CAP non-alveolare era sovrapponibile nei gruppi di bambini con *S. pneumoniae* e RSV o RV. Questi aspetti evidenziano che la colonizzazione pneumococcica nasofaringea in bambini con CAP alveolare e infezione

da RSV o RV non supporta la diagnosi di un'eziologia mista o di per se suggerisce la necessità di una prescrizione antibiotica. La colonizzazione nasofaringea da parte di pneumococco è molto comune in età pediatrica (soprattutto nei primi anni di vita) e, benchè sia il prerequisito per la diagnosi di malattia pneumococcica, potrebbe essere un ritrovamento incidentale e perciò non specifico.

Comunque, noi abbiamo trovato che la CAP era associata in modo significativo con una più elevata carica pneumococcica nasofaringea rispetto alla CAP non-alveolare in bambini colonizzati da *S. pneumoniae* con infezione da RSV e RV. Vu *et al.* hanno descritto un'associazione tra una elevata carica nasofaringea di *S. pneumoniae* e la CAP radiologicamente confermata, e Albrich *et al.* hanno trovato una stretta relazione tra un aumento della carica pneumococcica nasofaringea e un'eziologia pneumococcica per la CAP nell'adulto. Sulla base di queste evidenze, i nostri dati sembrano supportare l'ipotesi che la CAP alveolare in bambini colonizzati da *S. pneumoniae* con infezione da RSV o RV possa indicare un'infezione mista e richiede la sistematica somministrazione di antibiotici quando la carica batterica è particolarmente alta. Albrich *et al.* hanno calcolato che la sensibilità e la specificità di una carica di *S. pneumoniae* \geq 8000 copie/mL nel distinguere tra CAP pneumococciche e colonizzazione asintomatica era, rispettivamente, dell'82,2% e del 92,0% ma, sfortunatamente, noi non possiamo identificare un valore di cut-off nel nostro studio. Questo era probabilmente dovuto al fatto che noi abbiamo studiato bambini i quali sono più frequentemente colonizzati da una elevata carica batterica, e che è più difficile distinguere tra i portatori dai pazienti realmente infetti.

I nostri dati riguardanti i diversi sierotipi di pneumococco indicano una differenza tra i pazienti con infezione da RSV e quelli con infezione da RV. I soggetti RSV-positivi con CAP alveolare erano più frequentemente colonizzati da sierotipi inclusi nel PCV13 rispetto a quelli con CAP non-alveolare, mentre non c'erano differenze tra i due gruppi di pazienti RV-positivi. La ragione di ciò non è chiara ed è possibile che tale ritrovamento sia solo fortuito. In ogni modo, non può essere escluso che il precedente uso diverso del vaccino eptavalente (PCV7) più elevato in bambini RV-positivi possa aver giocato un ruolo a tal riguardo. E' ben noto che l'uso del PCV7 è accompagnato da una significativa modificazione dello stato di portatore di *S. pneumoniae*, con una riduzione dei sierotipi vaccinali e un aumento dei sierotipi non vaccinali.

Una seconda possibile spiegazione è che la presenza dei virus studiati nelle secrezioni nasofaringee può avere un significato clinico diverso. Questo può condizionare in modo diverso l'adesività di pneumococco, portando ad un rischio diverso di superinfezione batterica da parte dei più aggressivi sierotipi di pneumococco. L'interazione tra pneumococco ed RSV è stata ampiamente dimostrata nella pratica clinica ed in esperimenti animali. La patologia invasiva pediatrica da pneumococco è stata associata con l'attività di RSV nelle 4 settimane precedenti ed RSV può compromettere l'attività di segnale dell'interferon tipo I e II e può distruggere l'attività dei recettori Toll-like. Al contrario, l'associazione tra le infezioni batteriche delle basse vie respiratorie nel contesto di una coinfezione con RV è stata meno studiata, benchè riportata in diversi trials clinici. Inoltre, mentre è possibile che l'identificazione di RSV nelle secrezioni nasofaringee realmente indichi l'eziologia della patologia acuta delle basse vie aeree diagnosticata, questo non lo è sempre nel caso di RV. RV può essere eliminato per diverse settimane dopo una precedente infezione, e la sua identificazione nel contesto di un nuovo episodio respiratorio non implica necessariamente che sia la reale causa della patologia. Questo studio è stato condotto durante la stagione invernale così da ottenere il maggior numero di soggetti con infezione da RSV o RV in un breve periodo di tempo. Sfortunatamente, nelle stagioni invernali durante le quali lo studio è stato condotto, l'incidenza di CAP alveolare da virus influenzali è stata marginale e non è stata possibile una valutazione dell'associazione tra stato di portatore di pneumococco e l'infezione da virus influenzale.

Indipendentemente dal tipo di infezione virale, nel nostro studio abbiamo trovato che i sierotipi inclusi nel PCV13 sono stati trovati in modo più frequente nei nostri pazienti con CAP alveolare che in quelli con CAP non-alveolare. Poiché i bambini arruolati nel nostro studio e vaccinati, avevano ricevuto PCV7, non sorprende che la colonizzazione da sierotipi non inclusi in PCV7 era più frequente. Inoltre, i sierotipi di pneumococco che sono stati isolati nei nostri pazienti con CAP alveolare (cioè 1, 5 e 19A) sono tra quelli che Greenberg *et al.* hanno più spesso trovato in una popolazione pediatrica di bambini con CAP alveolare che sono stati studiati per valutare la potenzialità di indurre malattia dei diversi sierotipi di pneumococco. Questi autori hanno confrontato la frequenza di portate dei diversi sierotipi tra i bambini con CAP e controlli sani e identificato i sierotipi probabilmente associati con CAP pneumococcica. Il fatto che nel nostro studio abbiamo trovato gli stessi sierotipi supporta l'ipotesi che la maggior parte

dei nostri pazienti con CAP alveolare e colonizzazione da *S.pneumoniae* associata ad infezione da RSV o RV erano affetti da un'infezione mista, con *S. pneumoniae* che aveva un ruolo nel determinare il coinvolgimento alveolare.

In conclusione, i nostri dati sembrano indicare che determinando la carica batterica pneumococcica nel nasofaringe e identificando i sierotipi trasportati si possa contribuire alla diagnosi di infezione mista in bambini con CAP alveolare ed infezione da RSV o RV, aumentando la nostra conoscenza sulla frequenza e sulla rilevanza clinica delle infezioni miste in età pediatrica. Inoltre, benchè è improbabile che tale metodo sia utilizzabile nella pratica clinica di routine per la gestione dei bambini con CAP, l'identificazione di infezioni miste potrebbe contribuire ad un uso più razionale della terapia antibiotica nella gestione della CAP, riservando gli antibiotici solo per i pazienti che realmente li necessitano. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi per confermare tali dati e stabilire la carica batterica che differenzia la colonizzazione pneumococcica dall'infezione vera e propria, valutando se simili conclusioni possono essere tratte anche per altre infezioni virali. In particolare ciò può essere utile soprattutto per l'infezione da virus influenzali, tenendo conto della complessa e sinergistica interazione nel tessuto polmonare tra virus e *S. pneumoniae*.

I nostri dati sottolineano l'importanza dei virus respiratori (soprattutto RV ed RSV) nelle CAP pediatriche, suggeriscono che il solo virus respiratorio recentemente identificato e frequentemente associato a CAP come singolo agente virale è hMPV, mostrano differenze marginali nelle caratteristiche delle singole infezioni virali e dimostrano che le co-infezioni virali sono più spesso associate a polmonite alveolare rispetto alle infezioni virali singole, in assenza di differenze negli altri parametri clinici o di laboratorio. Questo dato è importante nella gestione della CAP pediatrica e dovrebbe aiutare nella definizione degli agenti infettivi per i quali la prevenzione è necessaria e lo sviluppo di nuovi e sempre più efficaci vaccini.

BIBLIOGRAFIA

1. Principi N, Esposito S. Management of severe community-acquired pneumonia of children in developing and developed countries. *Thorax* 2011;66:815–822.
2. Harris M, Clark J, Coote N, *et al.* British Thoracic Society guidelines for the management of community acquired pneumonia in children: update 2011. *Thorax* 2011;66 (Suppl 2):ii1–ii23.
3. Bradley JS, Byington CL, Shah SS, *et al.* Executive summary: the management of community-acquired pneumonia in infants and children older than 3 months of age – clinical practice guidelines by the Pediatric Infectious Diseases Society and the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2011;53:617–630.
4. World Health Organization. Pneumonia. Fact sheet No. 331. 2009. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs331/en/index.html> [Accessed 7 September 2010].
5. Neuman MI, Monuteaux MC, Scully KJ, Bachur RG. Prediction of pneumonia in a pediatric emergency department. *Pediatrics* 2011;128:246–253.
6. Bilkis MD, Gorgal N, Carbone M, *et al.* Validation and development of a clinical prediction rule in clinically suspected community-acquired pneumonia. *Pediatr Emerg Care* 2010;26:399–415.
7. Neuman MI, Lee EY, Bixby S, *et al.* Variability of the interpretation of chest radiographs for the diagnosis of pneumonia in children. *J Hosp Med* 2011.doi: 10.1002/jkm.955.
8. Ayieko P, English M. In children aged 2–59 months with pneumonia, which clinical signs best predict hypoxaemia? *J Trop Pediatr* 2006;52:307–310.
9. Fu LY, Ruthazer R, Wilson I, *et al.* Brief hospitalization and pulse oximetry for

- predicting amoxicillin treatment failure in children with severe pneumonia. *Pediatrics* 2006;118:e1822–e1830.
10. Thompson M, Coad N, Harnden A, *et al.* How well do vital signs identify children with serious infections in paediatric emergency care? *Arch Dis Child* 2009; 94:888–893.
 11. Flood RG, Badik J, Aronoff SC. The utility of serum C-reactive protein in differentiating bacterial from nonbacterial pneumonia in children: a metaanalysis of 1230 children. *Pediatr Infect Dis J* 2008;27:95–99.
 12. Khan DA, Rahman A, Khan FA. Is procalcitonin better than C-reactive protein for early diagnosis of bacterial pneumonia in children? *J Clin Lab Anal* 2010;24:1–5.
 13. Burkhardt O, Ewig S, Haagen U, *et al.* Procalcitonin guidance and reduction of antibiotic use in acute respiratory tract infection. *Eur Respir J* 2010;36:601–607.
 14. De Schutter I, De Wachter E, Crokaert F, *et al.* Microbiology of bronchoalveolar lavage fluid in children with acute nonresponding or recurrent community-acquired pneumonia: identification of nontypeable *Haemophilus influenzae* as a major pathogen. *Clin Infect Dis* 2011;52:1437–1444.
 15. Shah SS, Dugan MH, Bell LM, *et al.* Blood cultures in the emergency department evaluation of childhood pneumonia. *Pediatr Infect Dis J* 2011;30:475–479.
 16. Resti M, Micheli A, Moriondo M, *et al.* Comparison of the effect of antibiotic treatment on the possibility of diagnosing invasive pneumococcal disease by culture or molecular methods: a prospective, observational study of children and adolescents with proven pneumococcal infection. *Clin Ther* 2009;31:1266–1273.
 17. Resti M, Moriondo M, Cortimiglia M, *et al.* Community-acquired bacteremic pneumococcal pneumonia in children: diagnosis and serotyping by real-time polymerase chain reaction using blood samples. *Clin Infect Dis* 2010;51:1042–1049.
 18. Marchese A, Esposito S, Coppo E, *et al.* Detection of *Streptococcus pneumoniae* and identification of pneumococcal serotypes by real-time polymerase chain reaction using blood samples from Italian children \leq 5 years

- of age with community-acquired pneumonia. *Microb Drug Resist* 2011;17:419–424.
19. Lahti E, Peltola V, Waris M, *et al.* Induced sputum in the diagnosis of childhood community-acquired pneumonia. *Thorax* 2009;64:252–257.
 20. Thurman KA, Walter ND, Schwartz SB, *et al.* Comparison of laboratory diagnostic procedures for detection of *Mycoplasma pneumoniae* in community outbreaks. *Clin Infect Dis* 2009;48:1244–1249.
 21. Jansen RR, Wieringa J, Koekkoek SM, *et al.* Frequent detection of respiratory viruses without symptoms: toward defining clinically relevant cut-off values. *J Clin Microbiol* 2011;49:2631–2636.
 22. Morens DM, Taubenberger JK, Fauci AS. Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness. *J Infect Dis* 2008;198:962–970.
 23. Randolph AG, Vaughn F, Sullivan R, *et al.* Critically ill children during the 2009– 2010 influenza pandemic in the United States. *Pediatrics* 2001;128:e1450–e1458.
 24. Levin D, Tribuzio M, Green-Wrzesinski T, *et al.* Empiric antibiotics are justified for infants with respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection presenting with respiratory failure: a prospective study and evidence review. *Pediatr Crit Care Med* 2010;11:390–395.
 25. Don M, Valent F, Korppi M, Canciani M. Differentiation of bacterial and viral community-acquired pneumonia in children. *Pediatr Int* 2009;51:91–96.
 26. Esposito S, Daleno C, Prunotto G, *et al.* Impact of viral infections in children with community-acquired pneumonia: results of a study of 17 respiratory viruses. *Influenza Other Resp Viruses* 2013;7:18-26.
 27. Esposito S, Daleno C, Tagliabue C, *et al.* Impact of rhinoviruses on pediatric community-acquired pneumonia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31:1637-1645.
 28. Esposito S, Principi N. Emerging resistance to antibiotics against respiratory bacteria: impact on therapy of community-acquired pneumonia in children. *Drug Res Up* 2002;5:73–87.
 29. Ruuskanen O, Lahti E, Jennings LC, Murdoch DR. Viral pneumonia. *Lancet* 2011;377:1264–1275.

30. Pavia AT. Viral infections of the lower respiratory tract: old viruses, new viruses, and the role of diagnosis. *Clin Infect Dis* 2011;52:S284–A289.
31. Esposito S, Principi N. Unsolved problems in the approach to pediatric community-acquired pneumonia. *Curr Opin Infect Dis*. 2012;25:286-291.
32. Pneumonia Vaccine Trial Investigators' Group. Standardization of Interpretation of Chest Radiographs for the Diagnosis of Pneumonia in Children. WHO/V&B/01.35. Geneva: World Health Organization, 2001.
33. Cherian T, Mulholland EK, Carlin JB, *et al.* Standardized interpretation of paediatric chest radiographs for the diagnosis of pneumonia in epidemiological studies. *Bull World health Organ*. 2005;83:353-359.
34. Cutts FT, Zaman SM, Enwere G, *et al.*; Gambian Pneumococcal Vaccine Trial Group. Efficacy of nine-valent pneumococcal conjugate vaccine against pneumonia and invasive pneumococcal disease in The Gambia: randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2005;365:1139-1146.
35. Hansen J, Black S, Shinefiled H, *et al.* Effectiveness of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children younger than 5 years of age for prevention of pneumonia: updated analysis using WHO standardized interpretation of chest radiographs. *Pediatr Infect Dis J* 2006;25:779-781.
36. Wolf DG, Greenberg D, Shemer-Avni Y, *et al.* Association of human metapneumovirus with radiographically diagnosed community-acquired alveolar pneumonia in young children. *J Pediatr* 2010;156:115-120.
37. Juvén T, Mertsola J, Waris M, *et al.* Etiology of community-acquired pneumonia in 254 hospitalized children. *Pediatr Infect Dis J* 200;19:293-298.
38. Tsolia MN, Psarras S, Bossios A, *et al.* Etiology of community-acquired pneumonia in hospitalized school-age children: evidence for high prevalence of viral infections. *Clin Infect Dis*. 2004;39:681-686.
39. Cilla G, Onate E, Perez-Yarza EG, *et al.* Viruses in community-acquired pneumonia in children aged less than 3 years old: high rate of viral infection. *J Med Virol*. 2008;80:1843-1849.
40. Nascimento-Carvalho CM, Ribeiro CT, Cardoso MR, *et al.* The role of respiratory viral infections among children hospitalized for community-acquired pneumonia in a developing country. *Pediatr Infect Dis J* 2008;27:939-941.
41. Cevey-Macherel M, Galetto-aAcour A, Gervaix A, *et al.* Etiology of

community-acquired pneumonia in hospitalized children based on WHO clinical guidelines. *Eur J Pediatr* 2009;168:1429-1436.

42. Honkinen M, Lahti E, Osterback R, *et al.* Viruses and bacteria in sputum samples of children with community-acquired pneumonia. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:300-307.

43. Techasaensiri B, Techasaensiri C, Mejias A, *et al.* Viral coinfections in children with invasive pneumococcal disease. *Pediatr Infect Dis J* 2010;29:519-523.

44. Levine OS, Liu G, German RL, *et al.* *Haemophilus influenzae* type b and *Streptococcus pneumoniae* as causes of pneumonia among children in Beijing, China. *Emerg Infect Dis* 2006;6:165-170.

45. Vu HT, Yoshida LM, Suzuki M, *et al.* Association between nasopharyngeal load of *Streptococcus pneumoniae*, viral coinfection, and radiologically confirmed pneumonia in vietnamese children. *Pediatr Infect Dis J* 2011;30:11-18.

46. Kennedy JL, Turner RB, Braciale T, *et al.* Pathogenesis of rhinovirus infection. *Curr Opin Virol* 2011;2:287-293.

47. Mahony JB, Petrich A, Smieja M. Molecular diagnosis of respiratory virus infections. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2011;48:217-249.

48. Turner RB, Lande AE, Chase P, *et al.* Pneumonia in pediatric outpatients: cause and clinical manifestations. *J Pediatr* 1987;111:194-200.

49. Cheuk DK, Tang IW, Chan KH, *et al.* Rhinovirus infection in hospitalized children in Hong Kong: a prospective study. *Pediatr Infect Dis J* 2007;26:995-1000.

50. Hayden FG. Rhinovirus and the lower respiratory tract. *Rev Med Virol* 2004;14:17-31.

51. Brownlee JW, Turner RB. New developments in the epidemiology and clinical spectrum of rhinovirus infections. *Curr Opin Pediatr* 2008;20:67-71.

52. Mermond S, Zurawski V, D'Ortenzio E, *et al.* Lower respiratory infections among hospitalized children in New Caledonia: a pilot study for the Pneumonia Etiology Research for Child Health project. *Clin Infect Dis* 2012;54 Suppl 2:S180-S189

53. García-García ML, Calvo C, Falcón A, *et al.* Role of emerging respiratory viruses in children with severe acute wheezing. *Pediatr Pulmonol* 2010;45:585-

591.

54. Calvo C, Pozo F, García-García ML, *et al.* Detection of new respiratory viruses in hospitalized infants with bronchiolitis: a three-year prospective study. *Acta Paediatr* 2010;99:883-887.

55. Lee SL, Chiu SS, Malik PJ, *et al.* Is respiratory viral infection really an important trigger of asthma exacerbations in children? *Eur J Pediatr* 2011;170:1317-1324.

56. Piralla A, Rovida F, Baldanti F, *et al.* Enterovirus genotype EV-104 in humans, Italy, 2008–2009. *Emerg. Infect Dis* 2010;16:1018–1021.

57. Piralla A, Lilleri D, Sarasini A, *et al.* Human rhinovirus and human respiratory enterovirus (EV68 and EV104) infections in hospitalized patients in Italy, 2008–2009. *Diagn Microb Infect Dis* 2012;73:162–167.

58. Racaniello, V.R. Picornaviridae: the viruses and their replication. In: Knipe, D.M. (Ed.), *Fields Virology*, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2007;pp. 796–839.

59. Walsh P, Overmyer CL, Pham K, *et al.* Comparison of respiratory virus detection rates for infants and toddlers by use of flocked swabs, saline aspirates, and saline aspirates mixed in universal transport medium for room temperature storage and shipping. *J Clin Microbiol* 2008;46:2374–2376.

60. Abu-Diab A, Azzeh M, Ghneim R, *et al.* Comparison between pernasal flocked swabs and nasopharyngeal aspirates for detection of common respiratory viruses in samples from children. *J Clin Microbiol* 2008;46:2414–2417.

61. Lambert SB, Whiley DM, O'Neill NT, *et al.* Comparing nose-throat swabs and nasopharyngeal aspirates collected from children with symptoms for respiratory virus identification using real-time polymerase chain reaction. *Pediatrics* 2008;122:e615–e620.

62. Esposito S, Molteni CG, Daleno C, *et al.* Comparison of nasopharyngeal nylon flocked swabs with universal transport medium and rayon-bud swabs with a sponge reservoir of viral transport medium in the diagnosis of paediatric influenza. *J Med Microbiol* 2010;59(Pt 1):96–99.

63. Esposito S, Daleno C, Baldanti F, *et al.* Viral shedding in children infected by pandemic A/H1N1/2009 influenza virus. *Viol J* 2011;8:349.

64. Esposito S, Indinnimeo L, Duse M, *et al.* Diagnosis and treatment of

community-acquired pneumonia in pediatric age –guidelines of the Italian Pediatric Societies (SIP, SITIP, SIMRI, SIAIP, SIPPS, SIMEUP). *Minerva Pediatr* 2009;61:887–890.

65. Pabbaraju K, Wong S, Tokaryk KL, et al. Comparison of the Luminex xTAG™ respiratory viral panel with xTAG(R) respiratory viral panel fast for diagnosis of respiratory virus infections. *J Clin Microbiol* 2011;49:1738–1744.

66. Gadsby NJ, Hardie A, Claas EC, Templeton KE. Comparison of the Luminex respiratory virus panel fast assay with in-house real-time PCR for respiratory viral infection diagnosis. *J Clin Microbiol* 2010;48:2213–2216.

67. Savolainen C, Blomqvist S, Mulders MN, et al. Genetic clustering of all 102 human rhinovirus prototype strains: serotype 87 is close to human enterovirus 70. *J Gen Virol* 2002;83:333-340.

68. Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 2011;28:2731-2739.

69. Esposito S, Marchese A, Tozzi AE, et al. Italian Pneumococcal CAP Group. Bacteriemic pneumococcal community-acquired pneumonia in children less than 5 years of age in Italy. *Pediatr Infect Dis J* 2012;31:705-710.

70. Heath PT. Epidemiology and bacteriology of bacterial pneumonias. *Paediatr Respir Rev* 2000;1:4–7.

71. van Benten I, Koopman L, Niesters B, et al. Predominance of rhinovirus in the nose of symptomatic and asymptomatic infants. *Pediatr Allergy Immunol* 2003;14:363-370.

72. Wright PF, Deatly AM, Karron RA, et al. Comparison of results of detection of rhinovirus by PCR and viral culture in human nasal wash specimens from subjects with and without clinical symptoms of respiratory illness. *J Clin Microbiol* 2007;45:2126-2129.

73. van Piggelen RO, van Loon AM, Krediet TG, et al. Human rhinovirus causes severe infection in preterm infants. *Pediatr Infect Dis J* 2010;29:364-365.

74. Arakawa M, Okamoto-Nakagawa R, Toda S, et al. Molecular epidemiological study of human rhinovirus species A, B and C from patients with acute respiratory illnesses in Japan. *J Med Microbiol* 2012;61:410-419.

75. Henquell C, Mirand A, Deusebis AL, et al. Prospective genotyping of human

rhinoviruses in children and adults during the winter of 2009–2010. *J Clin Virol* 2012;53:280-284.

76. Calvo C, Casas I, García-García ML, *et al.* Role of rhinovirus C respiratory infections in sick and healthy children in Spain. *Pediatr Infect Dis J* 2010;29:717-720.

77. Linsuwanon P, Payungporn S, Samransamruajkit R, *et al.* High prevalence of human rhinovirus C infection in Thai children with acute lower respiratory tract disease. *J Infect* 2009;59:115-121.

78. Miller EK, Lu X, Erdman DD, *et al.* Rhinovirus-associated hospitalizations in young children. *J Infect Dis* 2007;195:773-781.

79. Fry AM, Lu X, Olsen SJ, Chittaganpitch M, *et al.* Human rhinovirus infections in rural Thailand: epidemiological evidence for rhinovirus as both pathogen and bystander. *PLOS One* 2011;6:e17780.

80. Piralla A, Rovida F, Campanini G, *et al.* Clinical severity and molecular typing of human rhinovirus C strains during a fall outbreak affecting hospitalized patients. *J Clin Virol* 2009;45:311-317.

81. Piralla A, Baldanti F, Gerna G. Phylogenetic patterns of human respiratory picornavirus species, including the newly identified group C rhinoviruses, during a 1-year surveillance of a hospitalized patient population in Italy. *J Clin Microbiol* 2011;49:373-376.

82. Pierangeli A, Ciccozzi M, Chiavelli S, *et al.* Molecular epidemiology and genetic diversity of human rhinovirus affecting hospitalized children in Rome. *Med*

Microbiol Immunol 2013. Manca volume e pagine

83. Wisdom A, Kutkowska AE, McWilliam Leitch EC, *et al.* Genetics, recombination and clinical features of human rhinovirus species C (HRV-C) infections; interactions of HRV-C with other respiratory viruses. *PLoS One* 2009;4:e8518.

84. Sansone M, Andersson M, Brittain-Long R, *et al.* Rhinovirus infections in western Sweden: a four-year molecular epidemiology study comparing local and globally appearing types. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013;32:947-954.

85. McIntyre CL, Knowles NJ, Simmonds P. Proposals for the classification of human rhinovirus species A, B and C into genotypically assigned types. *J Gen*

Virology 2013;94 (Pt 8):1791-1806.

86. GenBank JN855894.1. Human rhinovirus A isolate SO6316 polyprotein gene, partial cds. Available: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/375331053?report=genbank&log\\$=nucltop&blast_rank=1&RID=YZ63AMJF01R](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/375331053?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=1&RID=YZ63AMJF01R).

Accessed 2013 August 6.

87. GenBank FJ615683.1 Human rhinovirus sp. isolate 202692 polyprotein gene, partial cds. Available: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/258562738?report=genbank&log\\$=nucltop&blast_rank=4&RID=YZ63AMJF01R](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/258562738?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=4&RID=YZ63AMJF01R).

Accessed 2013 August 6.

88. Xiang Z, Gonzalez R, Xie Z, *et al.* Human rhinovirus C infections mirror those of human rhinovirus A in children with community acquired pneumonia. *J Clin Virol* 2010;49:94-99.

89. Huang T, Wang W, Bessaud M, *et al.* Evidence of recombination and genetic diversity in human rhinoviruses in children with acute respiratory infection. *PLOS One* 2009;4:e6355.

90. Wisdom A, Leitch EC, Gaunt E, *et al.* Screening respiratory samples for detection of human rhinoviruses (HRVs) and enteroviruses: comprehensive VP4-VP2 typing reveals high incidence and genetic diversity of HRV species C. *J Clin Microbiol* 2009;47:3958-3967.

91. Savolainen C, Mulders MN, Hovi T. Phylogenetic analysis of rhinovirus isolates collected during successive epidemic seasons. *Virus Res* 2002;85:41-46.

92. Kaida A, Kubo H, Sekiguchi J, *et al.* Enterovirus 104 infection in adult, Japan, 2011. *Emerg Infect Dis* 2012;18:882-883.

93. Tapparel C, Junier T, Gerlach D, *et al.* New respiratory enterovirus and recombinant rhinoviruses among circulating picornaviruses. *Emerg Infect Dis* 2009;15:719-726.

94. Brown B, Oberste MS, Maher K, *et al.* Complete genomic sequencing shows that polioviruses and members of human enterovirus species C are closely related in the non capsid coding region. *J Virol* 2003;77:8973-8984.

95. Brown B, Maher K, Flemister MR, *et al.* Resolving ambiguities in genetic typing of human enterovirus species C clinical isolates and identification of enterovirus 96, 99 and 102. *J Gen Virol* 2009;90:1713-1723.

96. Oberste MS, Peñaranda S, Pallansch MA. RNA recombination plays a major

role in genomic change during circulation of coxsackie B viruses. *J Virol* 2004;78:2948–2955.

97. Oberste MS, Maher K, Pallansch MA. Evidence of frequent recombination within species human enterovirus B based on complete genomic sequences of all thirty-seven serotypes. *J Virol* 2004;78:855–867.

98. Simmonds P, Welch J. Frequency and dynamics of recombination within species of human enteroviruses. *J Virol* 2006;80:483–493.

99. Lukashev AN. Role of recombination in evolution of enteroviruses. *Rev Med Virol* 2005;15:157–167.

100. Bailly JL, Mirand A, Henquell C, *et al.* Phylogeography of circulating populations of human echovirus 30 over 50 years: nucleotide polymorphism and signature of purifying selection in the VP1 capsid protein gene. *Infect Genet Evol* 2009;9:699–708.

101. Fry AM, Lu X, Chittaganpitch M, *et al.* Human Bocavirus: a novel parvovirus epidemiologically associated with pneumonia requiring hospitalization in Thailand. *J Infect Dis* 2007;195:1038–1045.

102. Don M, Soederlund-Venermo M, Valent F, *et al.* Serologically verified human bocavirus pneumonia in children. *Pediatr Pulmunol* 2010;45:120–126.

103. Allander T, Jarri T, Gupta S, *et al.* Human bocavirus and acute wheezing in children. *Clin Infect Dis* 2007;44:904–910.

104. Vicente D, Cilla G, Montes M, *et al.* Human bocavirus, a respiratory and enteric virus. *Emerg Infect Dis* 2007;13:636–637.

105. Schildgen O, Müller A, Allander T, *et al.* Human bocavirus: passenger or pathogen in acute respiratory tract infections? *Clin Microbiol Rev* 2008;21:291–304.

106. Esposito S, Bosis S, Niesters HG, *et al.* Impact of human bocavirus on children and their families. *J Clin Microbiol* 2008;46:1337–1342.

107. Esposito S, Principi N. The rational use of influenza vaccines in healthy children and children with underlying conditions. *Curr Opin Infect Dis* 2009;22:244–249.

108. Principi N, Esposito S, Marchisio P. Present and future of influenza prevention in pediatrics. *Expert Opin Biol Ther* 2011;11:641–653.

109. Esposito S, Cantarutti L, Molteni CG, *et al.* Clinical manifestations and

socio-economic impact of influenza among healthy children in the community. *J Infect* 2011;62:379–387.

110. Principi N, Esposito S. Antigen-based assays for the identification of influenza virus and respiratory syncytial virus: why and how to use them in pediatrics. *Clin Lab Med* 2009;29:649–660.

111. Fiore AE, Fry A, Shay D, *et al.* Antiviral agents for the treatment and chemoprophylaxis of influenza—recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 2011;60:1–24.

112. Honkinen M, Lahti E, Osterback R, *et al.* Viruses and bacteria in sputum samples of children with community-acquired pneumonia. *Clin Microbiol Infect* 2011 manca volume e pagine.

113. Lahti E, Peltola V, Waris M, *et al.* Induced sputum in the diagnosis of childhood community-acquired pneumonia. *Thorax* 2009;64:252–257.