

Fondo finanziamento degli investimenti e lo sviluppo infrastrutturale del Paese
(Legge n. 145/2018 art. 1 comma 95)

Dati generali

Settore di intervento	Ricerca			
Ente/Rete IRCCS proponente	Associazione Rete Italiana Salute dell'Età Evolutiva (Rete IDEA)			
Codice fiscale Ente/Rete	97942850583	Tipo soggetto: Pubblico/Privato		Privato
Sede Legale	c/o Ospedale Pediatrico Bambino Gesù. Piazza S. Onofrio 4 – 00165 - Roma			
Rappresentante legale (RL) Ente/Rete	Bruno Dallapiccola	Codice fiscale		DLLBRN41E07B171K
Telefono RL	0039 06 68592577	Indirizzo PEC	direzione.scientifica@pec.opbg.net	Fax

Titolo progetto

Il microbiota umano nella medicina dei sistemi applicata alla diagnosi e alla terapia in pediatria

Durata progetto

Anni

2022/2023/2024

Abstract progetto

Molte patologie pediatriche si associano a modificazioni dell'assetto funzionale dell' "organo" microbiota intestinale. Il suo genoma o microbioma si associa all'ecologia complessa di 10^{14} batteri, un volume 100 volte più grande rispetto al genoma umano. I commensali di questo ecosistema svolgono un ruolo omeostatico, agendo come barriera dinamica contro la traslocazione dei patogeni, esercitano funzioni metaboliche fondamentali e promuovono lo sviluppo del sistema immunitario (SI) in età infantile ed hanno un'azione modulante sul genoma.

Quando l'omeostasi viene perturbata, si innesca uno stato disbiotico, associato ad un quadro eterogeneo di patologie pediatriche, come le malattie e le sindromi infiammatorie dell'intestino (ad es. IBD, IBS), le malattie metaboliche, endocrine, l'obesità, la steatosi e la fibrosi epatica, relativamente all'asse cosiddetto intestino-fegato, ma anche patologie sistemiche come la fibrosi cistica (FC), le malattie autoinfiammatorie/autoimmunitarie (ad es. artrite idiopatica giovanile), le sindromi genetiche come la sindrome di Williams e la sindrome di Down, le allergie (ad es. dermatiti atopiche), i disturbi dell'asse cervello-intestino, come nel caso dell'autismo o di particolari disturbi del comportamento (Pediatric Acute Neuropsychiatric Disorders, PANS), compresi quelli a presunta eziologia infettiva (Pediatric Acute Neuropsychiatric Disorders Associated with A streptococci PANDA), le patologie neoplastiche ed i quadri infettivi sistemici o distretto-specifici, come nel caso della patologia COVID-19. Del tutto attuale, inoltre, è il controllo delle infezioni da germi multi-drug-resistant (MDR), attraverso la valutazione della loro colonizzazione del microbiota intestinale ed il controllo/prevenzione degli eventi di traslocazioni microbiche, pre-settiche, come nuova strategia nella gestione antimicrobica dei pazienti immunodepressi. Nel caso della malattia acuta da rigetto (Graft Versus Host Disease, GVHD), che spesso complica il trapianto di cellule staminali emopoietiche allogeniche, la biodiversità del microbiota intestinale può dare luogo a forme meno severe della stessa e fondamentale appare il suo monitoraggio pre- e post-trapianto.

La comprensione del profilo del microbiota intestinale "sano" nelle prime fasi di vita, dalla nascita all'intera infanzia, riveste un ruolo cruciale nella gestione delle malattie pediatriche associate al microbiota, ma anche nella prevenzione delle malattie croniche che si svilupperanno nel corso della vita e risponde alla richiesta di definire l'eubiosi intestinale, attraverso la creazione di modelli di base, indispensabili per poi valutare qualsiasi evento disbiotico.

Essenziale, in questo contesto, appare anche la comprensione dell'interazione pre/perinatale mamma-bambino sulle caratteristiche del microbiota alla nascita, quale fattore "condizionante" di salute/malattia dello sviluppo fisico-cognitivo del bambino. L'IRCCS Burlo Garofolo è attualmente impegnato nello studio degli effetti del dismicrobismo e dello stato infiammatorio correlato dell'ecosistema vaginale, nell'infertilità, nella suscettibilità alle infezioni, e nello sviluppo dell'asse intestino-cognitivo in epoca neonatale

Lo sviluppo di tecnologie "meta-omiche" (metagenomica, metabolomica, proteomica e metaproteomica), di algoritmi analitici e di processi correlati (data management system e decision support system) per il mappaggio del microbiota presso l'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù (OPBG), basati su complesse piattaforme tecnologiche e avanzate procedure analitiche e computazionali, si sono rivelati idonei a fornire risultati traslazionali originali nella caratterizzazione del microbiota pediatrico,

Progetto di investimento art. 1, comma 95, della legge 30 dicembre 2018, n. 145 – Ente/Rete proponente Associazione Rete Italiana Salute dell'Età Evolutiva (Rete IDEA) – Progetto "Il microbiota umano nella medicina dei sistemi applicata alla diagnosi e alla terapia in pediatria"

consentendo di chiarire alcuni nuovi aspetti della sua modulazione e interazione con gli stimoli esterni (ad es. agenti patogeni, infettoma) e con la dieta (ad es. profili nutrizionali, “foodoma”), nel contesto della variabilità genetica dell’ospite. Queste tecnologie assistono un team multidisciplinare clinico-laboratoristico nella generazione di profili individualizzati del microbiota, fornendo carte “omiche” genomiche e biochimiche cosiddette “integrate”, basate su metatassonomia, attività metaboliche e reservoir proteico del microbiota analizzato. Tali mappe integrate sono a disposizione dei team clinici, per comprendere le alterazioni funzionali del microbiota, correlarle ai parametri anamnestico-clinici del paziente (metadati) e per valutare strategie correttive o di clearance, mediante interventi nutrizionali, di somministrazione di probioici, prebiotici personalizzati fino al trapianto di microbiota fecale (Fecal Microbiota Transplantation, FMT), già disponibile in OPBG come Protocollo Ospedaliero dal 2017.

Questo progetto propone la disseminazione e l’implementazione delle esperienze della Rete nell’ambito della caratterizzazione metaomica del microbiota mediante il coordinamento del progetto da parte dell’OPBG, al fine di ottenere una immediata ricaduta traslazionale e diagnostico-clinica su scala nazionale. L’esperienza sarà estesa all’interno della Rete Pediatrica, utilizzando competenze condivise, tecnologie e set di dati pre-esistenti, la disponibilità di pazienti pediatrici che possono fornire un reservoir continuo di tratti clinici per le principali patologie correlate al microbiota, nell’ambito dei quadri funzionali fegato-intestino, cervello-intestino, sistemico.

Sono previste le seguenti attività:

- i) estensione della Biobanca di riferimento del microbiota pediatrico per la generazione di profili malattia (la Banca OPBG al momento dispone di circa 10.000 campioni di microbiota pediatrico);
- ii) fornire un sistema Open or Limited Access Source di profili di microbiota per la comunità clinica;
- iii) fornire profili diagnostici di microbiota associati a stati fisiologici e patologici (definizione di enterotipi o “enterogradienti” intestinali);
- iv) definire gli aspetti relativi alla diagnosi e alla prognosi delle disbiosi intestinali, relative ad alcune importanti patologie pediatriche;
- v) sviluppare terapie alternative o supplementari, basate sull’uso personalizzato di probiotici e prebiotici, in grado di indurre modificazioni paziente-specifiche del microbiota;
- vi) migliorare la gestione clinica del paziente, con particolare riguardo alle esigenze nutrizionali, e, di conseguenza, alla qualità di vita;
- vii) costituzione di una Biobanca per l’FMT pediatrico
- viii) disegnare, sulla base dei profili “misurati” di disbiosi intestinale, modulazioni interventiste del microbiota basate su FMT.

Ente attuatore: Associazione Rete Italiana Salute dell’Età Evolutiva (Rete IDEA)	N.
IRCCS/Enti aderenti al progetto di Rete (Elenco allegato con indicazione del codice fiscale, tipo soggetto giuridico, quota costo progetto)	
Ospedale Pediatrico Bambino Gesù: Bruno Dallapiccola/Lorenza Putignani bruno.dallapiccola@opbg.net , lorenza.putignani@opbg.net ; GASLINI Angelo Ravelli/Roberto Biassoni, angeloravelli@gaslini.org , robertobiassoni@gaslini.org ; STELLA MARIS , Giovanni Cioni/Sara Calderoni, direttore.scientifico@fsm.unipi.it , sara.calderoni@fsm.unipi.it ; IRCCS Eugenio Medea , Maria Teresa Bassi/Marco Pozzi, mariateresa.bassi@lanostrafamiglia.it , marco.pozzi@lanostrafamiglia.it ; Oasi Maria SS , Raffaele Ferri/Franco Calì, rferri@oasi.en.it , cali@oasi.en.it ; Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta , Giuseppe Lauria Pinter/Stefano D’Arrigo, Giuseppe.LauriaPinter@istituto-besta.it , stefano.darrigo@istituto-besta.it ; Burlo Garofolo , Paolo Gasparini, paolo.gasparini@burlo.trieste.it ; Fondazione Agostino Gemelli IRCCS , Giovanni Scambia/Antonio Gasbarrini, giovanni.scambia@policlinicogemelli.it , antonio.gasbarrini@unicatt.it ; San Raffaele , Martino Gianvito/Alessandro Aiuti, martino.gianvito@hsr.it , aiuti.alessandro@hsr.it ; IRCCS C. Mondino , Fabio Blandini/Enza Maria Valente, dircsi@mondino.it , enzamaria.valente@unipv.it .	

Dati del Coordinatore scientifico del progetto (C.S.P.)	
Nominativo	Lorenza Putignani

Progetto di investimento art. 1, comma 95, della legge 30 dicembre 2018, n. 145 – Ente/Rete proponente **Associazione Rete Italiana Salute dell’Età Evolutiva (Rete IDEA)** – Progetto “Il microbiota umano nella medicina dei sistemi applicata alla diagnosi e alla terapia in pediatria”

Ente/IRCCS di appartenenza	OPBG		
Codice fiscale Ente/IRCCS	80403930581	Tipo soggetto: Pubblico/Privato	Privato
Sede Legale Ente/IRCCS	Piazza Sant'Onofrio 4, 00165 Roma (RM)		
Rappresentante legale Ente/IRCCS	Mariella Enoc	Codice fiscale	NCEMLL44A67F952B
Posizione C.S.P. presso Ente/IRCCS	Responsabile della Struttura Semplice di Microbiomica Responsabile della UdR Microbioma (Area di Ricerca Medicina Multimodale di Laboratorio)		
Posizione contrattuale C.S.P.	Dirigente non medico		
Tipo Contratto C.S.P.	Dirigente non medico a tempo indeterminato		
	06 6859 2577	Indirizzo PEC	Direzione.scientifica@pec.opbg.net
Telefono C.S.P.	06 6859 2598/4127	Indirizzo mail C.S.P.	lorenza.putignani@opbg.net

Ente/IRCCS delegato ad effettuare i pagamenti e ad accreditarsi sul sistema BDAP, se diverso dal proponente/beneficiario del contributo ministeriale			
IRCCS/Ente delegato	(Denominazione)		
Tipo soggetto: Pubblico/Privato		IRCCS/Ente codice fiscale	

Progetto di investimento art. 1, comma 95, della legge 30 dicembre 2018, n. 145 – Ente/Rete proponente Associazione Rete Italiana Salute dell'Età Evolutiva (Rete IDEA) – Progetto "Il microbiota umano nella medicina dei sistemi applicata alla diagnosi e alla terapia in pediatria"

Il progetto prevede l'autorizzazione del comitato etico?

SI

(Se **SI** specificare)

Titolo Progetto sottomesso al Comitato etico	Il microbiota umano nella medicina dei sistemi applicata alla diagnosi e alla terapia in pediatria
Comitato Etico di riferimento principale	OPBG
Data parere del Comitato Etico Principale	
Eventuale Comitato Etico Locale di riferimento	
Eventuale Data parere del Comitato Etico Locale di riferimento	
Parere Comitato Etico	
Progetto approvato senza modifiche	
Progetto approvato con modifiche	
Nominativo del responsabile che presenta il progetto al Comitato Etico	LORENZA PUTIGNANI
Istituzione di appartenenza del responsabile che presenta il progetto al Comitato Etico	OPBG

Allegare al presente modulo il parere del Comitato Etico.

Il progetto prevede fasi di sperimentazione su modelli animali?

SI/NO
NO

(Se **SI** specificare)

Titolo Progetto Autorizzato Sperimentazione Animale	
Nominativo del responsabile sperimentazione animale	
Ente responsabile sperimentazione animale	
Data Decreto autorizzazione sperimentazione. animale	
Numero autorizzazione sperimentazione. animale	
Durata in mesi sperimentazione animale	
Tipo animali sperimentazione. animale	
Numero animali sperimentazione. animale	
Ulteriori Enti finanziatori del progetto di sperimentazione animale	

Allegare al presente modulo il decreto di autorizzazione alla sperimentazione animale.

Nel caso in cui la denominazione del progetto sia diversa dal titolo del progetto da finanziare oppure il responsabile della sperimentazione animale non risulta elencato tra i ricercatori partecipanti al progetto da finanziare, si prega di allegare autodichiarazione legale del responsabile del Benessere Animale attestante che l'autorizzazione presentata è valida per il progetto in questione.

Allegata autodichiarazione legale del responsabile del benessere animale sulla sperimentazione animale.

PIANO DI VALUTAZIONE

OBIETTIVO GENERALE

Il progetto si propone di generare profili di microbiota intestinale (enterofenotipi), in presenza di disbiosi (condizioni patologiche), correlati alla presenza di processi infiammatori a localizzazione intestinale (IBD e IBS) ed extra-intestinale come sindromi e disturbi metabolici, malattie genetiche (ad es. fibrosi cistica, sindrome di Down, sindrome di Williams), patologie autoimmunitarie (artrite idiopatica giovanile, sindrome da attivazione macrofagica), malattie neurologiche e del comportamento (ad es. autismo), obesità e steatosi epatica, malattie endocrine, in pazienti pediatriche di età compresa tra 0-18 anni, confrontati con gruppi di controllo (condizioni fisiologiche), stratificati per intervalli di età sovrapponibili ed eventi di programming fisiologico. In particolare, questo progetto di Rete si propone di: i) estendere ed ottimizzare il processo di generazione di carte -omiche di microbioti individuali, associate a vari endofenotipi pediatriche, a partire da quelle già sviluppate nell'OPBG, ad un reservoir di pazienti e soggetti sani esteso su scala nazionale, attraverso il contributo sinergico degli IRCCS della Rete Pediatrica, al fine di estendere la Biobanca di riferimento dei microbioti pediatriche; ii) fornire un sistema infrastrutturale Open or Limited Access Source di profili di microbiota per la comunità pediatrica scientifica e clinica; iii) applicare ed ottimizzare i workflow diagnostici avanzati sviluppati dal Centro coordinatore del progetto, relativi allo stato disbiotico intestinale, per valutare le ricadute cliniche immediate nella gestione del paziente cronico, compresa la sua terapia; iii) sviluppare algoritmi di decision support system (DSS) per associare microbiota profiling alla diagnosi e alla prognosi delle disbiosi intestinali; iv) utilizzare il DSS per sviluppare terapie alternative o supplementari, basate sull'uso mirato di probiotici e prebiotici, in grado di indurre modificazioni paziente-specifiche del microbiota per migliorare la gestione clinica del paziente; v) disegnare, sulla base dei profili "misurati" di disbiosi intestinale, modulazioni interventiste del microbiota basate su FMT; vii) costituire una Biobanca per l'FMT pediatrico.

La Rete Pediatrica armonizzerà le competenze clinico-laboratoristiche per il reclutamento dei pazienti e per la raccolta campioni su scala nazionale per allestire un database di profili di microbiota predittivi di malattia o associati a processi fisiologici di programming a livello di popolazione. Inoltre, i protocolli di microbiota profiling verranno condivisi tra gli IRCCS con il Centro Coordinatore del progetto in modo da standardizzare le attività di caratterizzazione di microbiota, creare a un database centrale e condiviso, elaborare un DSS congiunto per il trattamento clinico delle patologie microbiota-correlate.

Indicatore/i di risultato
Standard di risultato

Numero dei profili di microbiota generati per anno nel triennio 2022-2024/numero medio dei profili di microbiota generati nel triennio precedente: $n + x/n$, dove x rappresenta il valore incrementale per anno; Indicatore b: Numero dei pazienti pediatriche sottoposti a trattamento nutrizionale o FMT per anno/numero dei pazienti pediatriche arruolati per l'analisi del microbiota per anno.

Nell'ambito della microbiomica traslazionale, e ancor più in quella diagnostica e clinica non esistono allo stato attuale degli **standard di risultato**. Essi verranno definiti proprio da questo Progetto di Rete grazie a processi di standardizzazione delle attività previste in OPBG per il conseguimento degli obiettivi generale e particolari.

OBIETTIVI SPECIFICI

1. Produzione di profili metagenomici di microbiota mediante next generation sequencing (NGS) targeted per l'analisi ecologica o di shot-gun. Per ogni soggetto, in condizioni fisiologiche e/o patologiche, sarà caratterizzato il microbiota intestinale in termini di composizione microbica (OTUs).

Indicatore/i di risultato

-Numero di campioni interamente processati nel flusso di lavoro NGS (profilati) ogni mese/numero di campioni raccolti dal progetto della Rete Pediatrica ogni mese.
-Indicatori di qualità di processo NGS: Check points di quality control (QC) per l'intero processo NGS
-Indicatori valutati dal Gruppo di Lavoro GdL III su Microbiota del Consiglio Superiore di Sanità.
-Indicatori interni qualità OPBG della ISO UNI EN ISO 9001: 2015.

Standard di risultato

Nell'ambito dei processi NGS per la caratterizzazione del microbiota umano in ambito traslazionale, e ancor più in quello diagnostico e clinico, non esistono allo stato attuale degli **standard di risultato**. Essi verranno definiti proprio da questo Progetto di Rete grazie a processi di standardizzazione delle attività previste in OPBG per il

		conseguimento degli obiettivi generale e particolari e grazie alla valutazione degli indicatori selezionati candidati a divenire possibili standard di risultato dell'obiettivo specifico 1.
2. Produzione di profili di microbiota biochimico-funzionali. Per ogni soggetto, in condizioni fisiologiche e/o patologiche, sarà caratterizzato il microbiota intestinale in termini di proprietà funzionali (profilo metabolomico, metaproteomico e caratterizzazione biochimico-proteomico-metabolico dell'ospite).		
	<i>Indicatore/i di risultato</i>	-Indicatori valutati dal Gruppo di Lavoro GdL I su Trasferimento delle Tecniche Omiche nella pratica clinica” del Consiglio Superiore di Sanità. -Indicatori interni qualità OPBG della ISO UNI EN ISO 9001: 2015.
	<i>Standard di risultato</i>	Nell'ambito dei processi di caratterizzazione biochimica del microbiota umano in ambito traslazionale, e ancor più in quello diagnostico e clinico, non esistono allo stato attuale degli standard di risultato . Essi verranno definiti proprio da questo Progetto di Rete grazie a processi di standardizzazione delle attività previste in OPBG per il conseguimento degli obiettivi generale e particolari e grazie alla valutazione degli indicatori selezionati candidati a divenire possibili standard di risultato dell'obiettivo specifico 2.
3. Attraverso l'integrazione dei dati o dei profili omici di cui all'obiettivo specifico 1 e 2, si costruiranno mappe meta-omiche stratificate per tipologia di bambino (sano/malato) e per età. Allo scopo saranno eseguite valutazioni computazionali per rispondere alla percentuale ottimale di valore nullo nelle matrici complesse di dati omici NGS e di metabolomica, valutando il decremento della varianza del sistema. Inoltre, mediante cicli iterativi saranno valutati gli outliers del sistema e le variabili ottimali in grado di descrivere il microbiota. Scelto il set ottimale di low fused data a partire dai dati multidimensionali, si procederà all'integrazione dei dati omici e alla produzione di modelli chemiometrici, come precedentemente riportato per i modelli metabolici. In questo caso, il modello integrato sarà utilizzato come modello predittivo diagnostico e prognostico di malattia (Del Chierico et al., 2017). Le mappe meta-omiche consentiranno di evidenziare il fenotipo-malattia significativamente associato con le alterazioni del microbiota intestinale. Le caratteristiche differenziali del contenuto microbico e/o della funzionalità del microbioma intestinale, saranno selezionate come indici di perturbazione/malattia.		
	<i>Indicatore/i di risultato</i>	-Indicatori interni qualità OPBG della ISO UNI EN ISO 9001: 2015 -Indicatori valutati dal Gruppo di Lavoro GdL I su Trasferimento delle Tecniche Omiche nella pratica clinica” del Consiglio Superiore di Sanità.
	<i>Standard di risultato</i>	Nell'ambito dei processi di integrazione dei dati omici del microbiota umano in ambito traslazionale, e ancor più in quello diagnostico e clinico, non esistono allo stato attuale degli standard di risultato . Essi verranno definiti proprio da questo Progetto di Rete grazie a processi di standardizzazione delle attività previste in OPBG per il conseguimento degli obiettivi generale e particolari e grazie alla valutazione degli indicatori selezionati candidati a divenire possibili standard di risultato dell'obiettivo specifico 3.
4. Creazione di un database nazionale pediatrico di profili microbiologici e metabolomici di microbiota. I profili ottenuti (obiettivo specifico 1, 2 e 3) saranno organizzati in un database nazionale con accesso alla comunità clinica e scientifica pediatrica, per rendere fruibili le informazioni sui profili del microbiota alla comunità scientifica e clinica pediatrica. Le apparecchiature e i metodi indicati negli obiettivi 1-3 produrranno una grande quantità di dati che dovranno essere efficacemente “tradotti” per fornire un'interpretazione integrata dei profili del microbiota. L'opera di traduzione è normalmente affidata a database pubblici presenti nel web (NCBI, SWISSPROT, NIST), di enormi dimensioni, che forniscono dati ridondanti. L' obiettivo 4 si propone di costruire dei database personalizzati di metagenomica, metaproteomica e metabolomica. L'interfacciamento tra la strumentazione e il suo specifico database permetterà di eseguire, con modalità processiva (flusso generazione dati e interpretazione profili), la completa caratterizzazione strutturale e/o funzionale del microbiota intestinale, per produrre banche dati personalizzate per il paziente pediatrico. Per questo, nella gestione tecnologica è prevista la presenza di un server per la conservazione e la gestione dei dati. Sarà formalizzata una collaborazione con il sistema centrale CINECA o altro Ente erogatore di spazio server per l'archiviazione dati.		
	<i>Indicatore/i di risultato</i>	- Indicatori di sistema BIMS: Biomedical Information Management System. -Indicatori di Decision Support System (DSS)
	<i>Standard di risultato</i>	Nell'ambito della generazione di database personalizzati di microbiota umano in ambito traslazionale, e ancor più in quello diagnostico e clinico, non esistono allo stato attuale degli standard di risultato . Essi verranno definiti proprio da questo Progetto di Rete grazie a processi di standardizzazione delle attività previste in OPBG per il conseguimento degli obiettivi generale e particolari e grazie alla valutazione degli

		indicatori selezionati candidati a divenire possibili standard di risultato dell'obiettivo specifico 4.
5.	Scale-up di analisi diagnostiche del microbiota. L'Unità di Microbioma Umano dell'OPBG attualmente processa circa 2000 campioni/anno per l'analisi NGS del microbiota a scopo diagnostico. Nel triennio 2022-2024 si prevede un aumento delle analisi fino a 3000 campioni/anno all'interno della Rete Pediatrica creata dal progetto.	
	<i>Indicatore/i di risultato</i>	Numero di profili di microbiota generati per anno nel triennio 2022-2024/numero medio dei profili di microbiota generati nel triennio precedente: $n + x/n$, dove x rappresenta il valore incrementale per anno.
	<i>Standard di risultato</i>	Nell'ambito della microbiomica traslazionale, e ancor più in quella diagnostica e clinica non esistono allo stato attuale degli standard di risultato in termini di ottimizzazione del numero die profili ottenibili in un anno . Essi verranno definiti proprio da questo Progetto di Rete grazie a processi di standardizzazione delle attività previste in OPBG per il conseguimento degli obiettivi generale e particolari.
6.	Produzione di profili diagnostici del microbiota per lo screening donatore/ricevente di trapianto di microbiota intestinale (FMT). Attualmente L'Unità di Microbioma Umano dell'OPBG fornisce profili di screening per FMT in ambito pediatrico. Nel triennio 2022-2024 si prevede di eseguire uno scale-up dello screening diagnostico per FMT e di costituire una Biobanca FMT condivisa con gli IRCCS della Rete Pediatrica aderenti al progetto.	
	<i>Indicatore/i di risultato</i>	-Numero di pazienti pediatrici sottoposti a trattamento nutrizionale o FMT per anno/numero dei pazienti pediatrici arruolati per l'analisi del microbiota per anno. - ISO UNI EN ISO 9001: 2015 -Protocollo clinico OPBG per il Trapianto Fecale -Indicazioni condivise CNT/OPBG -Linee guida Internazionali su FMT (Keller et al., UEG, 2021; Cammarota et al., GUT, 2019).
	<i>Standard di risultato</i>	Nell'ambito del trapianto fecale pediatrico, non esistono allo stato attuale degli standard di risultato . Essi verranno definiti proprio da questo Progetto di Rete grazie a processi di standardizzazione delle attività previste in OPBG per il conseguimento degli obiettivi generale e particolari.
7.	Trasferimento del sistema DSS generato agli interventi clinici mirati al paziente pediatrico con patologie microbiota-correlate nell'ambito della consensus clinica condivisa dalla Rete.	
	<i>Indicatore/i di risultato</i>	-Numero delle infusioni (x)/numero dei pazienti sottoposti a FMT (n)= nx/n , da considerarsi come misura dell'efficacia dell'FMT. -Indice della parziale o totale reversione al microbiota originale del paziente, n (numero di mesi)/12 mesi.
	<i>Standard di risultato</i>	Nell'ambito del trapianto fecale pediatrico e delle DSS ad esso associati non esistono allo stato attuale degli standard di risultato . Essi verranno definiti proprio da questo Progetto di Rete grazie a processi di standardizzazione delle attività previste in OPBG per il conseguimento degli obiettivi generale e particolari.

Cronoprogramma obiettivi specifici/attività in trimestri
Milestone a 12, 24, 36 mesi

Obiettivo specifico n.	Attività	1° anno (12 mesi) 2022				2° anno (24 mesi) 2023				3° anno (36 mesi) 2024			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		1 “obiettivo specifico” Produzione di profili metagenomici di microbiota mediante next generation sequencing (NGS) targeted per l'analisi ecologica o di shotgun. Per ogni soggetto, in condizioni fisiologiche e/o patologiche, sarà caratterizzato il microbiota intestinale in termini di composizione microbica (OTUs). In questo obiettivo specifico è implicito l'arruolamento dei pazienti e la raccolta dei campioni ad opera di tutta la Rete IRCCS.	Attività 1 Fase pre-analitica 1. I campioni di microbiota dei pazienti saranno sottoposti a procedure software-assisted per la raccolta, l'invio e la conservazione, fino ad estrazione del DNA. NOTA. Allo stato attuale esiste già una Biobanca di microbioti presso l'OPBG, che contiene circa 10.000 campioni, associabili a 52 Progetti di Ricerca Traslazionale.										
Attività 2 Fase analitica 1. Analisi metagenomica targeted. Dal DNA ottenuto sarà amplificato il locus ribosomiale batterico V3-V4 del gene 16S rRNA, riconosciuto come gold standard per l'identificazione batterica, mediante					Valutazione dei profili di microbiota ottenuti				Valutazione dei profili di microbiota ottenuti				

Progetto di investimento art. 1, comma 95, della legge 30 dicembre 2018, n. 145 – Ente/Rete proponente Associazione Rete Italiana Salute dell'Età Evolutiva (Rete IDEA) – Progetto “Il microbiota umano nella medicina dei sistemi applicata alla diagnosi e alla terapia in pediatria”

	<p>primer universali. Ad ogni campione saranno assegnati indici nucleotidici univoci, prima dell'assemblaggio in un pool. L'insieme di questi processi sarà automatizzato mediante l'acquisizione di un sistema robotico MICROLAB STARlet personalizzato. Questo strumento permetterà di standardizzare e di velocizzare il processamento del singolo campione. Il pool verrà sequenziato sulla piattaforma Miseq Illumina, seguendo il protocollo già standardizzato presso l'OPBG, rispondente alla procedura ISO UNI EN ISO 9001: 2015. Analisi metagenomica shotgun. Dopo estrazione del DNA, ottimizzata secondo i protocolli dell'OPBG, basati sull'omogenizzazione del campione differenziale (PreCellys) a</p>									
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Progetto di investimento art. 1, comma 95, della legge 30 dicembre 2018, n. 145 – Ente/Rete proponente **Associazione Rete Italiana Salute dell'Età Evolutiva (Rete IDEA)** – Progetto "Il microbiota umano nella medicina dei sistemi applicata alla diagnosi e alla terapia in pediatria"

	<p>seconda del target di analisi shotgun selezionato (batterioma, micoma, viroma a DNA), saranno preparate libraries per il sequenziamento usando Illumina® DNA Prep Tagmentation kit (Illumina, California, USA) secondo le istruzioni Illumina. Il sequenziamento sarà realizzato su piattaforme NextSeq550 oppure NovaSeq 6000 garantendo almeno una profondità di sequenziamento di 7.5GB.</p>									
	<p>Attività 3</p>									
	<p>Fase post-analitica 1. I dati grezzi saranno analizzati mediante il software Quantitative Insights in Microbial Ecology (QIIME). Saranno effettuate analisi ecologiche di diversità alpha e beta, per definire le differenze nell'ecologia del microbiota in relazione allo stato</p>			<p>Valutazione dei profili metagenomici di microbiota ottenuti</p>			<p>Valutazione dei profili metagenomici di microbiota ottenuti</p>			<p>Valutazione dei profili metagenomici di microbiota ottenuti</p>

Progetto di investimento art. 1, comma 95, della legge 30 dicembre 2018, n. 145 – Ente/Rete proponente Associazione Rete Italiana Salute dell’Età Evolutiva (Rete IDEA) – Progetto “Il microbiota umano nella medicina dei sistemi applicata alla diagnosi e alla terapia in pediatria”

	<p>fisiologico e/o patologico. Inoltre, saranno applicati test statistici non parametrici di Kruskal Wallis, analisi multivariate, univariate e di correlazione tra le comunità microbiche e modelli matematici (regressione logistica lineare, linear discriminant analysis [LDA] Effect Size [LEfSe]), per definire le differenze in termini di abbondanza relativa delle specie batteriche ed identificare i possibili marcatori che caratterizzano il profilo del microbiota associato ai pazienti versus gli individui sani. L'acquisizione di una nuova piattaforma Miseq Illumina aumenterà la processività di analisi dei profili di microbiota e affiancando le preesistenti piattaforme gemelle avrà anche un ruolo di back-up di attività consentendo una processività di analisi</p>										
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Progetto di investimento art. 1, comma 95, della legge 30 dicembre 2018, n. 145 – Ente/Rete proponente **Associazione Rete Italiana Salute dell’Età Evolutiva (Rete IDEA) – Progetto “Il microbiota umano nella medicina dei sistemi applicata alla diagnosi e alla terapia in pediatria”**

	<p>continuativa. Per la parte di analisi di shotgun saranno utilizzate pipelines dedicate originali ed elaborate presso l'OPBG, in collaborazione con GenomeUp, con tre fasi principali: pre-elaborazione con rimozione delle sequenze di bassa qualità; comparazione con il genoma umano; confronto con i database di riferimento e annotazione tassonomica per i batteri, i funghi, i virus fino alla produzione di grafici krona.</p>									
									
<p>2 “obiettivo specifico Produzione di profili di microbiota biochimico-funzionali. Per ogni soggetto, in condizioni fisiologiche e/o patologiche, sarà caratterizzato il microbiota intestinale in termini di proprietà funzionali (profilo metabolomico, metaproteomico e caratterizzazione biochimico-</p>	<p>Attività 1 Fase analitica 2a. Analisi metabolomica. Per definire lo spettro funzionale del microbiota, si estrarranno i metaboliti che saranno caratterizzati mediante un'analisi “untargeted” tramite gascromatografia accoppiata a spettrometria di</p>			<p>Valutazione dei profili metabolomici di microbiota ottenuti</p>			<p>Valutazione dei profili metabolomici di microbiota ottenuti</p>			<p>Valutazione dei profili metabolomici di microbiota ottenuti</p>

Progetto di investimento art. 1, comma 95, della legge 30 dicembre 2018, n. 145 – Ente/Rete proponente Associazione Rete Italiana Salute dell’Età Evolutiva (Rete IDEA) – Progetto “Il microbiota umano nella medicina dei sistemi applicata alla diagnosi e alla terapia in pediatria”

<p>proteomico-metabolico dell'ospite).</p>	<p>massa ed abbinata a micro estrazione in fase solida (GC-MS/SPME). Da questa analisi si potrà produrre un profilo di tipo quali-quantitativo dei composti organici volatili (VOCs) (Di Cagno et al. 2011). L'acquisizione, di un GC-MS, comprensivo di autocampionatore, workstation e software, migliorerà i tempi e la processività dell'intero set dei campioni biologici selezionati. Inoltre, per la caratterizzazione biochimica-metabolica dei campioni biologici potrà essere eseguita una determinazione, di tipo "targeted", quali-quantitativa dei composti organici, degli acidi, delle ammine, degli aminoacidi, degli zuccheri, ecc., tramite spettrometria di massa accoppiata alla cromatografia liquida (LC-MS/MS). Per analizzare ulteriormente le</p>											
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Progetto di investimento art. 1, comma 95, della legge 30 dicembre 2018, n. 145 – Ente/Rete proponente **Associazione Rete Italiana Salute dell'Età Evolutiva (Rete IDEA)** – Progetto "Il microbiota umano nella medicina dei sistemi applicata alla diagnosi e alla terapia in pediatria"

	<p>classi dei composti chetonici e degli acidi organici e per caratterizzare gli aminoacidi, gli zuccheri e i composti azotati, si eseguirà l'analisi spettroscopica ¹H-NMR sui campioni fecali. Gli spettri ¹H-NMR saranno acquisiti mediante un Bruker RMN, disponibile presso il Dipartimento di Chimica dell'Università Sapienza. I dati saranno interpretati mediante Tukeys Honestly Significant difference test (Statistica 6.0, StatSoft) e Canonical discriminant analysis of Principal coordinates (CAP). Saranno eseguite analisi chemiometriche per la definizione dei modelli funzionali del microbiota da usare per la predizione di attività biochimica del microbiota (Vernocchi et al., 2020).</p>							
Attività 2				Valutazione dei profili		Valutazione dei profili		Valutazione dei profili

Progetto di investimento art. 1, comma 95, della legge 30 dicembre 2018, n. 145 – Ente/Rete proponente Associazione Rete Italiana Salute dell'Età Evolutiva (Rete IDEA) – Progetto "Il microbiota umano nella medicina dei sistemi applicata alla diagnosi e alla terapia in pediatria"

	<p>Fase analitica 2b. Analisi metaproteomica. Per la caratterizzazione biochimica-proteomica e metabolomica l'OPBG ha già in dotazione un Q-TRAP 6500 Plus, una piattaforma Orbitrap Fusion ed una piattaforma 5600 Triple TOF PLUS MS per l'analisi untargeted. Il contenuto proteico dei campioni fecali sarà preliminarmente caratterizzato con tecnologia Triple TOF PLUS MS 5600. L'identificazione delle proteine e delle OTU ad esse associate sarà determinata mediante decodifica dei profili MS/MS con un software PROTEIN PILOT in-house interfacciato con database proteici di microbiota intestinale umano (MetaHIT e "personalizzati"). Potranno essere misurate, in termini quantitativi, le proteine identificate,</p>			metaproteomici di microbiota ottenuti			metaproteomici di microbiota ottenuti			metaproteomici di microbiota ottenuti
--	--	--	--	---------------------------------------	--	--	---------------------------------------	--	--	---------------------------------------

Progetto di investimento art. 1, comma 95, della legge 30 dicembre 2018, n. 145 – Ente/Rete proponente Associazione Rete Italiana Salute dell'Età Evolutiva (Rete IDEA) – Progetto "Il microbiota umano nella medicina dei sistemi applicata alla diagnosi e alla terapia in pediatria"

	gestendone in modo altamente processivo l'elevatissimo numero di peptidi generati. La distribuzione delle frequenze delle OTU sarà processata attraverso teorie descrittive statistiche (Skewness, Kurtosis, Kolmogorov-Smirnov tests).										
3 "obiettivo specifico Attraverso l'integrazione dei dati o dei profili omici di cui all'obiettivo specifico 1 e 2, si costruiranno mappe meta-omiche stratificate per tipologia di bambino (sano/malato) e per età. Allo scopo saranno eseguite valutazioni computazionali per rispondere alla percentuale ottimale di valore nullo nelle matrici complesse di dati omici NGS e di metabolomica, valutando il decremento della varianza del sistema. Inoltre, mediante cicli iterativi saranno	Attività 1 Costruzione mappe meta-omiche stratificate per tipologia di bambino (sano/malato) e per età				Valutazione delle mappe integrate di microbiota ottenute				Valutazione delle mappe integrate di microbiota ottenute		Valutazione delle mappe integrate di microbiota ottenute
	Attività 2 Valutati degli outliers del sistema e delle variabili ottimali in grado di descrivere il sistema microbiota				Valutazione delle mappe integrate di microbiota ottenute				Valutazione delle mappe integrate di microbiota ottenute		Valutazione delle mappe integrate di microbiota ottenute
	Attività 3 Integrazione dei dati omici e produzione di modelli chemiometrici				Valutazione delle mappe integrate di microbiota ottenute				Valutazione delle mappe integrate di microbiota ottenute		Valutazione delle mappe integrate di microbiota ottenute
										

Progetto di investimento art. 1, comma 95, della legge 30 dicembre 2018, n. 145 – Ente/Rete proponente Associazione Rete Italiana Salute dell'Età Evolutiva (Rete IDEA) – Progetto "Il microbiota umano nella medicina dei sistemi applicata alla diagnosi e alla terapia in pediatria"

<p>valutati gli outliers del sistema e le variabili ottimali in grado di descrivere il microbiota. Scelto il set ottimale di low fused data a partire dai dati multidimensionali, si procederà all'integrazione dei dati omici e alla produzione di modelli chemiometrici, come precedentemente riportato per i modelli metabolici. In questo caso, il modello integrato sarà utilizzato come modello predittivo diagnostico e prognostico di malattia (Del Chierico et al., 2017). Le mappe meta-omiche consentiranno di evidenziare il fenotipo-malattia significativamente associato con le alterazioni del microbiota intestinale. Le caratteristiche differenziali del contenuto microbico e/o della funzionalità del microbioma intestinale, saranno selezionate come indici di perturbazione/malattia.</p>											
---	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Progetto di investimento art. 1, comma 95, della legge 30 dicembre 2018, n. 145 – Ente/Rete proponente **Associazione Rete Italiana Salute dell’Età Evolutiva (Rete IDEA)** – Progetto “**Il microbiota umano nella medicina dei sistemi applicata alla diagnosi e alla terapia in pediatria**”

4 “obiettivo specifico Creazione di un database nazionale pediatrico di profili microbiologici e metabolomici di microbiota. I profili ottenuti (obiettivo specifico 1, 2 e 3) saranno organizzati in un database nazionale con accesso alla comunità clinica e scientifica pediatrica, per rendere fruibili le informazioni sui profili del microbiota alla comunità scientifica e clinica pediatrica. Le apparecchiature e i metodi indicati negli obiettivi 1-3 produrranno una grande quantità di dati che dovranno essere efficacemente “tradotti” per fornire un’interpretazione integrata dei profili del microbiota. L’opera di traduzione è normalmente affidata a database pubblici presenti nel web (NCBI, SWISSPROT, NIST), di enormi dimensioni, che forniscono dati ridondanti. L’obiettivo 4 si propone di costruire dei database	Attività 1 Organizzazione del database nazionale dei profili di microbiota pediatrico				Valutazione della gestione e dell’andamento del database nazionale				Valutazione della gestione e dell’andamento del database nazionale
	Attività 2 Traduzione dei dati omici in dati integrati di profili di microbiota				Valutazione dei profili integrati				Valutazione dei profili integrati
								

Progetto di investimento art. 1, comma 95, della legge 30 dicembre 2018, n. 145 – Ente/Rete proponente Associazione Rete Italiana Salute dell’Età Evolutiva (Rete IDEA) – Progetto “Il microbiota umano nella medicina dei sistemi applicata alla diagnosi e alla terapia in pediatria”

<p>personalizzati di metagenomica, metaproteomica e metabolomica. L'interfacciamento tra la strumentazione e il suo specifico database permetterà di eseguire, con modalità processiva (flusso generazione dati e interpretazione profili), la completa caratterizzazione strutturale e/o funzionale del microbiota intestinale, per produrre banche dati personalizzate per il paziente pediatrico. Per questo, nella gestione tecnologica è prevista la presenza di un server per la conservazione e la gestione dei dati. Sarà formalizzata una collaborazione con il sistema centrale CINECA o altro Ente erogatore si spazio server per l'archiviazione dati.</p>							
<p>5 "obiettivo specifico Scale-up di analisi diagnostiche del microbiota. L'Unità di Microbioma Umano dell'OPBG attualmente processa circa 2000</p>	<p>Attività 1 Aumento disseminazione per aumentare il numero di richieste di microbiota da sostenere in OPBG</p>		<p>Verifica andamento analisi diagnostiche</p>		<p>Verifica andamento analisi diagnostiche</p>		<p>Verifica andamento analisi diagnostiche</p>

Progetto di investimento art. 1, comma 95, della legge 30 dicembre 2018, n. 145 – Ente/Rete proponente **Associazione Rete Italiana Salute dell'Età Evolutiva (Rete IDEA)** – Progetto "Il microbiota umano nella medicina dei sistemi applicata alla diagnosi e alla terapia in pediatria"

campioni/anno per l'analisi NGS del microbiota a scopo diagnostico. Nel triennio 2022-2024 si prevede un aumento delle analisi fino a 3000 campioni/anno all'interno della Rete Pediatrica creata dal progetto.	Attività 2 Automatizzazione processi estrattivi e potenziamento dei processi di sequenziamento				Verifica scale-up analisi dei profili di microbiota dal punto di vista analitico				Verifica scale-up analisi dei profili di microbiota dal punto di vista analitico
								
6 “obiettivo specifico” Produzione di profili diagnostici del microbiota per lo screenig donatore/ricevente di trapianto di microbiota intestinale (FMT). Attualmente L'Unità di Microbioma Umano dell'OPBG fornisce profili di screenig per FMT in ambito pediatrico. Nel triennio 2022-2024 si prevede di eseguire uno scale-up dello screening diagnostico per FMT e di costituire una Biobanca FMT condivisa con gli IRCCS della Rete Pediatrica aderenti al progetto.	Attività 1 Aumento disseminazione per aumentare il numero di richieste di microbiota da sostenere in OPBG				Valutazione dei profili di microbiota intestinale per lo screening dei donatori/riceventi l'FMT				Valutazione dei profili di microbiota intestinale per lo screening dei donatori/riceventi l'FMT
7 “obiettivo specifico” Trasferimento del sistema DSS generato agli interventi clinici	Attività 1 Utilizzo del DSS in microbiomica a concreti casi clinici				Valutazione di efficacia di DSS				Valutazione di efficacia di DSS

Progetto di investimento art. 1, comma 95, della legge 30 dicembre 2018, n. 145 – Ente/Rete proponente Associazione Rete Italiana Salute dell'Età Evolutiva (Rete IDEA) – Progetto “Il microbiota umano nella medicina dei sistemi applicata alla diagnosi e alla terapia in pediatria”

mirati al paziente pediatrico con patologie microbiota- correlate nell'ambito della consensus clinica condivisa dalla Rete													

Progetto di investimento art. 1, comma 95, della legge 30 dicembre 2018, n. 145 – Ente/Rete proponente Associazione Rete Italiana Salute dell’Età Evolutiva (Rete IDEA) – Progetto “Il microbiota umano nella medicina dei sistemi applicata alla diagnosi e alla terapia in pediatria”

DATI ECONOMICI E FINANZIARI					
<i>importi in euro</i>					
Costo complessivo:	1.712.600	Durata prevista (anni)	3		
Finanziamento Ministero della salute	1.560.000	% Finanziamento ministeriale	91%		
Eventuali altre fonti di finanziamento	152.600	% Altre fonti di finanziamento	9%		
Finanziamento complessivo	1.712.600	% Finanziamento complessivo	100 %		
Piano economico complessivo					
<i>importi in euro</i>					
Voci economiche	Quantità	Unità di misura (UM) ⁽¹⁾	Costo previsionale	% su Totale costo previsionale	
1.a Spese di Coordinamento ^{(1) (3)}	ND	ND	€ 15.600,00	1%	
1.b Personale di ricerca ⁽³⁾	4.290	GG	€ 452.400,00	29 %	
2. Attrezzature (Acquisto, Leasing, Noleggio) ⁽⁴⁾	12	PZ	€ 898.000,00	57,56 %	
3. Materiali di consumo connessi allo svolgimento della ricerca (supplies) ⁽⁴⁾					
4. Elaborazione Dati (IT Services and Data Base) ⁽⁴⁾			€ 124.600,00	7,99%	
5. Spese generali (overheads) ⁽⁵⁾			€ 69.400,00	4,45 %	
Totale UM GG	4290				
Totale UM CP ⁽²⁾	3				
Totale UM PZ ⁽²⁾	12				
Totale UM ND ⁽²⁾	2				
Totale			€ 1.560.000,00	100,00%	
⁽¹⁾ Spese di Coordinamento riferite allo svolgimento procedure di evidenza pubblica ⁽²⁾ Unità di misura: GG= giornate; CP: a corpo; PZ: pezzi unità definite; ND=non definita ⁽³⁾ % non superiore al 30% ⁽⁴⁾ % non superiore al 70% ⁽⁵⁾ % non superiore al 5%					
Piano finanziario complessivo per annualità					
<i>importi in euro</i>					
Annualità	Finanziamento Ministero della salute	%	Altre fonti di finanziamento ⁽¹⁾	%	Finanziamento totale
1	852.720,00		122.600,00		975.320,00
2	489.280,00		30.000,00		519.280,00
3	218.000,00		0,00		218.00,00
Totale	1.560.000,00	91%	152.600,00	9%	1.712.600,00
Totale %		91%		9%	100,00
⁽¹⁾ Specificare in un prospetto allegato eventuale/i Ente/i cofinanziatore/i del progetto con l'indicazione delle relative quote di finanziamento					

Progetto di investimento art. 1, comma 95, della legge 30 dicembre 2018, n. 145 – Ente/Rete proponente **Associazione Rete Italiana Salute dell'Età Evolutiva (Rete IDEA)** – Progetto "Il microbiota umano nella medicina dei sistemi applicata alla diagnosi e alla terapia in pediatria"

Piano economico complessivo: descrizione utilizzo delle risorse per Ente/RETE/IRCCS

							<i>Importi in euro</i>
Ente/Rete/IRCCS	1a (Mesi/persona expertise) (*)	1b (Mesi/persona expertise) (*)	2 (*)	3 (*)	4 (*)	5 (*)	Totale importo in euro
Associazione Rete Italiana Salute dell'Età Evolutiva (RETE IDEA)	15.600,00		898.000,00			42.000,00	955.600,00
Ospedale Pediatrico Bambino Gesù		79.170,00			124.600,00	27.400,00	231.170,00
Istituto Giannina Gaslini		41.470,00					41.470,00
IRCCS Stella Maris		41.470,00					41.470,00
IRCCS Eugenio Meda		41.470,00					41.470,00
IRCCS Oasi Maria SS.		41.470,00					41.470,00
Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta		41.470,00					41.470,00
Ospedale Infantile Burlo Garofolo		41.470,00					41.470,00
Fondazione Agostino Gemelli IRCCS		41.470,00					41.470,00
IRCCS Ospedale San Raffaele		41.470,00					41.470,00
IRCCS Fondazione Mondino - Istituto Neurologico Nazionale		41.470,00					41.470,00
Totale importo in euro	15.600,00	452.400,00	898.000,00		124.600,00	69.400,00	1.560.000,00

(*) 1.a = Spese di Coordinamento; 1.b = Personale di ricerca ; 2=Attrezzature (Acquisto, Leasing, Noleggio); 3=Materiali di consumo connessi allo svolgimento della ricerca (supplies); 4=Elaborazione Dati (IT Services and Data Base); 5=Spese generali (Overheads)

Progetto di investimento art. 1, comma 95, della legge 30 dicembre 2018, n. 145 – Ente/Rete proponente Associazione Rete Italiana Salute dell'Età Evolutiva (Rete IDEA) – Progetto "Il microbiota umano nella medicina dei sistemi applicata alla diagnosi e alla terapia in pediatria"

ELENCO ALLEGATI

N.	Descrizione	SI/NO
1	IRCCS/Enti aderenti al progetto con l'indicazione della quota di finanziamento (ministeriale e Istituto/Terzi)	SI
2	Parere Comitato etico	NO*
3	Decreto autorizzazione sperimentazione animale	NON RICHIESTO
4	Autodichiarazione legale del responsabile del benessere animale sulla sperimentazione	NON RICHIESTO

*DA PRODURRE

data sottoscrizione corrispondente al momento di apposizione della firma digitale

Direttore Scientifico	Ente/Rete/IRCCS proponente
Bruno Dallapiccola ¹ Angelo Ravelli ¹ Paolo Gasparini ¹ Giovanni Cioni ¹ Raffaele Ferri ¹ Maria Teresa Bassi ¹ Giuseppe Lauria Pinter ¹ Giovanni Scambia ¹ Martino Gianvito ¹ Fabio Blandini ¹	Ospedale Pediatrico Bambino Gesù Istituto Giannina Gaslini IRCCS Burlo Garofolo RCCS Stella Maris IRCCS Oasi Maria Santissima IRCCS Eugenio Medea Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta Fondazione Agostino Gemelli IRCCS IRCCS Ospedale San Raffaele IRCCS Fondazione Mondino - Istituto Neurologico Nazionale
Coordinatore scientifico del progetto (C.S.P.)	Associazione Rete Italiana Salute dell'Età Evolutiva (RETE IDEA)
Lorenza Putignani ¹ (IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù)	Rappresentante legale Bruno Dallapiccola ¹

¹ Documento sottoscritto con firma digitale ai sensi dell'art. 21 del d.lgs. n. 82 del 7 marzo 2005.

Progetto di investimento art. 1, comma 95, della legge 30 dicembre 2018, n. 145 – Ente/Rete proponente **Associazione Rete Italiana Salute dell'Età Evolutiva (Rete IDEA)** – Progetto **“Il microbiota umano nella medicina dei sistemi applicata alla diagnosi e alla terapia in pediatria”**

Elenco IRCCS/Enti aderenti al progetto con l'indicazione della quota di finanziamento (ministeriale e Istituto/Terzi)

N.	IRCCS/Ente denominazione	Tipo soggetto o Pub/Pr	Codice fiscale	Rappresentante legale	Codice fiscale rappresentante legale	Finanziamento Ministero quota	Finanziamento Ente/Terzi quota
1	Associazione Rete Italiana Salute dell'Età Evolutiva (Rete IDEA)	Pr	97942850583	Bruno Dallapiccola	DLLBRN41E07B171K	955.600,00	
2	Ospedale Pediatrico Bambino Gesù	Pr	80403930581	Mariella Enoc	NCEMLL44A67F952B	231.170,00	152.600,00
3	Istituto Giannina Gaslini	Pub	00577500101	Renato Botti	BTRRNT57T30Z614V	41.470,00	
4	Stella Maris	Pr	00126240506	Giuliano Maffei	MFFGLN58L20G843T	41.470,00	
5	Eugenio Medea	Pr	00307430132	Luisa Minoli	MNLLSU68A54B300V	41.470,00	
6	Oasi Maria S.S.	Pr	00102160868	Claudio Volante	VLNCLD66P07G273M	41.470,00	
7	Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta	Pub	01668320151	Giuseppe Lauria Pinter	LRPGPP65C25A757X	41.470,00	
8	Ospedale Infantile Burlo Garofolo	Pub	00124430323	Stefano Dorbolò	DRBSFN64E08L483U	41.470,00	
9	Fondazione Agostino Gemelli	Pr	13109681000	Marco Elefanti	LFNMRC62R07G535Y	41.470,00	
10	Ospedale San Raffaele	Pr	07636600962	Marco Centenari	CNTMRC68R29C153S	41.470,00	
11	Fondazione Mondino – Istituto Neurologico Nazionale	Pr	00396070187	Livio Pietro Tronconi	TRNLPT65H20G388I	41.470,00	
Totale complessivo						1.560.000,00	152.600,00

Progetto di investimento art. 1, comma 95, della legge 30 dicembre 2018, n. 145 – Ente/Rete proponente **Associazione Rete Italiana Salute dell'Età Evolutiva (Rete IDEA) – Progetto "Il microbiota umano nella medicina dei sistemi applicata alla diagnosi e alla terapia in pediatria"**

Progetto di Rete per il Fondo finanziamento degli investimenti e lo sviluppo infrastrutturale del Paese – Ministero della Salute

ENTE PROPONENTE: OSPEDALE PEDIATRICO BAMBINO GESU'

TITOLO DEL PROGETTO

Il microbiota umano nella medicina dei sistemi applicata alla diagnosi e alla terapia in pediatria

Parole chiave: (1) Analisi -omiche del microbiota intestinale e di altri distretti; (2) profili associati al programming fisiologico del microbiota neonatale e perinatale; (3) profili associati alla disbiosi intestinale; (4) banking dei campioni di microbiota e database dei profili di microbiota; (5) analisi diagnostica del microbiota; (6) trapianto del microbiota fecale e banking dei campioni

ABSTRACT DEL PROGETTO

Molte patologie pediatriche si associano a modificazioni dell'assetto funzionale dell' "organo" microbiota intestinale. Il suo genoma o microbioma si associa all'ecologia complessa di 10^{14} batteri, un volume 100 volte più grande rispetto al genoma umano. I commensali di questo ecosistema svolgono un ruolo omeostatico, agendo come barriera dinamica contro la traslocazione dei patogeni, esercitano funzioni metaboliche fondamentali e promuovono lo sviluppo del sistema immunitario (SI) in età infantile ed hanno un'azione modulante sul genoma.

Quando l'omeostasi viene perturbata, si innesca uno stato disbiotico, associato ad un quadro eterogeneo di patologie pediatriche, come le malattie e le sindromi infiammatorie dell'intestino (ad es. IBD, IBS), le malattie metaboliche, l'obesità, la steatosi e la fibrosi epatica, relativamente all'asse cosiddetto intestino-fegato, ma anche patologie sistemiche come la fibrosi cistica (FC), le malattie autoinfiammatorie/autoimmunitarie (ad es. artrite idiopatica giovanile), le sindromi genetiche come la sindrome di Williams e la sindrome di Down, le allergie (ad es. dermatiti atopiche), i disturbi dell'asse cervello-intestino, come l'autismo o particolari disturbi del comportamento (Pediatric Acute Neuropsychiatric Disorders, PANS), compresi quelli a presunta eziologia infettiva (Pediatric Acute Neuropsychiatric Disorders Associated with A streptococci PANDA), le patologie neoplastiche ed i quadri infettivi sistemici o distretto-specifici, come nel caso della patologia COVID-19. Del tutto attuale, inoltre, è il controllo delle infezioni da germi multi-drug-resistant (MDR), attraverso la valutazione della loro colonizzazione del microbiota intestinale ed il controllo/prevenzione delle traslocazioni microbiche, pre-settiche, una nuova strategia nella gestione antimicrobica dei pazienti immunodepressi. Nel caso della malattia acuta da rigetto (Graft Versus Host Disease, GVHD), che spesso complica il trapianto di cellule staminali emopoietiche allogeniche, la biodiversità del microbiota intestinale può dare luogo a forme meno severe e, in questo caso, è fondamentale il suo monitoraggio pre- e post-trapianto.

La comprensione del profilo del microbiota intestinale "sano" nelle prime fasi di vita, dalla nascita all'intera infanzia, riveste un ruolo cruciale nella gestione delle malattie pediatriche associate al microbiota, ma anche nella prevenzione delle malattie croniche che si svilupperanno nel corso della vita, e risponde alla richiesta di definire l'eubiosi intestinale, attraverso la creazione di modelli di base, indispensabili per valutare gli eventi disbiotici.

Essenziale, in questo contesto, appare anche la comprensione dell'interazione pre/perinatale mamma-bambino sulle caratteristiche del microbiota alla nascita, quale fattore "condizionante" la salute/malattia e lo sviluppo fisico-cognitivo del bambino. L'IRCCS Burlo Garofolo è attualmente impegnato nello studio degli effetti del dismicrobismo e dello stato infiammatorio correlato dell'ecosistema vaginale, nell'infertilità, nella suscettibilità alle infezioni e nello sviluppo dell'asse intestino-cognitivo in epoca neonatale

Lo sviluppo di tecnologie “meta-omiche” (metagenomica, metabolomica, proteomica e metaproteomica), di algoritmi analitici e di processi correlati (data management system e decision support system) per il mappaggio del microbiota presso l’Ospedale Pediatrico Bambino Gesù (OPBG), basati su complesse piattaforme tecnologiche e avanzate procedure analitiche e computazionali, si sono rivelati idonei a fornire risultati traslazionali originali nella caratterizzazione del microbiota pediatrico, consentendo di chiarire alcuni aspetti originali della sua modulazione e interazione con gli stimoli esterni (ad es. agenti patogeni, infettoma) e con la dieta (ad es. profili nutrizionali, “foodoma”), nel contesto della variabilità genetica dell’ospite. Queste tecnologie assistono un team multidisciplinare clinico-laboratoristico nella generazione di profili individualizzati del microbiota, fornendo carte “omiche” genomiche e biochimiche “integrate”, basate su metatassonomia, attività metaboliche e reservoir proteico del microbiota analizzato. Tali mappe integrate sono a disposizione dei team clinici, per comprendere le alterazioni funzionali del microbiota, correlarle ai parametri anamnestico-clinici del paziente (metadati) e per valutare strategie correttive o di clearance, mediante interventi nutrizionali, di somministrazione di probiotici, prebiotici personalizzati fino al trapianto di microbiota fecale (Fecal Microbiota Transplantation, FMT), già disponibile nell’OPBG come Protocollo Ospedaliero dal 2017.

Questo progetto propone la circolazione e l’implementazione delle esperienze della Rete nell’ambito della caratterizzazione metaomica del microbiota mediante il coordinamento del Progetto da parte dell’OPBG, Centro pionieristico in queste attività, al fine di ottenere una immediata ricaduta traslazionale e diagnostico-clinica su scala nazionale. L’esperienza sarà estesa all’interno della rete pediatrica, utilizzando competenze condivise, tecnologie e dataset di dati pre-esistenti, la disponibilità di pazienti pediatrici che possono fornire un reservoir continuo di tratti clinici per le principali patologie correlate al microbiota, nell’ambito dei quadri funzionali fegato-intestino, cervello-intestino e sistemico.

Sono previste le seguenti attività: i) estensione della Banca di riferimento del microbiota pediatrico per la generazione di profili malattia (la Banca OPBG al momento dispone di circa 10,000 campioni di microbiota pediatrico); ii) fornire un sistema Open or Limited Access Source di profili di microbiota per la comunità clinica; iii) fornire profili diagnostici di microbiota associati a stati fisiologici e patologici (definizione di enterotipi o “enterogradienti” intestinali); iv) definire gli aspetti relativi alla diagnosi e alla prognosi delle disbiosi intestinali, relative ad alcune importanti patologie pediatriche; v) sviluppare terapie alternative o supplementari, basate sull’uso personalizzato di probiotici e prebiotici, in grado di indurre modificazioni paziente-specifiche del microbiota; vi) migliorare la gestione clinica del paziente, con particolare riguardo alle esigenze nutrizionali, e, di conseguenza, alla qualità di vita; viii) disegnare, sulla base dei profili “misurati” di disbiosi intestinale, modulazioni interventiste del microbiota basate su FMT; vii) costituzione di una Banca per l’FMT pediatrico.

BACKGROUND SCIENTIFICO DEL PROGETTO

Il microbiota intestinale umano è un complesso ecosistema costituito da 10^{14} batteri. Il suo genoma, che ha dimensioni circa 100 volte superiori a quelle del genoma umano, può essere definito nel suo insieme microbioma. I commensali del microbiota svolgono un ruolo fondamentale nella salute, particolarmente nell’età pediatrica, agendo come barriera contro i patogeni e contro la loro invasione, con modalità dinamica, espletata da funzioni metaboliche e da stimoli sullo sviluppo del sistema immunitario (SI) (Stanghellini et al. 2010; Cammarota et al., 2019). Nei neonati, l’alterazione dei taxa enterici indigeni del microbiota può avere un impatto negativo sulle esigenze metaboliche dell’ospite, così come sullo sviluppo del SI associato all’intestino e sull’insorgenza di fenomeni infiammatori (Romani et al., 2020). Infatti, le capacità del SI di co-evolvere con il microbiota, a partire dall’epoca perinatale, permettono all’ospite e al microbiota di coesistere in una relazione di mutuo beneficio, che consiste nel dispensare in modo coordinato le risposte immunitarie specifiche verso la biomassa degli antigeni esterni, e nel discriminare i falsi allarmi innescati dagli antigeni benigni. Inoltre, gli oligosaccaridi e i glicconiugati, componenti naturali del latte materno, possono prevenire la fissazione intestinale degli enteropatogeni e stimolare la crescita dei Bifidobatteri, chiarendo anche aspetti fisiologico-funzionali del programming del microbiota, con importanti ricadute in neonatologia e in pediatria (Del Chierico et al. 2015; Conta et al. 2021; Levi Mortera et al, 2019). Come noto, specifici determinanti della variabilità, correlati all’ospite e all’ambiente, agiscono direttamente sulla composizione e sulla densità del

microbiota intestinale subito dopo la nascita, contribuendo all'efficienza funzionale dell'intestino del neonato e alle sue esigenze metaboliche (Putignani et al. 2010). La prima acquisizione microbica sembra governata da una trasmissione verticale, dalla madre al figlio e, solo successivamente, si sviluppano ecosistemi microbici differenti nei vari siti anatomici (Domínguez-Bello et al. 2010; DiGiulio et al. 2015). In questo modo, gli ecosistemi microbici dell'ospite selezionano un gruppo di comunità ben adattate, che originano dalla comunità "inoculo" colonizzante, mentre le caratteristiche genetiche dell'ospite ne influenzano la composizione, modulando le caratteristiche ambientali della nicchia ecologica (Del Chierico et al. 2015). Inoltre, è noto che alcune patologie espresse a livello extra-intestinale, come l'obesità e le atopie, si associano a "perturbazioni" dell'ecosistema microbico gastrointestinale (Russell & Finlay, 2012). Anche per la fibrosi cistica (FC), le infezioni e le malattie respiratorie ricorrenti e lo stato di infiammazione cronico, sembrano avere correlazioni dinamiche con il microbiota intestinale, compresa l'associazione con la sua disbiosi (Rogers et al., 2010; Marazzato et al. 2020). L'elevata espressione del gene regolatore della conduttanza transmembrana della fibrosi cistica (CFTR) a livello intestinale (Strong et al. 1994) favorisce, infatti, l'anomala produzione mucoide, con conseguente malassorbimento e ostruzione dell'intestino. Di conseguenza, i pazienti affetti da FC non trattati presentano un deficit nutrizionale e hanno una prognosi sfavorevole. In condizioni fisiologiche, il microbiota partecipa alla digestione delle sostanze nutritive, aumenta l'immunità dell'ospite e aiuta a controllare la crescita degli organismi potenzialmente patogeni. Nei pazienti con FC resta controversa la prevalenza e il ruolo della proliferazione batterica intestinale e le implicazioni del difetto genico nell'infiammazione endogena e nell'alterazione dell'omeostasi del SI, con particolare riferimento alla "overgrowth" del *Clostridium difficile*. Sta emergendo l'idea che l'aumento dell'infiammazione intestinale nella FC, inneschi la proliferazione batterica intestinale, favorita dal materiale vischioso che ostacola il trasporto degli antimicrobici, con un effetto diretto della malattia sulla composizione del microbiota, piuttosto che sull'aumento dell'infiammazione a carico delle popolazioni batteriche immunogeniche (Vernocchi et al., 2018). Tuttavia, la composizione e la funzione del microbiota delle vie respiratorie, da studiare mediante la caratterizzazione fine del batterioma e del viroma del distretto aereo e della loro relazione con il microbiota intestinale possono chiarire come le comunità microbiche facilitino o ostacolino l'insediamento del patogeno e la sua propagazione nei distretti respiratori e come le comunità viroma-batterioma possano reagire alle malattie respiratorie (Iorio et al., 2021). Relativamente all'obesità, la sua insorgenza si è drammaticamente spostata nei primi anni di vita e la sua prevalenza nell'età pediatrica è fortemente aumentata su scala mondiale (Han et al. 2010). A differenza dell'obesità epidemica, che è principalmente attribuibile allo stile di vita occidentale e, in particolare, all'eccessivo consumo di carboidrati e di grassi e alla riduzione dell'attività fisica, quella infantile è stata, in parte, correlata alle pregresse esposizioni del feto a condizioni sfavorevoli (ad es. segnali ormonali e nutrizionali), in grado di esercitare un profondo impatto sul successivo sviluppo, sulla struttura e sulla funzione dell'organismo (Manco et al. 2010). Questo fenomeno, che coinvolge l'epoca perinatale e postnatale, è noto come "programmazione della malattia durante la fase di sviluppo" (Hochberg et al. 2010; Del Chierico et al., 2015). L'obesità e le patologie metaboliche associate all'obesità, come la sindrome metabolica e il diabete tipo 2, sono state collegate alle caratteristiche funzionali e strutturali del microbiota intestinale (Manco, 2012; Del Chierico et al., 2021). Sulla base di questi studi sembra plausibile che la capacità del microbiota intestinale di regolare la risposta infiammatoria sia critica nei complessi meccanismi correlati all'obesità e alla sindrome metabolica, e persino al rischio di sviluppare alcune malattie dell'adulto, come quelle cardiovascolari, in rapporto all'aumento del peso, all'accumulo di grassi, al mantenimento di uno stato infiammatorio (Manco et al. 2010). Per questo motivo, i marcatori dell'obesità in età pediatrica rappresentano un potenziale strumento predittivo e preventivo dell'obesità nell'adulto e possono aiutare nella gestione del paziente cronico durante il passaggio dall'età pediatrica all'età adulta (Del Chierico et al., 2018). Indubbiamente, un sano microbiota intestinale contribuisce al mantenimento della salute umana garantendo funzioni metaboliche. Dato che i pazienti affetti dagli errori congeniti del metabolismo sono in regimi alimentari costituiti da diete speciali, rappresentano un buon modello per valutare come specifici *dietary patterns*, in termini di composizione di macronutrienti e della loro qualità, correlino con uno specifico profilo di microbiota associato a definiti fenotipi clinici (Montanari et al., 2021; Reddel et al., 2019).

Tuttavia, un buon modello rimane la malattia infiammatoria intestinale, su cui ancora tanto deve essere studiato in termini di microbiota "signature" in età pediatrica (Putignani et al., 2016; Putignani et al., 2021) per comprendere la malattia nell'adulto (Palombo et al., 2021; Altomare et al., 2021; Baldelli et al., 2021; Lo Presti et al., 2019; Altomare et al., 2019). Importanti sono anche le evidenze sulle patologie autoimmunitarie, compresa l'artrite idiopatica giovanile (JIA). In uno studio coordinato da OPBG, nell'ambito del Progetto

Europeo MD-PAEDIGREE, in collaborazione con l'Ospedale Gaslini di Genova e con la University Medical Center Utrecht Wilhelmina Children's hospital, Utrecht, The Netherlands, sono stati analizzati 99 pazienti naïve italiani ed olandesi (Baseline), 44 pazienti con malattia inattiva (Inactive Disease, ID), 25 pazienti con attività persistente (Persistent Activity, PA), e 107 soggetti sani stratificati per età e localizzazione geografica (controlli). Il marcatore della disbiosi correlato alla malattia è stato identificato in tutti i suoi stadi, in modo indipendente dall'origine geografica dei pazienti. Tuttavia, le differenze nel microbiota intestinale nelle popolazioni italiana e olandese hanno evidenziato il microbiota come tratto/caratteristica (enterofenotipo) di popolazione, con una ridotta ricchezza ecologica rispetto ai controlli o ai soggetti sani. I marcatori microbici, identificati mediante algoritmi di calcolo multivariato (ad es. random forest) hanno indicato nelle operational taxonomic units (OTUs) *Erysipelotrichaceae*, *Faecalibacterium prausnitzii* and *Allobaculum*, marcatori microbici differenziali nei gruppi di pazienti analizzati (van Dijkhuizen et al., 2018). L'integrazione tra i dati metagenomici e le analisi fecali dei metaboliti volatili e non volatili, mediante piattaforme tecnologiche GC/MS and NMR sta evidenziando un metaboloma stabile e specifico per la JIA. I dati derivati, definiti low-fused data, ottenuti dopo cicli iterativi di riduzione e integrazione dei dati omici metagenomici e metabolomici e multidimensionali, hanno permesso una corretta classificazione della malattia, rispetto ai sani, nell'82% dei casi, indipendentemente dalla fase PA, e, comparabile, per gli stati di JIA baseline e ID, con un altissimo valore predittivo della malattia (indicatore diagnostico e non prognostico). I profili integrati hanno evidenziato, nel loro insieme, l'indipendenza dalla attività della malattia, dall'infiammazione (indici JADAS71), dalla terapia (methotrexate) (Vernocchi et al., 2020). Recentemente, il concetto di *low-grade inflammation*, sindrome metabolica, *impairment cognitivo cancer* (Scheithauer et al., 2020; Oriá et al., 2016; Tilg et al., 2020) è vivamente dibattuto e ricopre un ruolo fondamentale nella ricerca dei biomarcatori microbici di profilo del microbiota associabili alla disbiosi (Lo Presti et al., 2019; Lopetuso et al., 2020; Ponziani et al., 2019).

La rivoluzione del microbiota (Lynch e O Pedersen, 2016), particolarmente, in ambito pediatrico è entrata nella clinica della disbiosi di un esteso di patologie (Henao-Mejia et al., 2012; Lebba et al., 2011; Compare et al., 2012; Del Chierico et al., 2017; Weiss et al. 2004; Hosseini et al. 2011), fino a quelle associate alle anomalie del comportamento (Gareau et al. 2012; Ristori et al., 2019 e 2020; Quagliariello et al., 2018). Alcuni studi epidemiologici hanno suggerito associazioni tra patologie neurologiche dello sviluppo, come l'autismo, la schizofrenia, l'ansia, e le infezioni microbiche nel periodo perinatale (Finegold et al., 2010). Ragguardevoli sono gli studi sull'allergia pediatrica, già affrontati dal nostro gruppo (Mennini et al., 2021; Reddel et al., 2019) e che saranno implementati attraverso questo Progetto di Rete.

Su questa base, l'ulteriore progettazione di biomarker discovery correlata alla disbiosi del microbiota per specifiche patologie può avere una ricaduta diagnostica immediata, applicando tecnologie metaproteomiche avanzate come la spettrometria di massa Triple-TOF, la tecnologia SWATH (Sequential Windows Acquisition of all Theoretical Precursors), con la quale la velocità e le modalità di processazione degli analiti dalle feci o dal sangue possono produrre profili qualitativi e quantitativi delle proteine/metaboliti differenzialmente espressi, in grado di fornire un grande serbatoio di informazioni per ogni paziente (Di Girolamo et al., 2012). È stato dimostrato che le analisi metaboliche 1H-NMR e GC-MS degli estratti fecali possono fornire importanti chiarimenti sulle differenze metaboliche interspecie dei componenti del microbiota (Saric et al., 2008; Miccheli et al., 2015), producendo informazioni diagnostiche per le principali patologie intestinali (Martin et al., 2010). I progressi delle tecnologie 1H-NMR, GC-MS, MRM, SWATH in LC-MS/MS permettono di monitorare i cambiamenti nei metaboliti, intesi come concentrazione e proprietà chimiche. I profili metabolici ottenibili mediante analisi multivariate offrono un nuovo approccio per esaminare la cooperazione metabolica ospite-microbiota rispetto al fenotipo, alla patologia e alla dieta (Nicholson et al., 2005; Del Chierico et al., 2014; Putignani e Dallapiccola 2016; Vernocchi et al., 2020).

In particolare, l'analisi combinata del metaboloma in diversi liquidi biologici, compresi le feci, il plasma e le urine offre una strategia idonea ad accertare i collegamenti tra la bioconversione degli ingredienti dei cibi non-digeribili, la loro bio-disponibilità e il loro effetto sul metabolismo dell'ospite, anche in relazione alla patologia in atto (Young e Wallace, 2009). In generale, quindi, le relazioni mutualistiche nel microbiota intestinale influenzano la "salute" metabolica, ne regolano l'equilibrio energetico, il metabolismo degli xenobionti, la resistenza alla colonizzazione dei patogeni, la maturazione del SI nel bambino, la sua salute nutrizionale e l'insorgenza di importanti patologie. La crescente disponibilità di approcci di biologia dei sistemi nello studio del microbiota intestinale, così come quelli sviluppati in house nell'OPBG, può fornire strumenti di analisi genomica e funzionale (metabolomica e metaproteomica) del microbiota nelle malattie

pediatriche, rendendo disponibili attività di medicina dei sistemi, come le correlazioni tra i profili del microbiota e i fenotipi delle malattie. Le indagini di biologia dei sistemi effettuate presso l'OPBG, sulla diversità e stabilità del microbiota intestinale e polmonare dei pazienti pediatrici saranno valutate nella predizione dell'esito clinico, nella capacità di migliorare le condizioni nutrizionali e la qualità della vita, nello sviluppo di terapie alternative o supplementari, basate sull'uso mirato di probiotici e prebiotici, con ricadute immediate sul trattamento quotidiano del paziente, sull'utilizzo del FMT come trattamento clinico. Molto lavoro è stato fatto in questa direzione, in collaborazione diretta con la Scuola pionieristica (CEMAD, Policlinico Gemelli) del trapianto fecale del Prof Gasbarrini (Cammarota et al., 2019; Keller et al., 2021; Merli et al., 2020; Quagliariello et al., 2020; Gargiullo et al., 2019.; Nobili et al., 2019). Basandosi su questo grande lavoro pregresso, l'OPBG ha redatto il primo Protocollo Ospedaliero Italiano per l'FMT pediatrico nel 2017; il passo successivo nell'ambito di questo Progetto di Rete sarà il coordinamento tra gli Ospedali Pediatrici per formulare, di concerto con il Centro Nazionale Trapianti (CNT), un nuovo Protocollo utilizzabile sul territorio nazionale per i casi compassionevoli, gli studi pilota, ma anche per i protocolli clinici, laddove opportuno.

La rete dei ricercatori e dei clinici dell'OPBG, collegati con le altre strutture accademiche e gli IRCCS potrà gradualmente inserire applicazioni meta-omiche dei processi diagnostico-analitici del microbiota nelle attività della Rete IDEA, con conseguente presa in carico clinica dei pazienti con profili disbiotici più importanti del microbiota.

In particolare, il modello del microbiota potrà anche essere applicato allo studio di popolazioni speciali omogenee, quali i pazienti con disturbi del neurosviluppo (disabilità intellettiva, disturbo dello spettro autistico) o epilessia. Ciò con il contributo dell'IRCCS "Associazione Oasi Maria SS" di Troina (EN), afferente alla Rete IDEA, che focalizza specificamente una parte della sua attività di ricerca sullo studio di biomarker dei disturbi del neurosviluppo e con il contributo degli altri IRCCS della Rete che si occupano più specificatamente dei disturbi del neurosviluppo. Con un'attività interdisciplinare e con un lavoro all'interfaccia tra la ricerca e la clinica, i microbiologi e gli specialisti in discipline "omiche" contribuiranno alla descrizione su larga scala di "enterotipi" pediatrici, delineando il ruolo del microbiota intestinale in stati fisiologici e patologici dell'età evolutiva (Putignani, 2014). L'utilizzo di algoritmi computazionali di *machine learning* permetterà di elaborare modelli microbiota-malattia sempre più avanzati e, quindi, di predirne di nuovi (Putignani et al., 2019). Grazie a questo approccio, codificato a livello nazionale, sarà possibile istituire la prima Biobanca di campioni di Microbiota Pediatrico e la prima Biobanca digitale Italiana, a cui tutti i componenti la Rete avranno accesso, contribuendo in modo sostanziale alla loro progressiva estensione ed aggiornamento, fornendo uno strumento importantissimo nell'attuale medicina di precisione pediatrica.

OBIETTIVI

Obiettivo generale e relativo indicatore.

Il progetto si propone di generare profili di microbiota intestinale (enterofenotipi), in presenza di disbiosi (condizioni patologiche), correlati alla presenza di processi infiammatori a localizzazione intestinale (IBD e IBS) ed extra-intestinale come sindromi e disturbi metabolici, malattie genetiche (ad es. fibrosi cistica, sindrome di Down, sindrome di Williams), patologie autoimmunitarie (Artrite idiopatica giovanile, sindrome da attivazione macrofagica), malattie neurologiche e del comportamento (ad es. autismo) obesità e steatosi epatica, in pazienti pediatrici di età compresa tra 0-18 anni, confrontati con gruppi di controllo (condizioni fisiologiche), stratificati per intervalli di età sovrapponibili ed eventi di programming fisiologico.

In particolare, questo progetto di Rete si propone di: i) estendere ed ottimizzare il processo di generazione di carte -omiche di microbioti individuali, associate a vari endofenotipi pediatrici, a partire da quelle già sviluppate in OPBG, ad un reservoir di pazienti e soggetti sani esteso su scala nazionale grazie al contributo sinergico degli Ospedali che afferiscono alla Rete IDEA, al fine di estendere la Biobanca di riferimento dei microbioti pediatrici; ii) fornire un sistema infrastrutturale Open or Limited Access Source di profili di microbiota per la comunità pediatrica scientifica e clinica; iii) applicare ed ottimizzare i workflow diagnostici avanzati sviluppati dal Centro coordinatore del progetto, relativi allo stato disbiotico intestinale, per valutare le ricadute cliniche immediate nella gestione del paziente cronico, compresa la sua terapia; iii) sviluppare algoritmi di decision support system (DSS) per associare microbiota profiling alla diagnosi e alla prognosi delle disbiosi intestinali; iv) utilizzare DSS per sviluppare terapie alternative o supplementari, basate sull'uso mirato di probiotici e prebiotici, in grado di indurre modificazioni paziente-specifiche del microbiota per migliorare la gestione clinica del paziente; v) disegnare, sulla base dei profili "misurati" di disbiosi intestinale, modulazioni interventiste del microbiota basate su FMT; vii) creare una Biobanca per FMT pediatrico.

La Rete Pediatrica armonizzerà le competenze clinico-laboratoristiche per il reclutamento dei pazienti e per la raccolta campioni su scala nazionale per allestire un database di profili di microbiota predittivi di malattia o associati a processi fisiologici di programming a livello di popolazione.

I protocolli di microbiota profiling saranno condivisi dai vari IRCCS con il Centro Coordinatore del Progetto in modo da standardizzare le attività di caratterizzazione di microbiota, creare a un database centrale e condiviso, elaborare un DSS congiunto per il trattamento clinico delle patologie microbiota-correlate.

Indicatore:

Numero dei profili di microbiota generati per anno nel triennio 2022-2024/media del numero dei profili di microbiota generati nel triennio precedente: $n + x/n$, dove x rappresenta il valore incrementale per anno; Indicatore b: Numero dei pazienti pediatrici sottoposti a trattamento nutrizionale o FMT per anno/numero dei pazienti pediatrici arruolati per l'analisi del microbiota per anno.

Standard di risultato:

Nell'ambito della microbiomica traslazionale, e ancor più in quella diagnostica e clinica non esistono allo stato attuale degli **standard di risultato**. Essi verranno definiti proprio da questo Progetto di Rete grazie a processi di standardizzazione delle attività previste in OPBG per il conseguimento degli obiettivi generale e particolari.

Obiettivo specifico 1 e relativo indicatore. Produzione di profili metagenomici di microbiota mediante next generation sequencing (NGS) targeted per l'analisi ecologica o di shot-gun. Per ogni soggetto, in condizioni fisiologiche e/o patologiche, sarà caratterizzato il microbiota intestinale in termini di composizione microbica (OTUs).

Indicatori:

-numero dei campioni interamente processati nel flusso di lavoro NGS (profilati) ogni mese/numero di campioni raccolti dal progetto della rete pediatrica ogni mese;

-Indicatori di qualità di processo NGS: Check points di quality control (QC) per l'intero processo NGS

-Indicatori valutati dal Gruppo di Lavoro GdL III su Microbiota del Consiglio Superiore di Sanità.

-Indicatori interni qualità OPBG della ISO UNI EN ISO 9001: 2015.

Standard di risultato:

Nell'ambito dei processi NGS per la caratterizzazione del microbiota umano in ambito traslazionale, e ancor più in quello diagnostico e clinico, non esistono allo stato attuale degli **standard di risultato**. Essi verranno definiti proprio da questo Progetto di Rete grazie a processi di standardizzazione delle attività previste in OPBG per il conseguimento degli obiettivi generale e particolari e grazie alla valutazione degli indicatori selezionati candidati a divenire possibili standard di risultato dell'**obiettivo specifico 1**.

Fase pre-analitica 1. I campioni di microbiota dei pazienti saranno sottoposti a procedure software-assisted per la raccolta, l'invio e la conservazione, fino all'estrazione del DNA. **NOTA.** Allo stato attuale esiste già una banca di microbioti presso l'OPBG, che contiene circa 10.000 campioni, associabili a 52 Progetti di Ricerca Traslazionale.

Fase analitica 1. Analisi metagenomica targeted. Dal DNA ottenuto sarà amplificato il locus ribosomiale batterico V3-V4 del gene 16S rRNA, riconosciuto come gold standard per l'identificazione batterica, mediante primer universali. Ad ogni campione saranno assegnati indici nucleotidici univoci, prima dell'assemblaggio in un pool. L'insieme di questi processi sarà automatizzato mediante l'acquisizione di un sistema robotico MICROLAB STARlet personalizzato. Questo strumento permetterà di standardizzare e di velocizzare il processamento del singolo campione. Il pool verrà sequenziato su piattaforma Miseq Illumina, seguendo il protocollo già standardizzato presso l'OPBG, rispondente a procedura ISO UNI EN ISO 9001: 2015. **Analisi metagenomica shotgun.** Dopo l'estrazione del DNA, ottimizzata secondo i protocolli dell'OPBG, basati sull'omogenizzazione del campione differenziale (PreCellys) a seconda del target di analisi shotgun selezionato (batterioma, micoma, viroma a DNA), saranno preparate libraries per il sequenziamento usando Illumina® DNA Prep Tagmentation kit (Illumina, California, USA) secondo le

istruzioni specifiche Illumina. Il sequenziamento sarà realizzato su piattaforme NextSeq550 oppure NovaSeq 6000 garantendo almeno una profondità di sequenziamento di 7.5GB.

Fase post-analitica 1. I dati grezzi saranno analizzati mediante il software Quantitative Insights in Microbial Ecology (QIIME). Saranno effettuate analisi ecologiche di diversità alpha e beta, per definire le differenze nell'ecologia del microbiota in relazione allo stato fisiologico e/o patologico. Inoltre, saranno applicati test statistici non parametrici di Kruskal Wallis, analisi multivariate, univariate e di co-correlazione tra le comunità microbiche, modelli matematici (regressione logistica lineare, linear discriminant analysis [LDA] Effect Size [LEfSe]), per definire le differenze in termini di abbondanza relativa delle specie batteriche e identificare i possibili marcatori che caratterizzano il profilo del microbiota associato ai pazienti versus gli individui sani. L'acquisizione di una nuova piattaforma Miseq Illumina aumenterà la processività di analisi dei profili di microbiota e affiancando le preesistenti piattaforme gemelle avrà anche un ruolo di back-up di attività, consentendo una processività di analisi continuativa. Per le **analisi shot gun** saranno utilizzate pipelines dedicate originali elaborate presso l'OPBG, in collaborazione con GenomeUp, con tre fasi principali: pre-elaborazione con rimozione di sequenze a bassa qualità; comparazione con genoma umano; confronto con database di riferimento e annotazione tassonomica per batteri, funghi, virus fino alla produzione di grafici krona.

Obiettivo specifico 2 e relativo indicatore. Produzione di profili di microbiota biochimico-funzionali. Per ogni soggetto, in condizioni fisiologiche e/o patologiche, sarà caratterizzato il microbiota intestinale in termini di proprietà funzionali (profilo metabolomico, metaproteomico e caratterizzazione biochimicoproteomico-metabolica dell'ospite).

Indicatori:

-Indicatori valutati dal Gruppo di Lavoro GdL I su Trasferimento delle Tecniche Omiche nella pratica clinica" del Consiglio Superiore di Sanità.

-Indicatori interni qualità OPBG della ISO UNI EN ISO 9001: 2015.

Standard di risultato:

Nell'ambito dei processi di caratterizzazione biochimica del microbiota umano in ambito traslazionale, e ancor più in quello diagnostico e clinico, non esistono allo stato attuale degli standard di risultato. Essi verranno definiti proprio da questo Progetto di Rete grazie a processi di standardizzazione delle attività previste in OPBG per il conseguimento degli obiettivi generale e particolari e grazie alla valutazione degli indicatori selezionati candidati a divenire possibili standard di risultato dell'**obiettivo specifico 2**.

Fase analitica 2a. Analisi metabolomica. Per definire lo spettro funzionale del microbiota, si estrarranno i metaboliti che saranno caratterizzati mediante un'analisi "untargeted" tramite gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa ed abbinata a micro-estrazione in fase solida (GC-MS/SPME). Da questa analisi si potrà produrre un profilo di tipo quali-quantitativo dei composti organici volatili (VOCs) (Di Cagno et al. 2011). L'acquisizione, di un GC-MS, comprensivo di autocampionatore, workstation e software, migliorerà i tempi e la processività dell'intero set dei campioni biologici selezionati. Inoltre, per la caratterizzazione di tipo biochimico-metabolico dei campioni biologici potrà essere eseguita una determinazione, di tipo "targeted", quali-quantitativa di composti organici, acidi, ammine, aminoacidi, zuccheri ecc., tramite spettrometria di massa accoppiata a cromatografia liquida (LC-MS/MS). Per analizzare ulteriormente le classi dei composti chetonici e degli acidi organici e per caratterizzare gli aminoacidi, gli zuccheri e i composti azotati, si eseguirà l'analisi spettroscopica 1H-NMR sui campioni fecali. Gli spettri 1H-NMR saranno acquisiti mediante un Bruker RMN, disponibile presso il Dipartimento di Chimica dell'Università Sapienza. I dati saranno interpretati mediante Tukeys Honestly Significant difference test (Statistica 6.0, StatSoft) e Canonical discriminant analysis of Principal coordinates (CAP). Saranno eseguite analisi chemiometriche per la definizione di modelli funzionali del microbiota da usare per la predizione di attività biochimica del microbiota (Vernocchi et al., 2020).

Fase analitica 2b. Analisi metaproteomica. Per la caratterizzazione biochimico-proteomica e metabolomica l'OPBG ha già in dotazione un Q-TRAP 6500 Plus, una piattaforma Orbitrap Fusion e una piattaforma 5600 Triple TOF PLUS MS per l'analisi untargeted. Il contenuto proteico dei campioni fecali sarà preliminarmente

caratterizzato con tecnologia Triple TOF PLUS MS 5600. L'identificazione delle proteine e delle OTU associate sarà determinata mediante decodifica dei profili MS/MS con software PROTEIN PILOT in-house interfacciato con database proteici di microbiota intestinali umani (MetaHIT e "personalizzati"). Potranno essere misurate, in termini quantitativi, le proteine identificate, gestendone in modo altamente processivo l'elevatissimo numero di peptidi generati. La distribuzione di frequenze delle OTU sarà processata attraverso le teorie descrittive statistiche (Skewness, Kurtosis, Kolmogorov-Smirnov tests).

Obiettivo specifico 3 e relativo indicatore. Attraverso l'integrazione dei dati o dei profili omici di cui all'obiettivo specifico 1 e 2 si costruiranno mappe meta-omiche stratificate per tipologia di bambino (sano/malato) e per età. Allo scopo saranno eseguite valutazioni computazionali per rispondere alla percentuale ottimale del valore nullo nelle matrici complesse dei dati omici NGS e di metabolomica, valutando il decremento della varianza del sistema. Inoltre, mediante cicli iterativi, saranno valutati gli outliers del sistema e le variabili ottimali in grado di descrivere il sistema microbiota. Scelto il set ottimale di low fused data a partire dai multidimensionali, si procederà all'integrazione dei dati omici e alla produzione di modelli chemiometrici, come precedentemente riportato per i modelli metabolici. In questo caso, il modello integrato sarà utilizzato come modello predittivo diagnostico e prognostico di malattia (Del Chierico et al., 2017). Le mappe meta-omiche consentiranno di evidenziare il fenotipo-malattia significativamente associato con le alterazioni del microbiota intestinale. Le caratteristiche differenziali del contenuto microbico e/o della funzionalità del microbioma intestinale saranno selezionate come indici di perturbazione/malattia.

Indicatori:

-Indicatori interni qualità OPBG della ISO UNI EN ISO 9001: 2015

-Indicatori valutati dal Gruppo di Lavoro GdL I su Trasferimento delle Tecniche Omiche nella pratica clinica" del Consiglio Superiore di Sanità.

Standard di risultato:

Nell'ambito dei processi di integrazione dei dati omici del microbiota umano in ambito traslazionale, e ancor più in quello diagnostico e clinico, non esistono allo stato attuale degli standard di risultato. Essi verranno definiti proprio da questo Progetto di Rete grazie a processi di standardizzazione delle attività previste in OPBG per il conseguimento degli obiettivi generale e particolari e grazie alla valutazione degli indicatori selezionati candidati a divenire possibili standard di risultato dell'**obiettivo specifico 3**.

Obiettivo specifico 4 e relativo indicatore. Creazione di un database nazionale pediatrico di profili microbiologici e metabolomici di microbiota. I profili ottenuti (obiettivo specifico 1, 2 e 3) saranno organizzati in un database nazionale con accesso alla comunità clinica e scientifica pediatrica, per rendere fruibili le informazioni sui profili del microbiota alla comunità scientifica e clinica pediatrica. Le apparecchiature e i metodi indicati negli obiettivi 1-3 produrranno una grande quantità di dati che dovranno essere efficacemente "tradotti" per fornire una interpretazione integrata dei profili del microbiota. L'opera di traduzione è normalmente affidata a database pubblici presenti nel web (NCBI, SWISSPROT, NIST), di enormi dimensioni, che forniscono dati fortemente ridondanti. L'obiettivo 4 si propone di costruire dei database personalizzati di metagenomica, metaproteomica e metabolomica. L'interfacciamento tra la strumentazione ed il suo specifico database permetterà di eseguire, con modalità processiva (flusso generazione dati e interpretazione profili), la completa caratterizzazione strutturale e/o funzionale del microbiota intestinale, per produrre banche dati personalizzate per il paziente pediatrico. Per questo, nella gestione tecnologica è prevista la presenza di un server per la conservazione e la gestione dei dati. Sarà formalizzata una collaborazione con il sistema centrale CINECA o altro Ente erogatore di spazio server per l'archiviazione dei dati.

Indicatori:

- Indicatori di sistema BIMS: Biomedical Information Management System.

-Indicatori di Decision Support System (DSS)

Standard di risultato:

Nell'ambito della generazione di database personalizzati di microbiota umano in ambito traslazionale, e ancor più in quello diagnostico e clinico, non esistono allo stato attuale degli **standard di risultato**. Essi verranno definiti proprio da questo Progetto di Rete grazie a processi di standardizzazione delle attività previste in OPBG per il conseguimento degli obiettivi generale e particolari e grazie alla valutazione degli indicatori selezionati candidati a divenire possibili standard di risultato dell'**obiettivo specifico 4**

Obiettivo specifico 5 e relativo indicatore. Scale-up di analisi diagnostiche del microbiota. L'Unità di Microbioma Umano dell'OPBG attualmente processa circa 2000 campioni/anno per l'analisi NGS del microbiota a scopo diagnostico. Nel triennio 2022-2024 si prevede un aumento delle analisi fino a 3000 campioni/anno all'interno della Rete pediatrica creata dal progetto.

Indicatori:

Numero dei profili di microbiota generati per anno nel triennio 2022-2024/numero medio dei profili di microbiota generati nel triennio precedente: $n + x/n$, dove x rappresenta il valore incrementale per anno.

Standard di risultato:

Nell'ambito della microbiomica traslazionale, e ancor più in quella diagnostica e clinica non esistono allo stato attuale degli **standard di risultato in termini di ottimizzazione del numero di profili ottenibili in un anno**. Essi verranno definiti proprio da questo Progetto di Rete grazie a processi di standardizzazione delle attività previste in OPBG per il conseguimento degli obiettivi generale e particolari

Obiettivo specifico 6 e relativo indicatore. Produzione di profili diagnostici del microbiota per lo screening donatore/ricevente di trapianto di microbiota intestinale (FMT). Attualmente L'Unità di Microbioma Umano dell'OPBG fornisce profili di screening per FMT in ambito pediatrico. Nel triennio 2022-2024 si prevede di eseguire uno scale-up di screening diagnostico per FMT e di costituire una banca FMT condivisa con tutti gli IRCCS della Rete IDEA che partecipano al progetto.

Indicatori:

-Numero dei pazienti pediatrici sottoposti a trattamento nutrizionale o FMT per anno/numero dei pazienti pediatrici arruolati per l'analisi del microbiota per anno.

- ISO UNI EN ISO 9001: 2015

-Protocollo clinico OPBG per il Trapianto Fecale

-Indicazioni condivise CNT/OPBG

-Linee guida Internazionali su FMT (Keller et al., UEG, 2021; Cammarota et al., GUT, 2019).

Standard di risultato:

Nell'ambito del trapianto fecale pediatrico, non esistono allo stato attuale degli **standard di risultato**. Essi verranno definiti proprio da questo Progetto di Rete grazie a processi di standardizzazione delle attività previste in OPBG per il conseguimento degli obiettivi generale e particolari.

Obiettivo specifico 7 e relativo indicatore. Trasferimento del sistema di DSS generato agli interventi clinici mirati al paziente pediatrico con patologie microbiota-correlate nell'ambito della consensus clinica condivisa dalla Rete.

Indicatori :

-Numero delle infusioni (x)/numero dei pazienti sottoposti a FMT (n)=nx/n, da considerarsi come misura dell'efficacia dell' FMT;

-Indice della parziale o totale reversione al microbiota originale del paziente, n (numero di mesi)/12 mesi.

Standard di risultato:

Nell'ambito del trapianto fecale pediatrico e delle DSS ad esso associati non esistono allo stato attuale degli **standard di risultato**. Essi verranno definiti proprio da questo Progetto di Rete grazie a processi di standardizzazione delle attività previste in OPBG per il conseguimento degli obiettivi generale e particolari.

DESCRIZIONE ANALITICA DI PROGETTO: STRUTTURA WBS DETTAGLIATA WORK PACKAGES:

WP1. Estensione della bio-banca OPBG dei microbioti pediatrici

WP2. Ottimizzazione dei protocolli di metagenomica, metaproteomica, metabolomica, foodomica

WP3. Cross-analisi dei dati clinici e omici per ciascun paziente con estensione del database del microbiota

WP4. Valutazione clinica degli enterotipi microbici associati alla fenomica del paziente

WP5 Esecuzione ed ottimizzazione analisi diagnostiche di microbiomica

WP6. Interventi clinici nutrizionali e di FMT e creazione di una banca FMT

WP7 Utilizzo di DSS in microbomica diagnostica e clinica

DELIVERABLES:

D1- Arruolamento di nuovi pazienti e raccolta di campioni dai vari Centri della Rete IDEA

D2- Processamento dei campioni per analisi omiche del microbiota

D3- Generazione di database specifici di dati e profili meta-omici di microbiota

D4- Integrazione dei dati meta-omici di microbiota con i dati clinici (fenomica)

D5- Risultati della valutazione di scale-up delle analisi di microbiota diagnostiche

D6 Servizio per screening ed esecuzione del FMT

D7 Applicazione di DSS in microbomica diagnostica e clinica

MILESTONES:

ML Obiettivo 1-Attività 1. Fine reclutamento dei pazienti arruolati nei diversi IRCCS afferenti al progetto (M24)

ML Obiettivo 1-Attività 2. Valutazione dei profili di microbiota ottenuti (M12; M24; M36)

ML Obiettivo 1-Attività 3. Valutazione dei profili metagenomici di microbiota ottenuti (M12; M24; M36)

ML Obiettivo 2-Attività 1. Valutazione dei profili metabolomici di microbiota ottenuti (M12; M24; M36)

ML Obiettivo 2-Attività 2. Valutazione dei profili metaproteomici di microbiota ottenuti (M12; M24; M36)

ML Obiettivo 3-Attività 2. Valutazione delle mappe integrate di microbiota ottenute (M12; M24; M36)

ML Obiettivo 3-Attività 3. Valutazione delle mappe integrate di microbiota ottenute (M12; M24; M36)

ML Obiettivo 4-Attività 1. Valutazione della gestione e dell'andamento del database nazionale (M12; M24; M36)

ML Obiettivo 4-Attività 2. Valutazione dei profili integrati (M12; M24; M36)

ML Obiettivo 5-Attività 1. Verifica andamento analisi diagnostiche (M12; M24; M36)

ML Obiettivo 5-Attività 2. Verifica scale-up analisi dei profili di microbiota dal punto di vista analitico (M12; M24; M36)

ML Obiettivo 6-Attività 1. Valutazione dei profili di microbiota intestinale per lo screening dei donatori/riceventi l'FMT (M12; M24; M36)

ML Obiettivo 7-Attività 2. Valutazione di efficacia di DSS (M12; M24; M36)

RISULTATI ATTESI

Risultati attesi

Il presente progetto risponde appieno alla missione degli IRCCS e agli obiettivi del Sistema Sanitario Nazionale (SSN), per la gestione di pazienti pediatriche che presentano condizioni di disbiosi intestinale e patologie ad essa associate e, di conseguenza, alterazioni patologiche del microbiota intestinale. È atteso che le tecnologie meta-omiche oggetto del progetto, considerata l'elevata multidisciplinarietà e le competenze richieste, forniscano strumenti di DSS essenziali per la gestione delle patologie associate alle modificazioni del microbiota intestinale e di altro distretto. Dato che queste patologie hanno ricadute dirette su vari aspetti della salute/malattia del bambino, la costituzione di una Rete Pediatrica è necessaria valutare ampi numeri di soggetti sani ed ammalati, e per un'azione concertata sul ruolo clinico delle modificazioni del microbiota nell'età evolutiva. Questo permetterà, attraverso attività congiunte e coordinate, di affrontare gli eventi del programming, della crescita, non solo in ambito terapeutico ma anche preventivo e di mantenimento dello stato di salute del bambino. Questo significherà trasferire la medicina dei sistemi nella pratica clinica, per migliorare la crescita e lo sviluppo del bambino, nel corso di patologie importanti ma anche per prevenire malattie croniche ad insorgenza pediatrica e per mantenere lo stato di salute in età evolutiva. Nel dettaglio, il presente progetto avrà il potenziale di sviluppare un impatto traslazionale immediato nella gestione di alcuni gruppi di pazienti cronici e complessi, che presentano condizioni di disbiosi intestinale o respiratoria e, quindi, importanti modificazioni dei microbioti endogeni, con innesco di rilevanti processi infiammatori. Il progetto prefigura, infatti, la validazione e scale-up di applicativi analitici per la diagnosi descrittiva e funzionale degli enterotipi microbici sui campioni fecali e delle vie aeree superiori dei pazienti affetti da processi disbiotici, mediante strategie mirate alla descrizione "assoluta" oltre che relativa delle popolazioni microbiche dei vari microbioti (mappe omiche), considerando le differenze concernenti sia i batteri del contenuto fecale che quelli associati alle mucose, più direttamente coinvolti nella risposta infiammatoria. Dato che è atteso che le strategie omiche oggetto del presente progetto forniscano anche informazioni biochimico-funzionali sul microbiota pediatrico, saranno anche generate mappe metaboliche (metabolomica/metabonomica) e di scaffold proteico (metaproteomica), oltre che di sequenziamento di seconda generazione (NGS), che saranno alla fine integrate, in un continuo processo di trasferimento degli algoritmi analitico-laboratoristici ai clinici che hanno in carico i pazienti e, quindi, alla pianificazione di specifici interventi di presa in carico, come i piani nutrizionali e il trapianto del microbiota, basati sul più avanzato profilo del microbiota pediatrico al momento disponibile. L'analisi degli enterotipi delle tipologie dei pazienti selezionate, associati alle rispettive caratteristiche anamnestiche, ha superato la lunga fase di messa a punto dei metodi pre-analitici, analitici e strumentali per lo studio del microbiota intestinale da campione fecale. Pertanto, i profili metagenomici e metabolici del microbiota fecale (enterofenotipi), già disponibili nell'OPBG per molte patologie pediatriche, e validati da processi di peer-reviewing e di validazione analitica, saranno incrementati grazie alle attività della Rete Pediatrica, fornendo così profili integrati di microbiota da considerarsi come marcatori di popolazione e strumenti di predizione di malattia. Questo avrà delle ricadute dirette nel disegno delle sperimentazioni innovative per il controllo dietetico-nutrizionale ma anche per valutazioni "omics-based" della somministrazione di probiotici e antibiotici e per le procedure di trapianto di microbiota. In sintesi, l'approccio altamente originale e di elevata complessità

tecnologica qui descritto per la caratterizzazione del microbiota pediatrico, permetterà di inquadrare precocemente gli stati di disbiosi intestinale correlati alle IBD, alle malattie metaboliche, all'obesità, alle malattie genetiche e di alterazione dello spettro comportamentale, al fine di migliorare le condizioni cliniche dei pazienti e di inquadrare fattori di predisposizione nei sani. La rete Pediatrica, inoltre, basata sull'aggregazione e sul confronto tra le diverse competenze clinico-sperimentali presenti, avrà lo scopo di sviluppare e validare protocolli diagnostici ed approcci terapeutico-nutrizionali innovativi e più appropriati per il trattamento dei pazienti cronici affetti da disbiosi intestinali, un modello del tutto originale e con potenziali importanti ricadute cliniche. L'utilizzo delle apparecchiature richieste in questo Progetto si inserisce, pertanto, in un percorso di completamento delle infrastrutture necessarie alla caratterizzazione del microbiota intestinale nelle patologie pediatriche su scala nazionale.

Descrizione impatto

Questo Progetto è il risultato di una lunga serie di studi collaborativi, clinici e di ricerca, che coinvolgono sia i clinici che i ricercatori dell'OPBG, ma anche di altre strutture impegnate nello studio del microbiota intestinale sul territorio nazionale ed europeo (Consortium OPBG, Putignani et al., 2015). Queste collaborazioni hanno già permesso di traslare nella diagnosi e perciò nella clinica di numerose malattie pediatriche una serie di nozioni integrate ottenute dallo studio del microbiota seguendo il modello della medicina dei sistemi. Questo approccio, altamente innovativo e di elevata complessità tecnologica, permetterà di inquadrare precocemente gli stati di disbiosi intestinale e di migliorare il quadro clinico dei pazienti con ovvie ricadute economiche anche sul SSN. Questa Rete collaborativa Pediatrica rappresenterà un volano per aggregare e confrontare le diverse eccellenze presenti negli IRCSS e sinergicamente unire le competenze clinico-sperimentali presenti. Questo progetto consentirà di costituire una Rete Pediatrica di riferimento per l'assistenza del paziente affetto da patologie microbiota-correlate o correlabili, laddove definite e caratterizzate mediante la profilazione del microbiota intestinale o di altro distretto. L'alto contenuto tecnologico già fruibile presso l'OPBG ed incrementabile col presente progetto consentirà di sviluppare un sistema DSS a carattere diagnostico-clinico per la gestione del paziente pediatrico in tutte le patologie correlabili all'infiammazione, a deficit o alterazioni nutrizionali, all'autoimmunità, ad eventi infettivi, grazie ad un impianto tecnologico ad altissima competitività, e già individuato come standard dal CSS, dal CNT, e da diverse Società Scientifiche come AMCLI, SOIPA, SIM, ItPA, EuPA.

In sintesi, si potranno presentare le seguenti opportunità:

- Trasferimento costante delle attività traslazionali a protocolli diagnostico-clinici
- Produzione di strumenti diagnostico-clinici di biologia dei sistemi
- Sperimentazioni cliniche per l'identificazione/valutazione di probiotici e antibiotici mirati e di trapianti di microbiota per singola patologia
- Creazione di gruppi di lavoro sulla medicina dei sistemi pediatrica presso le Società Scientifiche (ad es. AMCLI, ItPA, EuPA, SIGE, SOIPA, SIM, SIP)
- Trasferimento dei risultati progettuali in prodotti di marketing e brevetti
- Partecipazione a progetti europei focalizzati sul microbiota e sulla salute umana

Le attività del Centro Coordinatore del presente Progetto sono state organizzate in un Progetto Strategico 2018-2020 e in attività assistenziali attraverso il Progetto Buone Pratiche 2017. Gli indicatori di processo (CERTIFICAZIONI ISO, VALUTAZIONE STANDARD delle ATTIVITA' OPBG da parte del CNT, CSS) e di struttura (COSTRUZIONE DI NUOVI LABORATORI DEDICATI A PROTEOMICA, METABOLOMICA, FMT, METAGENOMICA), rappresentano solidi parametri per garantire il celere avvio, la veloce realizzazione, la programmazione a medio termine, la creazione di un indotto importante sul territorio nazionale per questo Progetto di Rete.

Punti di forza per l'immediata operatività progettuale:

- La presenza di una Biobanca OPBG contenente circa 10.000 campioni di microbiota fecale, mucosale, delle vie aeree superiori
- La preesistenza di team dedicati
- L'esistenza di un Consorzio clinico-omico Italiano/Europeo a cui partecipa il coordinatore del presente progetto
- L'ideazione di un Decision Support System (DSS) originale
- Il background infettivologico "One Health", riconosciuto come Programma CCM
- La certificazione ISO dei processi di ricerca e di diagnostica di metagenomica
- Il precedente lavoro svolto sul microbiota profiling e le sue correlazioni cliniche.
- Il disegno e la realizzazione di protocolli di trapianto fecale in pazienti pediatrici in collaborazione con il CNT
- La preesistenza di una suite genomica, proteomica e metabolomica che sarà completata e ottimizzata con il presente progetto

Il presente Progetto di rete è destinato ad incrementare in modo sostanziale le seguenti attività:

- Estensione ed automatizzazione del parco macchine e dei flussi NGS
- Gestione infrastrutturali dei dati generati da microbiota profiling
- Attività di banking di ricerca e clinica per profiling ed FMT
- Consorzio clinico-omico Italiano di Rete per la caratterizzazione del microbiota in pediatria e sue applicazioni cliniche

Le attività di ricerca oggetto di questo progetto permetteranno di identificare nuovi marcatori correlati alle malattie umane di immediata ricaduta diagnostica e terapeutica, utilizzando metodologie ed approcci omici e bioinformatici originali ed altamente competitivi sul piano internazionale della ricerca.

ATTIVITA'	1-6 MESI	7-12 MESI	13-18 MESI	19-24 MESI	25-30 MESI	31-36 MESI
<i>Attività 1</i> Fase pre-analitica (OBIETTIVO 1)						
<i>Attività 2</i> Fase analitica 1 (OBIETTIVO 1)						
<i>Attività 3</i> Fase post- analitica 1 (OBIETTIVO 1)						
<i>Attività 1</i> Fase analitica 2a. Analisi metabolomica (OBIETTIVO 2)						
<i>Attività 2</i> Fase analitica 2b. Analisi metaproteomica (OBIETTIVO 2)						
<i>Attività 1</i> Costruzione mappe meta-omiche stratificate per tipologia di bambino (sano/malato) e per età (OBIETTIVO 3)						
<i>Attività 2</i> Valutati degli outliers del sistema e delle variabili ottimali in grado di descrivere il sistema microbiota (OBIETTIVO 3)						
<i>Attività 3</i> Integrazione dei dati omici e produzione di modelli chemiometrici (OBIETTIVO 3)						
<i>Attività 1</i> Organizzazione del database nazionale dei profili di microbiota pediatrico (OBIETTIVO 4)						
<i>Attività 2</i> Traduzione dei dati omici in dati integrati di profili di microbiota (OBIETTIVO 4)						
<i>Attività 1</i> Aumento						

disseminazione per aumentare il numero di richieste di microbiota da sostenere in OPBG (OBIETTIVO 5)						
<i>Attività 2</i> Automatizzazione processi estrattivi e potenziamento dei processi di sequenziamento (OBIETTIVO 5)						
<i>Attività 1</i> Aumento disseminazione per aumentare il numero di richieste di microbiota da sostenere in OPBG (OBIETTIVO 6)						
<i>Attività 1</i> Utilizzo del DSS in microbiomica a concreti casi clinici (OBIETTIVO 7)						

BIBLIOGRAFIA

- 1: Conta G, Del Chierico F, Reddel S, Marini F, Sciubba F, Capuani G, Tomassini A, Di Cocco ME, Laforgia N, Baldassarre ME, Putignani L, Miccheli A. Longitudinal Multi-Omics Study of a Mother-Infant Dyad from Breastfeeding to Weaning: An Individualized Approach to Understand the Interactions Among Diet, Fecal Metabolome and Microbiota Composition. *Front Mol Biosci.* 2021 Oct4;8:688440. doi: 10.3389/fmolb.2021.688440. PMID: 34671642; PMCID: PMC8520934.
- 2: Montanari C, Parolisi S, Borghi E, Putignani L, Bassanini G, Zuvadelli J, Bonfanti C, Tummolo A, Dionisi Vici C, Biasucci G, Burlina A, Carbone MT, Verduci E. Dysbiosis, Host Metabolism, and Non-communicable Diseases: Dialogue in the Inborn Errors of Metabolism. *Front Physiol.* 2021 Sep 6;12:716520. doi: 10.3389/fphys.2021.716520. PMID: 34588993; PMCID: PMC8475650.
- 3: Giufrè M, Mazzolini E, Cerquetti M, Brusaferrò S; CCM2015 One-Health ESBL-producing *Escherichia coli* Study Group. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from extraintestinal infections in humans and from food-producing animals in Italy: a 'One Health' study. *Int J Antimicrob Agents.* 2021 Sep 12:106433. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2021.106433. Epub ahead of print. PMID: 34525400.
- 4: De Vincentis A, Santonico M, Del Chierico F, Altomare A, Marigliano B, Laudisio A, Reddel S, Grasso S, Zompanti A, Pennazza G, Putignani L, Guarino MPL, Cicala M, Antonelli Incalzi R. Gut Microbiota and Related Electronic Multisensorial System Changes in Subjects With Symptomatic Uncomplicated Diverticular Disease Undergoing Rifaximin Therapy. *Front Med (Lausanne).* 2021 Jul 19;8:655474. doi: 10.3389/fmed.2021.655474. PMID: 34350192; PMCID: PMC8326398.
- 5: Iorio A, Biazzo M, Gardini S, Muda AO, Perno CF, Dallapiccola B, Putignani L. Cross-correlation of virome-bacteriome-host-metabolome to study respiratory health. *Trends Microbiol.* 2021 May 26:S0966-842X(21)00122-0. doi: 10.1016/j.tim.2021.04.011. Epub ahead of print. PMID: 34052095.
- 6: Palombo G, Merone M, Altomare A, Gori M, Terradura C, Bacco L, Del Chierico F, Putignani L, Cicala M, Guarino MPL, Piemonte V. The impact of the intestinal microbiota and the mucosal permeability on three different antibiotic drugs. *Eur J Pharm Sci.* 2021 Sep 1;164:105869. doi: 10.1016/j.ejps.2021.105869. Epub 2021 May 18. PMID: 34020000.
- 7: Altomare A, Del Chierico F, Rocchi G, Emerenziani S, Nuglio C, Putignani L, Angeletti S, Lo Presti A, Ciccozzi M, Russo A, Cocca S, Ribolsi M, Muscaritoli M, Cicala M, Guarino MPL. Association between Dietary Habits and Fecal Microbiota Composition in Irritable Bowel Syndrome Patients: A Pilot Study. *Nutrients.* 2021 Apr 27;13(5):1479. doi: 10.3390/nu13051479. PMID: 33925672; PMCID: PMC8170891.
- 8: Baldelli V, Scaldaferrì F, Putignani L, Del Chierico F. The Role of Enterobacteriaceae in Gut Microbiota Dysbiosis in Inflammatory Bowel Diseases. *Microorganisms.* 2021 Mar 27;9(4):697. doi: 10.3390/microorganisms9040697. PMID: 33801755; PMCID: PMC8066304.
- 9: Del Chierico F, Manco M, Gardini S, Guarrasi V, Russo A, Bianchi M, Tortosa V, Quagliariello A, Shashaj B, Fintini D, Putignani L. Fecal microbiota signatures of insulin resistance, inflammation, and metabolic syndrome in youth with obesity: a pilot study. *Acta Diabetol.* 2021 Aug;58(8):1009-1022. doi: 10.1007/s00592-020-01669-4. Epub 2021 Mar 22. PMID: 33754165.
- 10: Cotugno N, Ruggiero A, Bonfante F, Petrara MR, Zicari S, Pascucci GR, Zangari P, De Ioris MA, Santilli V, Manno EC, Amodio D, Bortolami A, Pagliari M, Concato C, Linardos G, Campana A, Donà D, Giaquinto C; CACTUS Study Team, Brodin P, Rossi P, De Rossi A, Palma P. Virological and immunological features of SARS-CoV-2-infected children who develop neutralizing antibodies. *Cell Rep.* 2021 Mar 16;34(11):108852. doi: 10.1016/j.celrep.2021.108852. PMID: 33730580; PMCID: PMC7962998.
- 11: Ponziani FR, Picca A, Marzetti E, Calvani R, Conta G, Del Chierico F, Capuani G, Faccia M, Fianchi F, Funaro B, José Coelho-Junior H, Petito V, Rinninella E, Paroni Sterbini F, Reddel S, Vernocchi P, Cristina Mele M, Miccheli A, Putignani L, Sanguinetti M, Pompili M, Gasbarrini A; GuLiver study group.

Characterization of the gut-liver-muscle axis in cirrhotic patients with sarcopenia. *Liver Int.* 2021 Jun;41(6):1320-1334. doi: 10.1111/liv.14876. Epub 2021 Mar 25. PMID: 33713524.

12: Pane S, Sacco A, Iorio A, Romani L, Putignani L. *Strongyloides Stercoralis* Infestation in a Child: How a Nematode Can Affect Gut Microbiota. *Int J Mol Sci.* 2021 Feb 21;22(4):2131. doi: 10.3390/ijms22042131. PMID: 33669932; PMCID: PMC7924877.

13: Mennini M, Reddel S, Del Chierico F, Gardini S, Quagliariello A, Vernocchi P, Valluzzi RL, Fierro V, Riccardi C, Napolitano T, Fiocchi AG, Putignani L. Gut Microbiota Profile in Children with IgE-Mediated Cow's Milk Allergy and Cow's Milk Sensitization and Probiotic Intestinal Persistence Evaluation. *Int J Mol Sci.* 2021 Feb 6;22(4):1649. doi: 10.3390/ijms22041649. PMID: 33562104; PMCID: PMC7915344.

14: Putignani L, Oliva S, Isoldi S, Del Chierico F, Carissimi C, Laudadio I, Cucchiara S, Stronati L. Fecal and mucosal microbiota profiling in pediatric inflammatory bowel diseases. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2021 Nov 1;33(11):1376-1386. doi: 10.1097/MEG.0000000000002050. PMID: 33470709.

15: D'Onofrio V, Del Chierico F, Belci P, Vernocchi P, Quagliariello A, Reddel S, Conta G, Mancino MV, Fadda M, Scigliano MC, Morelli R, De Francesco A, Guagnini F, Fassio F, Galletti R, Putignani L. Effects of a Synbiotic Formula on Functional Bowel Disorders and Gut Microbiota Profile during Long-Term Home Enteral Nutrition (LTHEN): A Pilot Study. *Nutrients.* 2020 Dec 29;13(1):87. doi: 10.3390/nu13010087. PMID: 33383954; PMCID: PMC7824736.

16: Vernocchi P, Gili T, Conte F, Del Chierico F, Conta G, Micheli A, Botticelli A, Paci P, Caldarelli G, Nuti M, Marchetti P, Putignani L. Network Analysis of Gut Microbiome and Metabolome to Discover Microbiota-Linked Biomarkers in Patients Affected by Non-Small Cell Lung Cancer. *Int J Mol Sci.* 2020 Nov 19;21(22):8730. doi: 10.3390/ijms21228730. PMID: 33227982; PMCID: PMC7699235.

17: Zizzari IG, Di Filippo A, Scirocchi F, Di Pietro FR, Rahimi H, Ugolini A, Scagnoli S, Vernocchi P, Del Chierico F, Putignani L, Rughetti A, Marchetti P, Nuti M, Botticelli A, Napolitano C. Soluble Immune Checkpoints, Gut Metabolites and Performance Status as Parameters of Response to Nivolumab Treatment in NSCLC Patients. *J Pers Med.* 2020 Nov 4;10(4):208. doi: 10.3390/jpm10040208. PMID: 33158018; PMCID: PMC7712566.

18: Keller JJ, Ooijevaar RE, Hvas CL, Terveer EM, Lieberknecht SC, Högenauer C, Arkkila P, Sokol H, Gridnyev O, Mégraud F, Kump PK, Nakov R, Goldenberg SD, Satokari R, Tkatch S, Sanguinetti M, Cammarota G, Dorofeev A, Gubska O, Laniro G, Mattila E, Arasaradnam RP, Sarin SK, Sood A, Putignani L, Alric L, Baunwall SMD, Kupcinskis J, Link A, Goorhuis AG, Verspaget HW, Ponsioen C, Hold GL, Tilg H, Kassam Z, Kuijper EJ, Gasbarrini A, Mulder CJJ, Williams HRT, Vehreschild MJGT. A standardised model for stool banking for faecal microbiota transplantation: a consensus report from a multidisciplinary UEG working group. *United European Gastroenterol J.* 2021 Mar;9(2):229-247. doi: 10.1177/2050640620967898. Epub 2021 Mar 9. PMID: 33151137; PMCID: PMC8259288.

19: Merli P, Putignani L, Ruggeri A, Del Chierico F, Gargiullo L, Galaverna F, Gaspari S, Pagliara D, Russo A, Pane S, Strocchio L, Algeri M, Rea F, Francesca Romeo E, Bernaschi P, Onetti Muda A, Dallapiccola B, Locatelli F. Decolonization of multi-drug resistant bacteria by fecal microbiota transplantation in five pediatric patients before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: gut microbiota profiling, infectious and clinical outcomes. *Haematologica.* 2020 Nov 1;105(11):2686-2690. doi: 10.3324/haematol.2019.244210. PMID: 33131263; PMCID: PMC7604639.

20: Vernocchi P, Marini F, Capuani G, Tomassini A, Conta G, Del Chierico F, Malattia C, De Benedetti F, Martini A, Dallapiccola B, van Dijkhuizen EHP, Micheli A, Putignani L. Fused Omics Data Models Reveal Gut Microbiome Signatures Specific of Inactive Stage of Juvenile Idiopathic Arthritis in Pediatric Patients. *Microorganisms.* 2020 Oct 6;8(10):1540. doi: 10.3390/microorganisms8101540. PMID: 33036309; PMCID: PMC7650812.

21: Quagliariello A, Del Chierico F, Reddel S, Russo A, Onetti Muda A, D'Argenio P, Angelino G, Romeo EF, Dall'Oglio L, De Angelis P, Putignani L, All The Other Fmt Opgb Committee Collaborators. Fecal Microbiota Transplant in Two Ulcerative Colitis Pediatric Cases: Gut Microbiota and Clinical Course Correlations.

Microorganisms. 2020 Sep 27;8(10):1486. doi: 10.3390/microorganisms8101486. PMID: 32992653; PMCID: PMC7599854.

22: Marazzato M, Zicari AM, Aleandri M, Conte AL, Longhi C, Vitanza L, Bolognino V, Zagaglia C, De Castro G, Brindisi G, Schiavi L, De Vittori V, Reddel S, Quagliariello A, Del Chierico F, Putignani L, Duse M, Palamara AT, Conte MP. 16S Metagenomics Reveals Dysbiosis of Nasal Core Microbiota in Children With Chronic Nasal Inflammation: Role of Adenoid Hypertrophy and Allergic Rhinitis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020 Sep 2;10:458. doi: 10.3389/fcimb.2020.00458. PMID: 32984078; PMCID: PMC7492700.

23: Ristori MV, Mortera SL, Marzano V, Guerrera S, Vernocchi P, Ianiro G, Gardini S, Torre G, Valeri G, Vicari S, Gasbarrini A, Putignani L. Proteomics and Metabolomics Approaches towards a Functional Insight onto AUTISM Spectrum Disorders: Phenotype Stratification and Biomarker Discovery. *Int J Mol Sci.* 2020 Aug 30;21(17):6274. doi: 10.3390/ijms21176274. PMID: 32872562; PMCID: PMC7504551.

24: Lopetuso LR, Quagliariello A, Schiavoni M, Petito V, Russo A, Reddel S, Del Chierico F, Ianiro G, Scaldaferri F, Neri M, Cammarota G, Putignani L, Gasbarrini A. Towards a disease-associated common trait of gut microbiota dysbiosis: The pivotal role of *Akkermansia muciniphila*. *Dig Liver Dis.* 2020 Sep;52(9):1002-1010. doi: 10.1016/j.dld.2020.05.020. Epub 2020 Jun 20. PMID: 32576522.

25: Vernocchi P, Del Chierico F, Putignani L. Gut Microbiota Metabolism and Interaction with Food Components. *Int J Mol Sci.* 2020 May 23;21(10):3688. doi: 10.3390/ijms21103688. PMID: 32456257; PMCID: PMC7279363.

26: Petito V, Fidaleo M, Pani G, Putignani L, Gasbarrini A, Scaldaferri F. Tumor necrosis factor- α and solute carrier family 22 member 4 gene polymorphisms as potential determinants of intestinal dysbiosis. *Dig Liver Dis.* 2020 Jun;52(6):691-693. doi: 10.1016/j.dld.2020.03.012. Epub 2020 Apr 17. PMID: 32312671.

27: Romani L, Del Chierico F, Chiriaco M, Foligno S, Reddel S, Salvatori G, Cifaldi C, Faraci S, Finocchi A, Rossi P, Bagolan P, D'Argenio P, Putignani L, Fusaro F. Gut Mucosal and Fecal Microbiota Profiling Combined to Intestinal Immune System in Neonates Affected by Intestinal Ischemic Injuries. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020 Feb 25;10:59. doi: 10.3389/fcimb.2020.00059. PMID: 32158700; PMCID: PMC7052114.

28: Botticelli A, Vernocchi P, Marini F, Quagliariello A, Cerbelli B, Reddel S, Del Chierico F, Di Pietro F, Giusti R, Tomassini A, Giampaoli O, Miccheli A, Zizzari IG, Nuti M, Putignani L, Marchetti P. Gut metabolomics profiling of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients under immunotherapy treatment. *J Transl Med.* 2020 Feb 3;18(1):49. doi: 10.1186/s12967-020-02231-0. PMID: 32014010; PMCID: PMC6998840.

29: Marzano V, Tilocca B, Fiocchi AG, Vernocchi P, Levi Mortera S, Urbani A, Roncada P, Putignani L. Perusal of food allergens analysis by mass spectrometry-based proteomics. *J Proteomics.* 2020 Mar 20;215:103636. doi: 10.1016/j.jprot.2020.103636. Epub 2020 Jan 7. PMID: 31918033.

30: Picca A, Ponziani FR, Calvani R, Marini F, Biancolillo A, Coelho-Junior HJ, Gervasoni J, Primiano A, Putignani L, Del Chierico F, Reddel S, Gasbarrini A, Landi F, Bernabei R, Marzetti E. Gut Microbial, Inflammatory and Metabolic Signatures in Older People with Physical Frailty and Sarcopenia: Results from the BIOSPHERE Study. *Nutrients.* 2019 Dec 26;12(1):65. doi: 10.3390/nu12010065. PMID: 31887978; PMCID: PMC7019826.

31: Lo Presti A, Del Chierico F, Altomare A, Zorzi F, Cella E, Putignani L, Guarino MPL, Monteleone G, Cicala M, Angeletti S, Ciccozzi M. Exploring the genetic diversity of the 16S rRNA gene of *Akkermansia muciniphila* in IBD and IBS. *Future Microbiol.* 2019 Nov;14:1497-1509. doi: 10.2217/fmb-2019-0175. Epub 2019 Dec 18. PMID: 31850811.

32: Ristori MV, Quagliariello A, Reddel S, Ianiro G, Vicari S, Gasbarrini A, Putignani L. Autism, Gastrointestinal Symptoms and Modulation of Gut Microbiota by Nutritional Interventions. *Nutrients.* 2019 Nov 18;11(11):2812. doi: 10.3390/nu11112812. PMID: 31752095; PMCID: PMC6893818.

33: Cammarota G, Ianiro G, Kelly CR, Mullish BH, Allegretti JR, Kassam Z, Putignani L, Fischer M, Keller JJ, Costello SP, Sokol H, Kump P, Satokari R, Kahn SA, Kao D, Arkkila P, Kuijper EJ, Vehreschild MJG, Pintus

C, Lopetuso L, Masucci L, Scaldaferri F, Terveer EM, Nieuwdorp M, López-Sanromán A, Kupcinkas J, Hart A, Tilg H, Gasbarrini A. International consensus conference on stool banking for faecal microbiota transplantation in clinical practice. *Gut*. 2019 Dec;68(12):2111-2121. doi: 10.1136/gutjnl-2019-319548. Epub 2019 Sep 28. PMID: 31563878; PMCID: PMC6872442.

34: Cammarota G, Putignani L, Gasbarrini A. Gut microbiome beats two to zero host genome. *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2019 Aug;8(4):378-380. doi: 10.21037/hbsn.2019.02.03. PMID: 31489307; PMCID: PMC6700014.

35: Putignani L, Gasbarrini A, Dallapiccola B. Potential of multiomics technology in precision medicine. *Curr Opin Gastroenterol*. 2019 Nov;35(6):491-498. doi: 10.1097/MOG.0000000000000589. PMID: 31464810; PMCID: PMC6818999.

36: Gargiullo L, Del Chierico F, D'Argenio P, Putignani L. Gut Microbiota Modulation for Multidrug-Resistant Organism Decolonization: Present and Future Perspectives. *Front Microbiol*. 2019 Jul 25;10:1704. doi: 10.3389/fmicb.2019.01704. PMID: 31402904; PMCID: PMC6671974.

37: Lo Presti A, Zorzi F, Del Chierico F, Altomare A, Cocca S, Avola A, De Biasio F, Russo A, Cella E, Reddel S, Calabrese E, Biancone L, Monteleone G, Cicala M, Angeletti S, Ciccozzi M, Putignani L, Guarino MPL. Fecal and Mucosal Microbiota Profiling in Irritable Bowel Syndrome and Inflammatory Bowel Disease. *Front Microbiol*. 2019 Jul 17;10:1655. doi: 10.3389/fmicb.2019.01655. PMID: 31379797; PMCID: PMC6650632.

38: Levi Mortera S, Soggiu A, Vernocchi P, Del Chierico F, Piras C, Carsetti R, Marzano V, Britti D, Urbani A, Roncada P, Putignani L. Metaproteomic investigation to assess gut microbiota shaping in newborn mice: A combined taxonomic, functional and quantitative approach. *J Proteomics*. 2019 Jul 15;203:103378. doi: 10.1016/j.jprot.2019.103378. Epub 2019 May 15. PMID: 31102759.

39: Petito V, Graziani C, Lopetuso LR, Fossati M, Battaglia A, Arena V, Scannone D, Quaranta G, Quagliariello A, Del Chierico F, Putignani L, Masucci L, Sanguinetti M, Sgambato A, Gasbarrini A, Scaldaferri F. Anti-tumor necrosis factor α therapy associates to type 17 helper T lymphocytes immunological shift and significant microbial changes in dextran sodium sulphate colitis. *World J Gastroenterol*. 2019 Mar 28;25(12):1465-1477. doi: 10.3748/wjg.v25.i12.1465. PMID: 30948910; PMCID: PMC6441917.

40: Sessa L, Reddel S, Manno E, Quagliariello A, Cotugno N, Del Chierico F, Amodio D, Capponi C, Leone F, Bernardi S, Rossi P, Putignani L, Palma P. Distinct gut microbiota profile in antiretroviral therapy-treated perinatally HIV-infected patients associated with cardiac and inflammatory biomarkers. *AIDS*. 2019 May 1;33(6):1001-1011. doi: 10.1097/QAD.0000000000002131. PMID: 30946154.

41: Reddel S, Del Chierico F, Quagliariello A, Giancristoforo S, Vernocchi P, Russo A, Fiocchi A, Rossi P, Putignani L, El Hachem M. Gut microbiota profile in children affected by atopic dermatitis and evaluation of intestinal persistence of a probiotic mixture. *Sci Rep*. 2019 Mar 21;9(1):4996. doi: 10.1038/s41598-019-41149-6. PMID: 30899033; PMCID: PMC6428866.

42: Reddel S, Putignani L, Del Chierico F. The Impact of Low-FODMAPs, Gluten-Free, and Ketogenic Diets on Gut Microbiota Modulation in Pathological Conditions. *Nutrients*. 2019 Feb 12;11(2):373. doi: 10.3390/nu11020373. PMID: 30759766; PMCID: PMC6413021.

43: van Dijkhuizen EHP, Del Chierico F, Malattia C, Russo A, Pires Marafon D, Ter Haar NM, Magni-Manzoni S, Vastert SJ, Dallapiccola B, Prakken B, Martini A, De Benedetti F, Putignani L; Model Driven Paediatric European Digital Repository Consortium. Microbiome Analytics of the Gut Microbiota in Patients With Juvenile Idiopathic Arthritis: A Longitudinal Observational Cohort Study. *Arthritis Rheumatol*. 2019 Jun;71(6):1000-1010. doi: 10.1002/art.40827. Epub 2019 Apr 29. PMID: 30592383; PMCID: PMC6593809.

44: Nobili V, Mosca A, Alterio T, Cardile S, Putignani L. Fighting Fatty Liver Diseases with Nutritional Interventions, Probiotics, Symbiotics, and Fecal Microbiota Transplantation (FMT). *Adv Exp Med Biol*. 2019;1125:85-100. doi: 10.1007/5584_2018_318. PMID: 30578461.

- 45: Altomare A, Putignani L, Del Chierico F, Cocca S, Angeletti S, Ciccozzi M, Tripiciano C, Dalla Piccola B, Cicala M, Guarino MPL. Gut mucosal-associated microbiota better discloses inflammatory bowel disease differential patterns than faecal microbiota. *Dig Liver Dis.* 2019 May;51(5):648-656. doi: 10.1016/j.dld.2018.11.021. Epub 2018 Dec 3. PMID: 30573380.
- 46: Vernocchi P, Del Chierico F, Russo A, Majo F, Rossitto M, Valerio M, Casadei L, La Storia A, De Filippis F, Rizzo C, Manetti C, Paci P, Ercolini D, Marini F, Fiscarelli EV, Dallapiccola B, Lucidi V, Miccheli A, Putignani L. Gut microbiota signatures in cystic fibrosis: Loss of host CFTR function drives the microbiota enterophenotype. *PLoS One.* 2018 Dec 6;13(12):e0208171. doi: 10.1371/journal.pone.0208171. PMID: 30521551; PMCID: PMC6283533.
- 47: Ponziani FR, Putignani L, Paroni Sterbini F, Petito V, Picca A, Del Chierico F, Reddel S, Calvani R, Marzetti E, Sanguinetti M, Gasbarrini A, Pompili M. Influence of hepatitis C virus eradication with direct-acting antivirals on the gut microbiota in patients with cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2018 Dec;48(11-12):1301-1311. doi: 10.1111/apt.15004. Epub 2018 Oct 22. PMID: 30345704.
- 48: van Dijkhuizen EHP, Aidonopoulos O, Ter Haar NM, Pires Marafon D, Magni-Manzoni S, Ioannidis YE, Putignani L, Vastert SJ, Malattia C, De Benedetti F, Martini A. Prediction of inactive disease in juvenile idiopathic arthritis: a multicentre observational cohort study. *Rheumatology (Oxford).* 2018 Oct1;57(10):1752-1760. doi: 10.1093/rheumatology/key148. PMID: 29931340.
- 49: Del Chierico F, Abbatini F, Russo A, Quagliariello A, Reddel S, Capoccia D, Caccamo R, Ginanni Corradini S, Nobili V, De Peppo F, Dallapiccola B, Leonetti F, Silecchia G, Putignani L. Gut Microbiota Markers in Obese Adolescent and Adult Patients: Age-Dependent Differential Patterns. *Front Microbiol.* 2018 Jun 5;9:1210. doi: 10.3389/fmicb.2018.01210. PMID: 29922272; PMCID: PMC5996250.
- 50: Rosado MM, Aranburu A, Scarsella M, Cascioli S, Giorda E, Del Chierico F, Mortera SL, Mortari EP, Petrini S, Putignani L, Carsetti R. Spleen development is modulated by neonatal gut microbiota. *Immunol Lett.* 2018 Jul;199:1-15. doi: 10.1016/j.imlet.2018.04.010. Epub 2018 Apr 30. PMID: 29715493.
- 51: Del Chierico F, Cardile S, Pietrobbattista A, Liccardo D, Russo A, Candusso M, Basso MS, Grimaldi C, Pansani L, Bernaschi P, Torre G, Putignani L. Liver Transplantation and Gut Microbiota Profiling in a Child Colonized by a Multi-Drug Resistant *Klebsiella pneumoniae*: A New Approach to Move from Antibiotic to "Eubiotic" Control of Microbial Resistance. *Int J Mol Sci.* 2018 Apr 25;19(5):1280. doi: 10.3390/ijms19051280. PMID: 29693574; PMCID: PMC5983657.
- 52: Quagliariello A, Del Chierico F, Russo A, Reddel S, Conte G, Lopetuso LR, Ianaro G, Dallapiccola B, Cardona F, Gasbarrini A, Putignani L. Gut Microbiota Profiling and Gut-Brain Crosstalk in Children Affected by Pediatric Acute-Onset Neuropsychiatric Syndrome and Pediatric Autoimmune Neuropsychiatric Disorders Associated With Streptococcal Infections. *Front Microbiol.* 2018 Apr 6;9:675. doi: 10.3389/fmicb.2018.00675. PMID: 29686658; PMCID: PMC5900790.
- 53: Ponziani FR, Bhoori S, Castelli C, Putignani L, Rivoltini L, Del Chierico F, Sanguinetti M, Morelli D, Paroni Sterbini F, Petito V, Reddel S, Calvani R, Camisaschi C, Picca A, Tuccitto A, Gasbarrini A, Pompili M, Mazzaferro V. Hepatocellular Carcinoma Is Associated With Gut Microbiota Profile and Inflammation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology.* 2019 Jan;69(1):107-120. doi: 10.1002/hep.30036. Epub 2018 Jul 10. PMID: 29665135.
- 54: Nobili V, Putignani L, Mosca A, Del Chierico F, Vernocchi P, Alisi A, Stronati L, Cucchiara S, Toscano M, Drago L. Bifidobacteria and lactobacilli in the gut microbiome of children with non-alcoholic fatty liver disease: which strains act as health players? *Arch Med Sci.* 2018 Jan;14(1):81-87. doi: 10.5114/aoms.2016.62150. Epub 2016 Sep 6. PMID: 29379536; PMCID: PMC5778421.
- 55: Vernocchi P, Del Chierico F, Quagliariello A, Ercolini D, Lucidi V, Putignani L. A Metagenomic and in Silico Functional Prediction of Gut Microbiota Profiles May Concur in Discovering New Cystic Fibrosis Patient-Targeted Probiotics. *Nutrients.* 2017 Dec 9;9(12):1342. doi: 10.3390/nu9121342. PMID: 29232848; PMCID: PMC5748792.

- 56: Marzano V, Mancinelli L, Bracaglia G, Del Chierico F, Vernocchi P, Di Girolamo F, Garrone S, Tchidjou Kuekou H, D'Argenio P, Dallapiccola B, Urbani A, Putignani L. "Omic" investigations of protozoa and worms for a deeper understanding of the human gut "parasitome". *PLoS Negl Trop Dis*. 2017 Nov 2;11(11):e0005916. doi: 10.1371/journal.pntd.0005916. PMID: 29095820; PMCID: PMC5667730.
- 57: Beghini F, Pasolli E, Truong TD, Putignani L, Cacciò SM, Segata N. Large-scale comparative metagenomics of *Blastocystis*, a common member of the human gut microbiome. *ISME J*. 2017 Dec;11(12):2848-2863. doi: 10.1038/ismej.2017.139. Epub 2017 Aug 22. PMID: 28837129; PMCID: PMC5702742.
- 58: Siroli L, Patrignani F, Serrazanetti DI, Vernocchi P, Del Chierico F, Russo A, Torriani S, Putignani L, Gardini F, Lanciotti R. Effect of thyme essential oil and *Lactococcus lactis* CBM21 on the microbiota composition and quality of minimally processed lamb's lettuce. *Food Microbiol*. 2017 Dec;68:61-70. doi: 10.1016/j.fm.2017.06.017. Epub 2017 Jun 27. PMID: 28800826.
- 59: Guarino MP, Cicala M, Putignani L, Severi C. Gastrointestinal neuromuscular apparatus: An underestimated target of gut microbiota. *World J Gastroenterol*. 2016 Dec 7;22(45):9871-9879. doi: 10.3748/wjg.v22.i45.9871. PMID: 28018095; PMCID: PMC5143755.
- 60: Botticelli A, Zizzari I, Mazzuca F, Ascierio PA, Putignani L, Marchetti L, Napoletano C, Nuti M, Marchetti P. Cross-talk between microbiota and immune fitness to steer and control response to anti PD-1/PDL-1 treatment. *Oncotarget*. 2017 Jan 31;8(5):8890-8899. doi: 10.18632/oncotarget.12985. PMID: 27806346; PMCID: PMC5352451.
- 61: Del Chierico F, Di Cave D, Accardi C, Santoro M, Masotti A, D'Alfonso R, Berrilli F, Urbani A, Putignani L. Identification and typing of free-living *Acanthamoeba* spp. by MALDI-TOF MS Biotyper. *Exp Parasitol*. 2016 Nov; 170:82-89. doi: 10.1016/j.exppara.2016.09.007. Epub 2016 Sep 20. PMID: 27663468.
- 62: Levi Mortera S, Del Chierico F, Vernocchi P, Rosado MM, Cavola A, Chierici M, Pieroni L, Urbani A, Carsetti R, Lante I, Dallapiccola B, Putignani L. Monitoring Perinatal Gut Microbiota in Mouse Models by Mass Spectrometry Approaches: Parental Genetic Background and Breastfeeding Effects. *Front Microbiol*. 2016 Sep 26;7:1523. doi: 10.3389/fmicb.2016.01523. PMID: 27725814; PMCID: PMC5036385.
- 63: Vernocchi P, Del Chierico F, Putignani L. Gut Microbiota Profiling: Metabolomics Based Approach to Unravel Compounds Affecting Human Health. *Front Microbiol*. 2016 Jul 26;7:1144. doi: 10.3389/fmicb.2016.01144. PMID: 27507964; PMCID: PMC4960240.
- 64: Putignani L, Alisi A, Nobili V. Pediatric NAFLD: the Future role of Patient-Tailored Probiotics Therapy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2016 Jul;63 Suppl 1:S6-8. doi: 10.1097/MPG.0000000000001220. PMID: 27380600.
- 65: Putignani L, Dallapiccola B. Foodomics as part of the host-microbiota-exposome interplay. *J Proteomics*. 2016 Sep 16;147:3-20. doi: 10.1016/j.jprot.2016.04.033. Epub 2016 Apr 26. PMID: 27130534.
- 66: Del Chierico F, Nobili V, Vernocchi P, Russo A, De Stefanis C, Gnani D, Furlanello C, Zandonà A, Paci P, Capuani G, Dallapiccola B, Micheli A, Alisi A, Putignani L. Gut microbiota profiling of pediatric nonalcoholic fatty liver disease and obese patients unveiled by an integrated meta-omics-based approach. *Hepatology*. 2017 Feb;65(2):451-464. doi: 10.1002/hep.28572. Epub 2016 Jun 2. PMID: 27028797.
- 67: Putignani L, Del Chierico F, Vernocchi P, Cicala M, Cucchiara S, Dallapiccola B; Dysbiotrack Study Group. Gut Microbiota Dysbiosis as Risk and Premorbid Factors of IBD and IBS Along the Childhood-Adulthood Transition. *Inflamm Bowel Dis*. 2016 Feb;22(2):487-504. doi: 10.1097/MIB.0000000000000602. PMID: 26588090.
- 68: Tabanelli G, Vernocchi P, Patrignani F, Del Chierico F, Putignani L, Vinderola G, Reinheimer JA, Gardini F, Lanciotti R. Effects of sub-lethal high-pressure homogenization treatment on the outermost cellular structures and the volatile-molecule profiles of two strains of probiotic lactobacilli. *Front Microbiol*. 2015 Sep 23;6:1006. doi: 10.3389/fmicb.2015.01006. PMID: 26441931; PMCID: PMC4585067.

- 69: Del Chierico F, Vernocchi P, Petrucca A, Paci P, Fuentes S, Praticò G, Capuani G, Masotti A, Reddel S, Russo A, Vallone C, Salvatori G, Buffone E, Signore F, Rigon G, Dotta A, Miccheli A, de Vos WM, Dallapiccola B, Putignani L. Phylogenetic and Metabolic Tracking of Gut Microbiota during Perinatal Development. *PLoS One*. 2015 Sep 2;10(9):e0137347. doi: 10.1371/journal.pone.0137347. PMID: 26332837; PMCID: PMC4557834.
- 70: Vernocchi P, Del Chierico F, Fiocchi AG, El Hachem M, Dallapiccola B, Rossi P, Putignani L. Understanding probiotics' role in allergic children: the clue of gut microbiota profiling. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2015 Oct;15(5):495-503. doi: 10.1097/ACI.0000000000000203. PMID: 26258924.
- 71: Muraca M, Putignani L, Fierabracci A, Teti A, Perilongo G. Gut microbiota-derived outer membrane vesicles: under-recognized major players in health and disease? *Discov Med*. 2015 May;19(106):343-8. PMID: 26105697.
- 72: Miccheli A, Capuani G, Marini F, Tomassini A, Praticò G, Ceccarelli S, Gnani D, Baviera G, Alisi A, Putignani L, Nobili V. Urinary (1)H-NMR-based metabolic profiling of children with NAFLD undergoing VSL#3 treatment. *Int J Obes (Lond)*. 2015 Jul;39(7):1118-25. doi: 10.1038/ijo.2015.40. Epub 2015 Mar 26. PMID: 25809828.
- 73: Del Chierico F, Ancora M, Marcacci M, Cammà C, Putignani L, Conti S. Choice of next-generation sequencing pipelines. *Methods Mol Biol*. 2015;1231:31-47. doi: 10.1007/978-1-4939-1720-4_3. PMID: 25343857.
- 74: Del Chierico F, Vernocchi P, Dallapiccola B, Putignani L. Mediterranean diet and health: food effects on gut microbiota and disease control. *Int J Mol Sci*. 2014 Jul 1;15(7):11678-99. doi: 10.3390/ijms150711678. PMID: 24987952; PMCID: PMC4139807.
- 75: Putignani L, Del Chierico F, Petrucca A, Vernocchi P, Dallapiccola B. The human gut microbiota: a dynamic interplay with the host from birth to senescence settled during childhood. *Pediatr Res*. 2014 Jul;76(1):2-10. doi: 10.1038/pr.2014.49. Epub 2014 Apr 14. PMID: 24732106.
- 76: Del Chierico F, Petrucca A, Mortera SL, Vernocchi P, Rosado MM, Pieroni L, Carsetti R, Urbani A, Putignani L. A metaproteomic pipeline to identify newborn mouse gut phylotypes. *J Proteomics*. 2014 Jan 31;97:17-26. doi: 10.1016/j.jprot.2013.10.025. Epub 2013 Oct 29. PMID: 24176786.
- 77: Del Chierico F, Petrucca A, Vernocchi P, Bracaglia G, Fiscarelli E, Bernaschi P, Muraca M, Urbani A, Putignani L. Proteomics boosts translational and clinical microbiology. *J Proteomics*. 2014 Jan 31;97:69-87. doi: 10.1016/j.jprot.2013.10.013. Epub 2013 Oct 19. PMID: 24145144.
- 78: Di Girolamo F, Del Chierico F, Caenaro G, Lante I, Muraca M, Putignani L. Human serum proteome analysis: new source of markers in metabolic disorders. *Biomark Med*. 2012 Dec;6(6):759-73. doi: 10.2217/bmm.12.92. PMID: 23227840.
- 79: Putignani L. Human gut microbiota: onset and shaping through life stages and perturbations. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012 Nov 23;2:144. doi: 10.3389/fcimb.2012.00144. PMID: 23189272; PMCID: PMC3505007.
- 80: Vallone C, Rigon G, Lucantoni V, Putignani L, Signore F. Pregnancy in HIV-positive patients: effects on vaginal flora. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2012; 2012:287849. doi: 10.1155/2012/287849. Epub 2012 May 17. PMID: 22675241; PMCID: PMC3362838.
- 81: Del Chierico F, Vernocchi P, Bonizzi L, Carsetti R, Castellazzi AM, Dallapiccola B, de Vos W, Guerzoni ME, Manco M, Marseglia GL, Muraca M, Roncada P, Salvatori G, Signore F, Urbani A, Putignani L. Early-life gut microbiota under physiological and pathological conditions: the central role of combined meta-omics-based approaches. *J Proteomics*. 2012 Aug 3;75(15):4580-7. doi: 10.1016/j.jprot.2012.02.018. Epub 2012 Feb 23. PMID: 22387117.