

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

Dottorato di Ricerca in Scienze della Nutrizione - XXX Ciclo



CORRELAZIONE TRA CELLULARITA' NASALE

E TIPO DI ALIMENTAZIONE LATTEA

NEL NEONATO E NEL BAMBINO NEL PRIMO ANNO DI VITA

Coordinatore: Chir.mo Prof. Luciano Pinotti

PhD Tutor: Dott.ssa Elvira Verduci

Tesi di Dottorato di Ricerca di:

Dott. Samuele Palazzo

Matricola n.: R 10984

Anno Accademico 2016 – 2017

INDICE

1. INTRODUZIONE: IL RAZIONALE DELLO STUDIO	pag. 6
2. LA CITOLOGIA NASALE: CENNI SOTTRICI ED APPLICAZIONE	pag. 10
2.1. LA MUCOSA NASALE: CARATTERISTICHE FISIOLOGICHE	pag. 12
2.2. LA MUCOSA NASALE: LE CELLULE INFIAMMATORIE	pag. 16
3. IL LATTE MATERNO	pag. 19
3.1. I COMPONENTI	pag. 19
3.2. GLI EFFETTI SULLA SALUTE	pag. 27
4. ALLATTAMENTO AL SENO E VIE AEREE	pag. 34
5. SCOPO DELLO STUDIO	pag. 39
6. MATERIALI E METODI	pag. 40
6.1. LA POPOLAZIONE DELLO STUDIO: i criteri di arruolamento	pag. 40
6.2. LA RACCOLTA DATI E LA CITOLOGIA NASALE	pag. 42
6.3. L'ANALISI STATISTICA	pag. 46
7. RISULTATI	pag. 47
7.1. DATI FASE I: anamnesi e periodo neonatale	pag. 47

7.2. DATI FASE I: la citologia nasale	pag. 51
7.3. DATI FASE II: anamnesi	pag. 54
7.4. DATI FASE II: la citologia nasale e confronto	pag. 56
7.5. TIPOLOGIA DI ALIMENTAZIONE LATTEA	pag. 61
7.6. CITOLOGIA NASALE E ALIMENTAZIONE LATTEA	pag. 63
8. DISCUSSIONE	pag. 66
9. CONCLUSIONI	pag. 71
10. BIBLIOGRAFIA	pag. 73

1. INTRODUZIONE: IL RAZIONALE DELLO STUDIO

Il latte materno, da anni nella Letteratura Internazionale ha assunto un ruolo cardine: grazie ai suoi componenti costituisce infatti un “sistema biologico” che non soltanto si associa a migliori parametri di crescita ma anche nell’ambito dello sviluppo e della completezza e maturazione del sistema immunologico del bambino, fornisce un apporto fondamentale [1].

Fin dalle prime ore dopo la nascita il latte materno esercita la propria valenza anti-infettiva garantendo al neonato una prima immunizzazione passiva con alcuni componenti fondamentali:

- il colostro, infatti, è estremamente ricco di cellule immunitarie e di proteine funzionali quali le IgA secretorie, la lattoferrina, il lisozima.

Le immunoglobuline specifiche (IgA secretorie) per antigeni gastroenterici e respiratori, giunti alla ghiandola mammaria attraverso le vie linfatiche enteromammaria e broncomammaria, sono presenti in maggior misura nel colostro (< 12g/l), ma anche nel latte maturo (<1 g/l); la lattoferrina invece indebolisce la membrana di molti batteri sia Gram + che Gram –, rendendoli più suscettibili alla funzione antimicrobica del lisozima.

- gli oligosaccaridi, glicoproteine, e glicolipidi con azione prebiotica, non essendo assorbiti dalla mucosa intestinale, proteggono dalla colonizzazione e dall’invasione di microrganismi patogeni, la flora bifidogena.
- fattori antisecretori ed antinfiammatori proteggono dall’azione di alcune enterotossine batteriche.

- l'alfa-lattoalbumina in vitro sembra avere proprietà protettive nei confronti della replicazione di cellule tumorali quali il papilloma o alcune leucemie ed altre linee cellulari [1].

La Letteratura Scientifica, con i limiti etici dovuti, si è quindi spostata negli anni nell'analizzare come questi precoci aspetti protettivi possano influenzare lo sviluppo del bambino e della sua salute.

Così come un precoce allattamento al seno a partire dalla prima ora di vita è correlato ad outcome importanti come una diminuzione del tasso di mortalità e delle infezioni neonatali (una su tutti il rischio diminuito e l'effetto protettivo sullo sviluppo dell'enterocolite necrotizzante), sembra che il latte materno possa avere effetti positivi sull'incidenza di problematiche che interessano il tratto gastrointestinale, l'apparato respiratorio e quello urinario con evidenze che questi effetti possano essere precoci ma anche con ripercussioni nelle future epoche della vita [1-39-40-41-42].

In particolare per quanto concerne l'apparato respiratorio parecchi studi in Letteratura suggeriscono l'effetto positivo dell'associazione tra l'allattamento al seno e la diminuita incidenza di patologie infettive delle alte vie aeree: allattamento al seno ed in particolare durata dell'allattamento al seno sono inversamente proporzionali a rischio di otiti, polmoniti ed ospedalizzazione per infezione delle vie aeree inferiori. Gli Studi mostrano infatti che una storia di allattamento al seno per più di tre mesi sia associata ad un rischio di sviluppare otite ridotto del 23-50% ed il rischio di ospedalizzazione per infezione delle basse vie respiratorie nel primo anno di vita sia ridotto del 73% nei bambini allattati esclusivamente al seno per più di quattro mesi. Inoltre in caso di bronchiolite da virus respiratorio sinciziale (RSV), il

quadro clinico nei bambini allattati esclusivamente al seno è meno grave, con una minor durata dell'ospedalizzazione e una minor necessità di ossigenoterapia [32-33-35-42].

Negli anni si sono studiate le possibili correlazioni tra effetti immunomodulatori dei componenti bioattivi del latte materno ed i meccanismi d'azione, in particolare analizzando l'allattamento al seno e la flora intestinale fino al microbioma [48-49-51].

Il passo successivo è stato analizzare anche le diversità nel microbiota della mucosa nasale dei lattanti allattati al seno e non, e correlarla con rischi aumentati di patologie respiratorie, così come era stato in precedenza fatto per le patologie del tratto gastrointestinale. Anche in questo caso è emerso come l'incidenza e severità delle infezioni delle vie aeree nel bambino, specie nel più piccolo, come mostra lo studio recente di Biesbroek et al., abbia correlazioni statisticamente significative con le variazioni nella colonizzazione delle vie aeree dei lattanti anche in rapporto forse al tipo di allattamento proprio come osservato per il microbiota intestinale [47]. Quindi anche a livello del nasofaringe, il microbiota, modificato dall'assunzione del latte materno, potrebbe perciò agire come prima linea di difesa contro l'acquisizione, la crescita e l'invasione di agenti patogeni influenzando pertanto la suscettibilità alle infezioni.

Ecco l'importanza di una metodica nuova e quanto mai utilizzabile in ambiente pediatrico come lo studio della cellularità nasale grazie alla citologia nasale, uno strumento diagnostico già molto utilizzato per la valutazione di patologie nasali allergiche e non. Il razionale della citologia nasale si basa sulla conoscenza del quadro di normalità del rinocitogramma dell'individuo sano in cui appaiono

solamente quattro citotipi (cellule ciliate, cellule caliciformi mucipare, cellule striate e cellule basali). In caso di patologia possono essere rilevate cellule di tipo infiammatorio tra cui eosinofili, mastociti, neutrofilo ed elementi di carattere patogeno come batteri, spore ed ife micotiche [2].

In questo contesto e sulla base di tali premesse, questo studio è volto a valutare e descrivere il quadro basale della cellularità nasale del neonato, ambito di applicazione della citologia nasale ancora poco conosciuto e riportato nella Letteratura Scientifica, ed inoltre valutare l'esistenza di una relazione tra una storia di allattamento al seno e il riscontro di un rinocitogramma specifico e caratteristico dal neonato al bambino nel primo anno di vita: cioè se anche a livello del nasofaringe, il microbiota, modificato dall'assunzione del latte materno, potrebbe agire come prima linea di difesa contro l'acquisizione, la crescita e l'invasione di agenti patogeni influenzando pertanto la suscettibilità alle infezioni.

2. LA CITOLOGIA NASALE: CENNI SOTIRICI ED APPLICAZIONE

Lo studio della citologia nasale negli ultimi anni ha portato sempre più consapevolezza sull'importanza di conoscere la normale morfologia e presenza delle cellule nel rinocitogramma per poter distinguere, diagnosticare e seguire nel tempo con accorgimenti terapeutici diversi, le diverse forme di patologie infiammatorie delle prime vie aeree: tutto questo anche nelle età pediatrica [2-3].

Già nel 1889 Gollash introdusse lo studio della cellularità nasale evidenziando come nei pazienti asmatici ci fosse una percentuale rilevante rispetto ai sani, di cellule eosinofile, stando già a dimostrare un processo eziopatogenitico alla base. Nel 1927 Eyrmann dimostrò sulla stessa linea di condotta, la presenza e la causa eziologica della eosinofilia nel rinocitogramma dei pazienti allergici ponendo le basi per la futura ricerca nel campo.

Per quanto concerne gli studi in ambiente pediatrico nel 1988 Sala et al. descrisse come nei bambini affetti da rinite cronica, le cellule ciliate lasciassero lo spazio alle goblet cells (cellule mucipare), mentre nel 2007 un ulteriore e più recente studio mise in luce come la citologia nasale sia utile ed applicabile nella popolazione pediatrica per arrivare alla più attuale applicazione come il monitoraggio dell'efficacia della terapia desensibilizzante per aero-allergeni [4-5-11-12].

Tale metodica si sta notevolmente espandendo, tanto da essere ormai diventata un pilastro dell'indagine rinologica anche pediatrica offrendo la possibilità di una valida diagnosi differenziale tra le diverse forme di riniti, in modo particolare per riniti

infettive, riniti allergiche e riniti non-allergiche con componente eosinofila (Nares), neutrofila (Narne), mastocitaria (Narma) o eosinofila-neutrofila (Naresma) [3].

L'accresciuta importanza di questo strumento diagnostico non è da ricercare solo nella elevata sensibilità e specificità che offre, ma anche nella sua facilità di esecuzione, non invasività e ripetibilità e nel suo basso costo [2-3].

Il rinocitogramma dell'individuo sano evidenzia un epitelio pseudo stratificato ciliato con quattro citotipi, rappresentati da cellule ciliate, cellule caliciformi mucipare, cellule striate e cellule basali, a cui talvolta può associarsi la presenza di qualche raro neutrofilo. In caso di patologia possono essere rilevate cellule di tipo infiammatorio tra cui principalmente, eosinofili, mastociti, neutrofilo ed elementi di carattere patogeno come batteri, spore ed ife micotiche [2].

2.1 LA MUCOSA NASALE: LE CARATTERISTICHE FISIOLOGICHE

Come detto in precedenza le fosse nasali sono rivestite da mucosa liscia, di colorito roseo e sono caratterizzate dalla presenza di un epitelio di rivestimento, che poggia su una membrana basale sottile che lo separa dalla tonaca propria. L'epitelio di rivestimento, tranne quello con funzione olfattiva, è di tipo prismatico pseudostratificato ciliato ed è composto da cellule ciliate, cellule non ciliate (definite anche cellule "con orletto a spazzola" o "striate"), cellule caliciformi mucipare (denominate anche "goblet cell") e cellule basali.

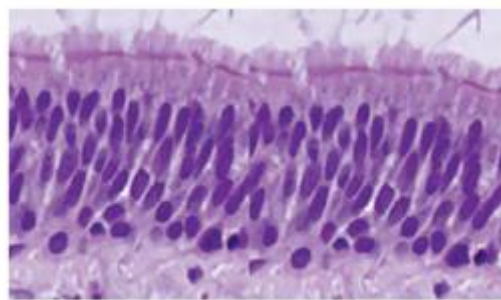


Fig. 1. Mucosa nasale. Epitelio pseudostratificato ciliato. Colorazione MGG - 400X.

Figura 1: Epitelio pseudostratificato ciliato. "La citologia nasale nell'approccio diagnostico-terapeutico delle riniti vasomotorie in età pediatrica". RIAIP 2011; 05: 28,34

Il rapporto nella presenza delle diverse forme cellulari varia con il proseguire verso la parte distale-terminale delle vie aeree: rimane comunque valido il concetto per cui le cellule linfocitarie o neutrofile siano poche e rare in condizioni fisiologiche. La lamina propria è invece costituita da un connettivo lasso nella sua parte superficiale e più denso nella sua parte profonda, che aderisce al periostio e al pericondrio.

Questi strati cellulari hanno come finalità quella di costituire una barriera non solo fisica ma anche immunologica nei confronti di agenti irritanti ambientali, siano essi di origine chimica, fisica o infettiva con la produzione di una varietà di sostanze inibitrici tra cui le proteasi e la componente secretoria delle IgA.

Nello specifico, andando ad analizzare la tipologia di cellule presenti:

- **CELLULA CILIATA:** costituisce circa l'80% della superficie della mucosa nasale. Il rapporto numerico tra le cellule ciliate e le cellule caliciformi mucipare è di 5:1 e aumenta andando verso i tratti distali delle vie aeree inferiori, dove può raggiungere un picco di 100-200:1. Microscopicamente si caratterizza per una forma poligonale allungata, con un nucleo disposto a varia altezza rispetto alla membrana basale (determinando l'aspetto pseudostratificato), l'adesione a tale membrana è garantita dalla presenza di una importante molecola di adesione denominata laminina. A livello della superficie apicale sono visibili in microscopia ottica circa 100-250 ciglia di altezza variabile e numerosi microvilli. Particolarità non solo morfologica ma probabilmente funzionale di questa cellula che, grazie alla classica colorazione May-Grünwald-Giemsa (MGG) appare evidente, è la presenza subito al di sopra del nucleo, di una stria disposta perpendicolarmente all'asse maggiore della cellula, denominata Stria Ipercromatica Sovranucleare (SIS): essa rappresenta un marker diagnostico e un importante indicatore di efficacia terapeutica nel corso di trattamenti topici o sistemici [6].

Va sottolineato come nel corso di infezioni respiratorie, il rapporto cellule ciliate/cellule mucipare cambia a favore delle cellule mucipare (definito metaplasia mucipara), le quali si rendono responsabili della secrezione di

abbondanti quantità di muco e del conseguente ristagno catarrale endonasale, fra i principali fattori predisponenti lo sviluppo di infezioni batteriche [6-7-10].



Fig. 2. Cellula ciliata. Colorazione MGG – 2000X.

Figura 2: Cellula ciliata. “La citologia nasale nell’approccio diagnostico-terapeutico delle riniti vasomotorie in età pediatrica”. RIAIP 2011; 05: 28,34

- **CELLULA CALICIFORME MUCIPARA:** pur costituendo circa l’1% del totale delle cellule presenti nella mucosa di tipo respiratorio la sua funzione è rilevante: la detersione delle vie aeree. Si tratta di una ghiandola unicellulare interposta tra le cellule dell’epitelio pseudostratificato. Microscopicamente sono caratterizzate dalla presenza di numerosi microvilli di dimensione variabile, a seconda dello stato di secrezione cellulare, e da un nucleo sempre disposto in posizione basale poiché spinto in basso dai vacuoli contenenti mucina, una proteina polisaccaridica che a contatto con l’acqua forma il muco. Questa struttura interna conferisce alla cellula la caratteristica forma a calice, dal quale deriva il nome di cellula caliciforme.
- **CELLULA STRIATA:** presente in minor misura rispetto alle precedenti linee cellulari, la funzione delle cellule striate non è ancora stata definita, probabilmente sono cellule ad attività chemo-recettoriale o progenitrici delle

cellule ciliate. Alla microscopia ottica si presentano come cellule colonnari con un nucleo spostato verso il polo inferiore; l'aspetto striato appare giustificato da microfilamenti che decorrono all'interno del citoplasma.

- **CELLULA BASALE:** a lungo considerate le progenitrici delle cellule caliciformi mucipare e delle cellule ciliate, aderiscono alla membrana basale senza raggiungere la posizione superficiale. La vera funzione fisiologica sembra essere quella di favorire l'adesione delle cellule colonnari alla membrana basale; questa ipotesi è sostenuta dal fatto che le cellule colonnari non presentano sistemi emidesmosomiali e si uniscono alla membrana basale grazie agli emidesmosomi espressi alla base delle cellule basali [7-8-9].

2.2 LA MUCOSA NASALE: LE CELLULE INFIAMMATORIE

Durante i processi infiammatori le cellule che caratteristico la risposta nella mucosa nasale sono: i granulociti neutrofili, i granulociti eosinofili, i mastociti, i linfociti, le plasmacellule ed i macrofagi [10].

- **GRANULOCITO NEUTROFILO:** i neutrofili sono normalmente presenti in numero limitato come detto in precedenza nell'esame citologico nasale, mentre un aumento si osserva nelle forme di rinite allergica e nei quadri di rinite stagionale, e ancor più nelle forme perenni. Microscopicamente è una cellula di forma tondeggiante che si riconosce per la presenza di un nucleo suddiviso in 2-5 lobi, collegati fra loro con un sottile filamento di materiale nucleare. Il numero dei lobi varia rispetto all'età del granulocito: nei granulociti neutrofili immaturi il nucleo ha un aspetto caratteristico a ferro di cavallo; nei granulociti giovani appare allungato e ripiegato su sé stesso, definito profilo reniforme; quelli più maturi presentano lobi connessi da esili ponti. La fagocitosi è la principale funzione di questa cellula ed è garantita da una serie di enzimi con azione antibatterica (es. lisozima, fagocitina, ecc.). Di solito appaiono di colore azzurrognolo.
- **GRANULOCITO EOSINOFILO:** gli eosinofili sono associati di solito a processi allergici o a infezioni di tipo parassitario. Microscopicamente caratterizzati da citoplasma contenente granuli che legano fortemente l'eosina, conferendo a queste cellule tipico colore rosso-viola. Hanno forma tondeggiante, il nucleo, privo di neucleolo, è diviso in due-tre lobi legati fra loro da un sottile filo di cromatina. Al loro interno granulazioni intra-citoplasmatiche contenenti sostanze

specifiche che, in particolar modo nei soggetti sensibili ai pollini, possono presentarsi in fase di degranolazione parziale o totale e questo rende la loro presenza particolarmente utile nel processo diagnostico terapeutico delle riniti.

- **MASTOCITO:** cellule circolanti che invadono i tessuti solo durante gli eventi infiammatori. Microscopicamente nel citoplasma di queste cellule sono presenti numerosissimi granuli che si colorano metacromaticamente con i coloranti basici, come il Blu di Toluidina. I mastociti e i basofili sono caratterizzati dalla presenza di recettori ad alta affinità per le IgE a livello della membrana cellulare, i quali dopo una prima esposizione all'antigene rimangono sulla superficie dei mastociti. Si ritiene che queste cellule siano responsabili sia degli eventi iniziali della risposta allergica, cui partecipano numerose sostanze come istamina, triptasi, PGD2 e LTC4, che dell'instaurarsi di una flogosi cronica su base allergica caratterizzata dall'importante degranolazione mastocitaria.
- **I LINFOCITI:** componente fondamentale nella risposta immunitaria cellulo-mediata e umorale. Nella citologia nasale emergono in corso di flogosi croniche ma, spesso, sono presenti anche nelle flogosi allergiche. Dal punto di vista funzionale si possono distinguere linfociti T, linfociti B e linfociti non T-non B (anche detti Null); dal punto di vista morfologico, possiamo invece considerare piccoli linfociti, grandi linfociti e linfociti attivati. Microscopicamente i piccoli linfociti hanno nucleo rotondo, che assume tonalità violacea ed una sottile rima di citoplasma, con colorazione tendente al blu-azzurro; sono cellule in fase di quiescenza, pronte ad attivarsi in seguito a stimolazione del sistema immunitario.
- **PLASMACELLULA:** cellule microscopicamente dalle grandi dimensioni e dalla forma arrotondata, con margini leggermente irregolari. Il citoplasma presenta

un'intensa basofilia, assumendo un colore blu intenso; il nucleo, di forma ovalare, presenta un aspetto caratteristico della cromatina, descritta "a guscio di tartaruga" o "a ruota", dovuto al fatto che i cromocentri si dispongono in grosse zolle dal contorno poligonale.

- **MACROFAGO:** derivante dal monocito si attiva a livello tissutale in risposta ad uno stimolo infiammatorio. Microscopicamente: cellule dalla forma tondeggiante e nucleo con caratteristico aspetto reniforme, con all'interno del citoplasma vacuoli digestivi contenenti materiale fagocitato.

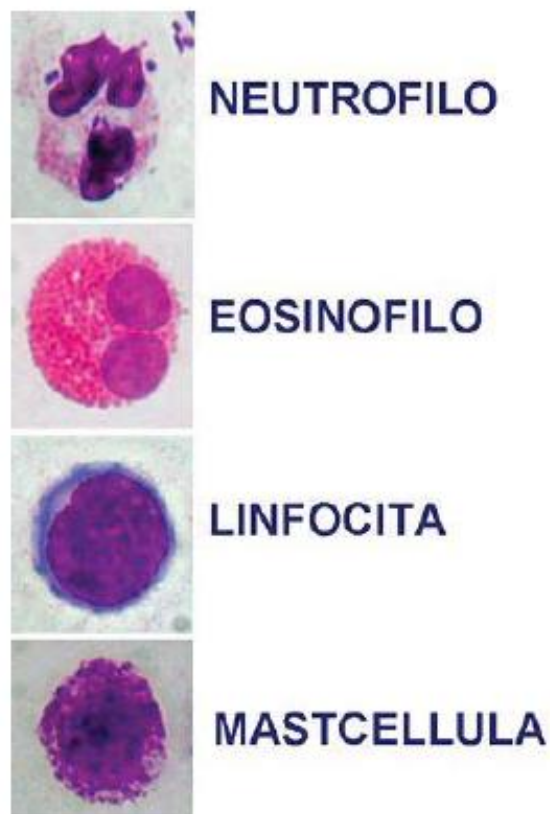


Fig. 4. Cellule della immunoflogosi. Colorazione MGG.

Figura 3: Cellule della immunoflogosi. "La citologia nasale nell'approccio diagnostico-terapeutico delle riniti vasomotorie in età pediatrica". RIAIP 2011; 05: 28,34

3. IL LATTE MATERNO

3.1 I COMPONENTI

Il latte materno è un sistema biologico costituente la normale nutrizione del neonato e del lattante. Contiene al suo interno centinaia di molecole bioattive con funzione immunologica ed anti-infiammatoria, nonché i normali macro e micronutrienti responsabili della crescita e dello sviluppo e salute del piccolo individuo [13-14]. Il latte materno è secreto dalla ghiandola mammaria e cambia la sua composizione nel corso dell'allattamento e in ciascun individuo. I cambiamenti nella concentrazione dei vari costituenti sono più rapidi e numericamente più significativi nelle prime settimane dopo il parto.

Il latte prodotto nei primi giorni di vita è il colostro, è più ricco di proteine, lattoferrina, leucociti, vitamine A, B12 e K e immunoglobuline rispetto al latte maturo, ma ha un minor contenuto di grassi e un minor apporto calorico. Per quanto concerne i microelementi alti livelli di sodio, cloro e magnesio e bassi livelli di potassio e calcio caratterizzano il colostro rispetto al latte di transizione. Con l'avvento della montata latte, il latte si può definire maturo ed è caratterizzato da un elevato contenuto di grassi. Lo stato nutrizionale della madre influenza solo relativamente la composizione del latte; la concentrazione delle vitamine sembra essere l'unica significativamente correlata all'apporto vitaminico materno [15-16]. L'alimentazione materna può avere un'influenza molto significativa sulla produzione e la composizione del latte solo quando la mamma è gravemente malnutrita [13-14].

L'apporto calorico è stimato intorno a 65-70 Kcal/dl ed analizzando i vari macro e micronutrienti:

- **PROTEINE:** la concentrazione di proteine è massima nel colostro: 2 g/dl. Sono presenti soprattutto in forma di immunoglobuline secretorie A (IgA), che non vengono assorbite dall'intestino e perciò non hanno valore nutrizionale. Il latte materno maturo contiene 1,2 g/dl di proteine: 75% (0.9 g/dl) composti di azoto proteico, 25% composti di azoto non proteico. La parte proteica vera è costituita da caseina e sieroproteine con un rapporto caseina:sieroproteine di 40:60 [13-17-18].

La caseina è una proteina a potere nutritivo, mantiene il calcio in forma solubile favorendone l'assorbimento da parte delle cellule intestinali. Nel latte materno sono contenute la beta caseina e la k caseina, mentre è assente la alfa caseina, proteina allergizzante presente nel latte vaccino. Le sieroproteine sono proteine non strutturali con effetto funzionale: la alfa-lattoalbumina, le IgA secretorie e la lattoferrina. Quest'ultima favorisce l'assorbimento del ferro e compete per lo ione ferrico con i batteri enteropatogeni esercitando un potere antimicrobico lungo tutto il tratto intestinale [21]. I composti non azotati nel latte materno essi sono presenti durante tutto l'allattamento: aminoacidi liberi, creatinina, acidi nucleici, nucleotidi, urea, acido urico, ormoni. Vanno inoltre ricordati per rilevanza:

- il triptofano (aminoacido essenziale nel neonato) e i suoi metaboliti, serotonina e melatonina, fondamentali per un ottimale sviluppo cerebrale e un corretto sviluppo dei sistemi di regolazione dei bioritmi di fame-sazietà e sonno-veglia. Grazie all'elevata concentrazione di triptofano nel latte materno

rispetto agli altri aminoacidi neutri, il trasporto del triptofano stesso attraverso la barriera ematoencefalica, è ottimale.

- i nucleotidi e i metaboliti ad essi correlati svolgono un ruolo chiave in numerosi processi biologici costituendo i precursori per la sintesi degli acidi nucleici. Sono composti intracellulari di basso peso molecolare e rappresentano l'1% dell'azoto non proteico del latte materno. I nucleotidi migliorano la funzionalità della mucosa gastrointestinale favorendo un aumentato assorbimento di ferro e la colonizzazione intestinale da parte dei Bifidobatteri. Favoriscono inoltre lo sviluppo del sistema immunitario [19]
- la glutamina è un aminoacido non essenziale. È coinvolta nei processi digestivi, nel metabolismo del sistema nervoso e incrementa il potere battericida dei neutrofili.
- la taurina è un aminoacido non essenziale nell'adulto, ma il neonato ha scarse capacità di sintetizzarlo; è coinvolta nell'assorbimento intestinale di lipidi, essendo un componente strutturale dei sali biliari. Anche nel sistema nervoso si trovano elevate concentrazioni di taurina e un suo deficit sembra causare difetti visivi [20].
- **CARBOIDRATI:** il lattosio è il carboidrato più rappresentato nel latte materno: circa 6,8 g/dl. È il macronutriente con meno variabilità nella composizione del latte materno, ma alti livelli si sono riscontrati parallelamente a più elevate produzioni di latte. Anche gli oligosaccaridi rappresentano, però, una quota rilevante con 1-2 g/dl; non sono digeribili e quindi sono privi di funzioni nutritive, ma con un importante ruolo difensivo [14]. La normale microflora umana è costituita da un complesso ecosistema,

in parte dipendente dai nutrienti introdotti con la dieta: nel neonato a termine allattato al seno i Bifidobatteri predominano su batteri potenzialmente patogeni. Gli oligosaccaridi e i glico-coniugati, agendo come omologhi recettoriali, prevengono l'adesione alla mucosa intestinale di enteropatogeni. Il lattulosio e alcuni componenti contenenti fruttosio e galattosio agiscono come prebiotici. Un prebiotico è definito come un nutriente non digeribile che apporta beneficio nell'ospite stimolando selettivamente la crescita o l'attività di una specie batterica già presente nel microbiota intestinale. Le molecole non idrolizzate dagli enzimi del tratto intestinale superiore, infatti, raggiungono intatte il grosso intestino e agiscono inibendo l'adesione dei batteri patogeni e delle tossine all'epitelio intestinale [22-23].

- **LIPIDI:** il 98 % dei lipidi del latte materno è rappresentato dai trigliceridi, fonti di energia, mentre l'1-2 % rimanente è costituito dagli acidi grassi liberi. I predominanti sono l'acido palmitico, acido grasso saturo a 16 molecole di carbonio e l'acido oleico. L'acido palmitico si trova preferibilmente nella configurazione stereoisomerica 2 del trigliceride, inducendo una minor saponificazione del calcio a livello intestinale, favorendone l'assorbimento. I grassi sono la principale fonte di energia nel latte materno, forniscono il 50 % dell'apporto calorico. Il contenuto lipidico totale è molto variabile sia nel corso dell'allattamento sia durante ciascuna singola poppata; esso aumenta durante la poppata progressivamente da 3 g/dl a 5 g/dl [24] e sembra essere minore nella notte e nella mattina rispetto al resto del giorno [13]. La velocità con cui aumenta la concentrazione di grassi in ciascun pasto dipende dalla durata del pasto precedente. Tanto più è rapido lo svuotamento del seno, tanto

più veloce è l'incremento lipidico. Un elevato apporto lipidico, infatti, stimola il senso di sazietà e induce la fine della poppata; un volume di latte maggiore è associato a un basso contenuto lipidico. La concentrazione di grassi nel latte è maggiore nelle donne che hanno avuto un elevato incremento ponderale in gravidanza. Quando una donna ha un bilancio energetico equilibrato, il 30 % degli acidi grassi presenti nel latte derivano direttamente dalla dieta, circa il 60 % deriva dalla sintesi e dai depositi adiposi della mamma. In una dieta a basso contenuto lipidico aumenta la sintesi di acidi grassi endogeni a catena media. All'aumento dei lipidi nel latte materno corrisponde la diminuzione del contenuto lipidico totale nel plasma della mamma. L'alimentazione materna influenza non solo la quantità di lipidi nel latte, ma anche la qualità: il latte delle donne vegetariane contiene acidi grassi essenziali a 18 molecole di carbonio in quantità cinque volte maggiori dello standard.

- Gli acidi grassi polinsaturi a lunga catena, Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids (LC-PUFA), includono l'acido eicosapentaenoico (EPA, 20Cn3), l'acido arachidonico (AA, 20:4n-6) e l'acido docosaesaenoico (DHA, 22:6n-3). Essi derivano rispettivamente dagli acidi grassi essenziali, acido alfa-linolenico e acido linoleico. Gli LC-PUFA non sono essenziali nella dieta dell'adulto, ma il neonato non riesce a sintetizzarli dai loro precursori con sufficiente velocità, in considerazione dell'elevata richiesta della prima fase di sviluppo [25]. Gli LC-PUFA sono infatti implicati in numerosi processi dello sviluppo cerebrale e nella formazione delle strutture neuronali: l'AA è un fattore di crescita; precursore delle prostaglandine (prostacicline e trombassani) coinvolte nei processi infiammatori e in molte funzioni

fisiologiche tra cui la protezione della mucosa gastrica e il DHA è un componente fondamentale delle membrane cellulari fosfolipidiche. Modula l'eccitabilità neuronale riducendo l'azione inibitoria dell'acido gamma-aminobutirrico (GABA), garantisce la plasticità sinaptica permettendo una maggiore velocità di trasmissione dei segnali e conferisce alle membrane fluidità e flessibilità influenzando lo sviluppo del tessuto nervoso nelle prime fasi della vita [26]. Il quantitativo assoluto di AA e DHA nel latte materno non cambia nei dodici mesi di allattamento; nelle donne che assumono una dieta libera e varia le concentrazioni si attestano a 10-15 mg/dl per l'AA ed a 5-7 mg/dl per il DHA.

- **MICRONUTRIENTI: VITAMINE E MINERALI:** il contenuto vitaminico del latte materno dipende da diversi fattori, il più importante dei quali è l'apporto vitaminico materno ed il suo stato nutrizionale.

Vitamina A: valore medio 212 UI/dl di vitamina A, fortemente correlato allo stato nutrizionale materno. Interviene nello sviluppo del sistema visivo, della barriera cutanea ed infine del corretto sviluppo dell'apparato locomotore.

Vitamina D: valore medio 3 UI/dl, anche in questo caso dipendente dallo stato vitaminico materno; i livelli plasmatici materni di vitamina D possono diminuire fino a concentrazioni criticamente basse da limitarne il trasferimento nel latte. Vista la nota importanza per lo sviluppo di una adeguata mineralizzazione ossea è raccomandata la supplementazione di vitamina D fino al primo anno di vita [27].

Vitamina B6: il latte materno di madri con un corretto apporto nutrizionale ha un contenuto di vitamina B6 sufficiente e costante per i primi 4-6 mesi di

allattamento. Un significativo deficit di vitamina B6 può essere responsabile di scarso accrescimento o di ritardo nello sviluppo neuro cognitivo [28].

Vitamina K: la concentrazione di vitamina K nel latte materno varia da 0,1 a 0,9 µg/dl, in media approssimativamente 0,2-0,3 µg/dl. Il trasferimento di vitamina K attraverso la placenta è scarso e la concentrazione nel latte umano varia considerevolmente a seconda della dieta materna, ma è generalmente riconosciuto che sia insufficiente per soddisfare i bisogni iniziali del neonato. Per i neonati allattati al seno può essere inoltre raccomandata una supplementazione di vitamina K durante i primi tre mesi di allattamento per prevenire la forma tardiva di malattia emorragica neonatale [28].

Vitamina E: concentrazione media è alta nel colostro (0,8 mg/dl) e diminuisce nel latte materno maturo (0,3-0,4 mg/dl): svolge un'azione antiossidante e previene l'invecchiamento cellulare [28].

Minerali: il contenuto totale di minerali nel latte materno è pari a 1/3 della concentrazione degli stessi nel latte vaccino (0,2 g/dl vs 0,7 g/dl); ciò determina un minor carico renale di soluti nei neonati allattati al seno [29].

Calcio, fosforo e magnesio: sono presenti nel latte in livelli indipendenti dalle concentrazioni sieriche materne.

Il latte materno contiene 250-300 mg/l di calcio, senza variazioni significative durante l'allattamento. Nei bambini allattati al seno la percentuale di assorbimento del calcio intestinale è del 40-70 %. Esso è favorito dal rapporto calcio:fosforo (2:1) e dalla formazione di micelle proteiche di caseina [30].

Rame, ferro e zinco: il colostro contiene livelli elevati di rame, ferro e zinco più elevati rispetto al latte di transizione o a quello maturo per sopperire alla carenza

fisiologica del neonato, che nasce senza depositi. Anche per questi micronutrienti non sembra esserci correlazione con l'intake alimentare materno.

La concentrazione di ferro nel latte materno decresce da 0,4-0,8 mg/l nel colostro a 0,2-0,4 mg/l nel latte maturo [32]. Sebbene il ferro sia scarsamente presente nel latte materno, esso risulta comunque sufficiente fino ai sei mesi di vita del bambino, grazie alla sua elevata biodisponibilità garantita dal legame con la lattoferrina [21].

La concentrazione dello zinco nel latte materno diminuisce precipitosamente da 4-5 mg/l nel colostro a 1-2 mg/l a tre mesi dal parto e a 0,5 mg/l a sei mesi dal parto [29-1]. Anche lo zinco del latte materno è molto biodisponibile.

La concentrazione del rame sembra essere in media 0,69 mg/l, importanza funzionale nei metabolismi che riguardano tessuti osseo, connettivo, attività dei globuli rossi nonché del sistema immunitario. [33]

3.2 GLI EFFETTI SULLA SALUTE

Il latte materno ha un ampio spettro di effetti positivi a breve e lungo termine sulla salute del bambino e della mamma, nonché una serie di vantaggi socio-economici ed ambientali.

La letteratura internazionale appoggia ormai universalmente la tesi per cui il latte materno possa prevenire attivamente il presentarsi di alcune patologie [32-34-35]:

- Infezioni respiratorie acute, polmoniti: il rischio di ospedalizzazione per infezione delle basse vie respiratorie nel primo anno di vita è ridotto del 73% nei bambini allattati esclusivamente al seno per più di quattro mesi. Sembra anche che il rischio di polmoniti con complicanze sia aumentato nei bambini in modo direttamente proporzionale alla durata sub-ottimale di allattamento al seno [42]. In caso di bronchiolite da virus respiratorio sinciziale (RSV), il quadro clinico nei bambini allattati esclusivamente al seno è meno grave, con una minor durata dell'ospedalizzazione e una minor necessità di ossigenoterapia. I bambini allattati esclusivamente al seno per più di 3 mesi hanno un rischio di sviluppare otite media ridotto dal 23 al 50% [36-37-38-42].
- Infezioni del tratto gastrointestinale: l'allattamento al seno, esclusivo o complementato, è associato ad una ridotta incidenza di infezioni del tratto gastrointestinale soprattutto grazie alla componente e funzione degli oligosaccaridi (stimata al 64%) [39-42]. Questo effetto continua per due mesi dopo la cessazione dell'allattamento al seno. In particolare diversi studi dimostrano che l'alimentazione dei neonati pretermine con latte materno si

associa con una significativa riduzione dell'incidenza di enterocolite necrotizzante (NEC).

- Patologie allergiche: l'allattamento al seno ha un effetto protettivo nei confronti di asma, dermatite atopica, eczema. Questo effetto protettivo è ancor più significativo in soggetti con anamnesi familiare positiva per tali patologie e sembra essere anche correlato alla durata dell'allattamento al seno e proteggere nei primi 5 anni di vita da questo tipo di patologie [40-41].
- Malattie infiammatorie croniche intestinali: dovuto alla sua azione immunomodulatrice. La differente colonizzazione intestinale e quindi la composizione del microbiota intestinale del bambino allattato al seno rappresenta un ulteriore effetto protettivo del latte materno.
- Malattie tumorali: la lattoferrina in particolare riveste un ruolo in vitro come immunomodulatore, anti-angiogenica e pro-apoptosi delle cellule tumorali, tanto da inserirla in alcuni approcci terapeutici così come la alfa-lattoalbumina [41]
- Epilessia: sempre la alfa-lattoalbumina sembra essere utile intervenendo nella cascata triptofano, serotonina.
- Infezioni gravi come HIV: sembra che la condroitina contenuta nel latte umano riesca ad impedire il legame tra il virus ed il recettore dei CD4 [41]
- Sindrome della morte improvvisa neonatale (SIDS): l'allattamento al seno è associato con una riduzione del 36% del rischio di sindrome della morte improvvisa neonatale (SIDS). L'azione positiva dell'allattamento al seno nei confronti della SIDS, inoltre, è indipendente dalla posizione assunta dal bambino in culla.

- **Obesità:** sebbene numerosi fattori confondenti complichino gli studi relativi l'obesità, c'è una riduzione del 7-24 % dei tassi di obesità in adolescenza e in età adulta in soggetti che hanno assunto latte materno durante l'infanzia, rispetto ai soggetti che non hanno mai assunto latte materno. Inoltre, la durata dell'allattamento al seno è inversamente correlata con il rischio di sovrappeso; ogni mese di allattamento al seno è associato con una riduzione del rischio del 4% [42].
- **Diabete:** nei bambini allattati esclusivamente al seno per almeno tre mesi è riportata una ridotta incidenza di diabete tipo 1, per la mancata esposizione alle proteine del latte vaccino. È stato ipotizzato infatti che alla base della patogenesi del diabete tipo 1 ci sia anche l'esposizione alla beta-lattoglobulina, proteina del latte vaccino che stimolerebbe una reazione immunologica crociata con le cellule beta del pancreas. È dimostrata anche una riduzione dell'incidenza del diabete di tipo 2, come effetto positivo a lungo termine dell'allattamento sul controllo del peso e dell'appetito.
- **Leucemia e linfoma:** nei bambini allattati al seno per almeno 6 mesi si osserva una riduzione fino al 16-19% del rischio di sviluppare leucemia linfatica acuta e del 15% del rischio di sviluppare leucemia mieloide acuta. L'allattamento per meno di 6 mesi è protettivo, ma con minore significatività statistica. Meccanismo non ancora chiaro.
- **Sviluppo neuro comportamentale:** bambini allattati esclusivamente al seno per almeno tre mesi hanno un quoziente intellettuale maggiore. Ma gli effetti positivi dell'allattamento sullo sviluppo neurocognitivo sono maggiormente

significativi nei bambini pretermine, una popolazione a maggior rischio di alterato sviluppo neuro-comportamentale.

- Ipertensione arteriosa: la caseina ha un effetto inibente sull'enzima che converte l'angiotensione I

RISCHI PER LA SALUTE DEL BAMBINO ASSOCIATI A MANCATO ALLATTAMENTO AL SENO (adattato da Manuale di NUTRIZIONE in età Evolutiva - Cuzzolin Editore - Settembre 2016)	
Patologia	Eccesso di rischio (%)
Otite media acuta	100
Dermatite atopica	47
Infezioni gastrointestinali (diarrea e vomito)	178
Ospedalizzazione (età<12 mesi) per infezioni basse vie aeree	257
Asma con familiarità positiva	67
Asma con familiarità negativa	35
Obesità	32
Diabete tipo 2	64
Leucemia linfatica acuta	23
Leucemia mieloide acuta	18
SIDS	56

Figura 4: Rischi per la salute del bambino associati a mancato allattamento al seno – adattato da Manuale di Nutrizione in età evolutiva – Cuzzolin editore, Settembre 2016

Come anticipato gli effetti protettivi e sulla salute del latte materno non sono da prendere in considerazione solo parlando del neonato e del bambino, ma anche approfondendo il lato materno. Gli effetti a breve termine sono:

- un recupero più rapido del peso pregravidico e una ridotta incidenza di anemia (maggiori contrazioni uterine nel post-partum con minor metrorragia e periodo più prolungato di amenorrea).

- una migliore relazione e forza della diade mamma-bambino e diminuzione del rischio di depressione post-partum per aumento dell'autostima collegata a un allattamento di successo.
- un effetto contraccettivo, se prolungato per almeno sei mesi riduce significativamente la probabilità di una nuova gravidanza, distanziando le nascite e diminuendo in via indiretta anche il rischio di un successivo parto prematuro. L'effetto contraccettivo risulta significativo (98% di protezione da nuova gravidanza) se sono soddisfatti tutti e tre i seguenti criteri: 1) non siano passati ancora 6 mesi dal parto; 2) non sia ripreso il ciclo mestruale; 3) l'allattamento al seno sia ancora esclusivo con intervalli tra poppate successive mai troppo lunghi (orientativamente sempre <6h di notte e <4h di giorno) [43].

Mentre prendendo in considerazione gli effetti a lungo termine, l'allattamento al seno:

- riduce l'incidenza di osteoporosi e di neoplasia al seno e all'ovaio: con effetto dose dipendente, nella donna geneticamente predisposta è stato infatti dimostrato un rischio diminuito di tumore dell'ovaio dell'8% per un periodo di 5 mesi di allattamento [42].

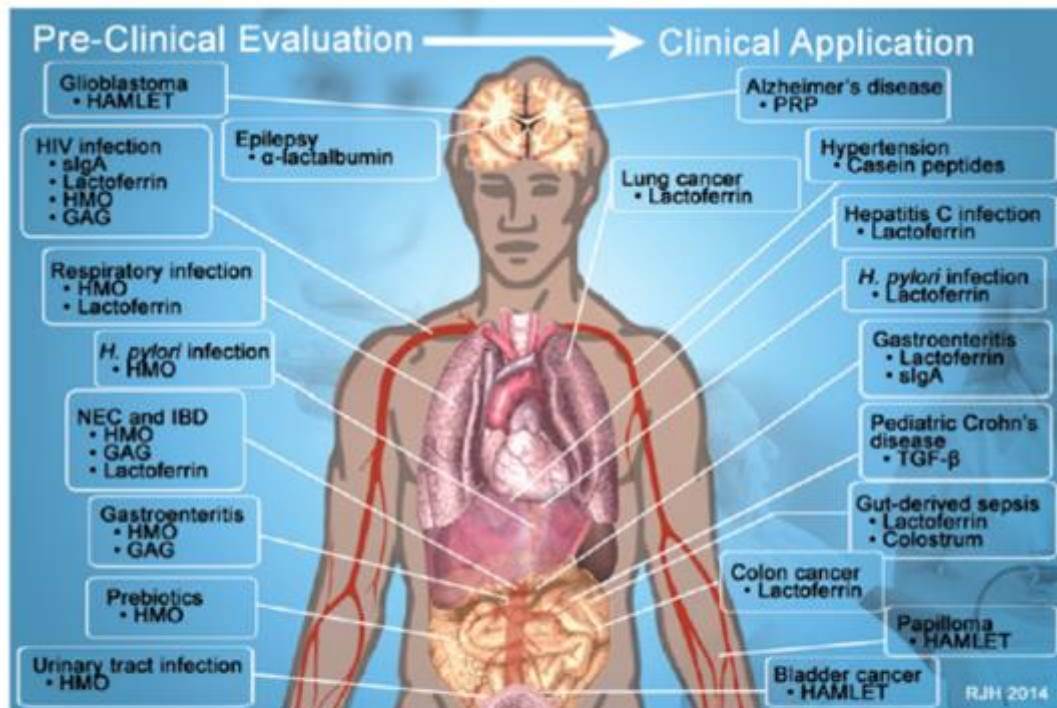


Figure 1 Diagram illustrating the wide range of applications for bioactive milk compounds in the treatment of human disease. Molecules undergoing preclinical evaluation are listed on the left side of the diagram underneath each disease model or clinical application under consideration. Milk components undergoing active clinical evaluation or currently in clinical use are listed on the right side of the diagram underneath each human disease in which clinical efficacy has been demonstrated. Abbreviations: GAG, glycosaminoglycan; HAMLET, human α -lactalbumin made lethal to tumor cells; HMO, human milk oligosaccharide; IBD, inflammatory bowel disease; NEC, necrotizing enterocolitis; PRP, proline-rich polypeptide; sigA, soluble immunoglobulin A.

Figura 5: Effetti e applicazioni delle componenti bioattive del latte materno – “Clinical applications of bioactive milk components”. - Nutr Rev. 2015 Jul;73(7):463-76

Per ultimo ma non per importanza il consumo di latte materno è vantaggioso ed economico non solo per la famiglia stessa, ma anche per l'intera società e per l'ambiente.

La sua pronta disponibilità, infatti, rappresenta un significativo risparmio in termini di catene di produzione e costi di distribuzione, ma anche un notevole vantaggio ecologico in tema di smaltimento dei rifiuti e inquinamento.

Inoltre, come descritto in precedenza, essendo implicato nella prevenzione di importanti patologie non solo del bambino ma anche materne, quali dalle infezioni

respiratorie e gastrointestinali del bambino al cancro ovarico della donna, l'allattamento al seno garantisce anche un abbattimento dei costi della sanità.

Nel Regno Unito la spesa sanitaria per le malattie acute nel bambino è stimata essere pari a 89 milioni di dollari l'anno: con un allattamento al seno garantito per almeno 4 mesi alcuni studi ritengono che il risparmio dato dall'efficacia della prevenzione sarebbe di 11 milioni. Analoga stima è stata condotta negli Stati Uniti analizzando in particolare anche l'incidenza della NEC e della mortalità infantile [44]. Per quanto concerne l'Italia il risparmio è documentato, dove per ogni bambino non allattato al seno si stima un incremento annuale delle spese per cure ambulatoriali ed ospedaliere di circa 140€ [45].

4. ALLATTAMENTO AL SENO E VIE AEREE

E' noto ed accettato come l'allattamento al seno rivesta un ruolo protettivo in termini di frequenza, durata e severità delle infezioni del tratto respiratorio nei bambini per i primi 6 mesi di vita. Come già esemplificato nelle sezioni precedenti numerosi componenti del latte materno specificatamente o non specificatamente attivi immunologicamente contribuiscono a questa azione protettiva: le cellule dell'immunità maggiormente rappresentate nel latte materno sono macrofagi, B e T linfociti e granulociti neutrofili. I macrofagi contenuti nel latte materno rilasciano citochine e molti altri fattori immunitari tra cui: lisozima, lattoferrina, IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α e GM-SF (fattore stimolante i granulociti macrofagi) [46-55].

COMPONENTI IMMUNOLOGICI SPECIFICI E NON DEL LATTE MATERNO adattato da "Immunological and Phenotypic Characterization of Cell Constituents of Breast Milk" Cell and Tissue Biology - Feb 2016	
<i>Componente</i>	<i>Funzioni</i>
IgA secretorie	rivestono le mucose prevenendo la penetrazione di microrganismi patogeni e allergeni
Aptocorrina	lega la Cobalamina, essenziale per la crescita dei batteri
Oligosaccaridi	stimolano la crescita dei batteri <i>Lactobacillus</i> e <i>Bifidobacterium</i>
Acidi grassi	daneggiano la capsula lipoproteica di alcuni virus
Glicoproteina 90k	neutralizza particelle di RSV, riducendo incidenza delle infezioni respiratorie
Interferon-gamma	modula l'attività delle cellule immunitarie
Epidermal growth factor	accelera la maturazione e la rigenerazione delle cellule epiteliali
Lattoferrina	lega il ferro rendendolo non disponibile per i batteri e la loro crescita; proprietà anti-infiammatorie, antiossidanti e anti-tumorali
Citochine (TGF-B, IL-1-4-8-10)	azione regolatoria i processi immunitari
Cellule B	coinvolte nella produzione di anticorpi
Fibronectina	stimola l'attività dei macrofagi
Cellule Th	coinvolte nella produzione di citochine e interferon-gamma
Cellule Tc	distruggono cellule che non possono adempiere propriamente alle loro funzioni come risultato di mutazioni o infezioni virali
Macrofagi	fagocitosi e produzione di lisozima e citochine
Neutrofili	proprietà batteriostatiche e fagocitiche

Figura 6: Componenti immunologici specifici e non del latte materno - adattato da "Immunological and phenotypic characterization of cosituantes of breast milk". Cell and tissue biology, Feb. 2016

Per importanza e presenza il gruppo di Immunoglobuline più rappresentato nel latte materno è quello delle IgA ed, in particolare, la forma conosciuta come IgA secretorie, che si trova in grande quantità in tutto l'intestino e nelle vie respiratorie: anticorpi composti da due molecole IgA congiunte ed una componente cosiddetta secretoria che sembra protegga le molecole degli anticorpi dal venire digerite dagli acidi gastrici e dagli enzimi digestivi dello stomaco e dell'intestino.

Le IgA secretorie presenti nel latte materno vanno a sopperire alla ridotta produzione di tali immunoglobuline da parte del neonato nelle prime settimane o addirittura mesi di vita garantendo un'azione anti-infettiva a livello delle mucose e costituendo una valida protezione per l'intestino e le alte e basse vie respiratorie.

Le molecole IgA secretorie, inoltre, proteggono ulteriormente le mucose poiché agiscono senza causare infiammazione locale e fatto ancora più importante dipendono dall'ambiente: ogni organismo produce IgA a seguito di contatto con patogeni dell'ambiente in cui vive, la madre riesce in questo modo a preservare ancor di più il neonato e il lattante proprio nell'ambiente in cui vive.

Nel latte materno le cellule immunitarie abbondano con concentrazioni ancora maggiori nel colostro, in particolare i leucociti che svolgono la loro attività anti-infettiva sia direttamente che indirettamente attivando altri meccanismi di difesa. Sono costituiti per il 90% da fagociti (granulociti neutrofili e macrofagi) e per il 10% da linfociti T e B:

- i neutrofili hanno attività simile ai macrofagi del latte, che sembrano essere più attivi, attaccano i germi e li fagocitano. Essi producono lisozima (enzima

che distrugge i batteri rompendo la parete delle cellule), lattoferrina e fattori del complemento.

- i linfociti B, dopo l'azione dei macrofagi, liberano immunoglobuline specifiche e interferone;
- i linfociti T, responsabili dell'immunità specifica cellulo-mediata, sopprimono le cellule infette e liberano citochine, tra le quali il gamma-interferone, i fattori che inibiscono la migrazione e i fattori chemiotattici per i monociti, in grado di rafforzare la risposta immunitaria del bambino.

Tutti questi appurati meccanismi di difesa sono stati correlati con dati clinici ed epidemiologici per anni dalla Letteratura Internazionale a partire dalla salute e colonizzazione dell'apparato gastrointestinale nel bambino allattato al seno, anche in rapporto alla diversità di tipologia di parto, specie se confrontato con il bambino che sin dai primi giorni di vita assume latte formulato, fino ad arrivare in tempi più attuali al diverso microbiota che li caratterizza [48-49-51].

Il passo successivo come dimostrano Bisgardd et al., sta proprio nel fatto che la diversità di questo microbiota influenza poi a cascata nella vita del bambino le manifestazioni immunitarie che, già legate all'ipotesi dell'igiene, rimangono ora più centro di discussione di possibili influenze più correlate agli stili di vita, come allattamento al seno e predisposizione a sviluppare atopia [50-53-56]. In particolar modo è stato descritto, per esempio nel tratto gastrointestinale, come tutti i fattori che portano ad uno squilibrio del microbiota, tra flora patogena e non tra cui sicuramente l'allattamento al seno nei primi mesi di vita, possono influenzare l'andamento di

alcuni stati morbosi su base immunologica. Non vanni dimenticati però per importanza la familiarità, del tipo di parto e dell'uso precoce di terapie antibiotiche. [52-54-57-58].

Tutti questi studi riguardanti la correlazione tra allattamento al seno e effetto immunologico o meglio di immunoregolatore di più di uno dei suoi costituenti, approfonditi per rischio di patologie atopiche, allergiche, prevenzione di malattie con base autoimmunitaria, prevenzione addirittura su patologie tumorali, lasciano la porta aperta su un ampio campo, investigato ma non nella sua completezza. L'influenza sulla incidenza e severità delle infezioni delle vie aeree nel bambino, specie nel più piccolo, è stata dimostrata ed addirittura uno studio recente di Biesbroek et al. mostra variazioni nella colonizzazione delle vie aeree, il microbiota della mucosa nasale, dei lattanti in correlazione forse al tipo di allattamento proprio come per il microbiota intestinale.

Molti batteri tipicamente responsabili delle infezioni delle vie respiratorie (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*) sono generalmente residenti asintomatici delle alte vie respiratorie, in particolare del nasofaringe. Biesbroek et al. hanno recentemente mostrato nel loro studio come l'allattamento al seno eserciti il suo ruolo protettivo nei confronti delle patologie infettive delle alte vie respiratorie attraverso una modificazione diretta del microbiota colonizzante il nasofaringe [47]. Lo studio mostra come a 6 settimane di vita la flora batterica dei bambini allattati esclusivamente al seno sia caratterizzata dalla presenza di *Dolosigranulum* e di *Corynebacterium* in maggior misura rispetto a *Staphylococcus* e batteri anaerobi riscontrati nel gruppo di lattanti che assumevano formula adattata. Inoltre questa diversità correla in modo inversamente proporzionale

con il riscontro di wheezing nelle età successive e cosa non meno importante all'età di 6 mesi questa diversità e significatività va scomparendo, quasi a dimostrare che una volta intervenuti altri fattori di rischio ambientali e non, l'efficacia dell'effetto dell'allattamento al seno possa venir meno.

Quindi anche a livello del nasofaringe, il microbiota, modificato dall'assunzione del latte materno, potrebbe perciò agire come prima linea di difesa contro l'acquisizione, la crescita e l'invasione di agenti patogeni influenzando pertanto la suscettibilità alle infezioni.

5. SCOPO DELLO STUDIO

Alla luce dei dati della Letteratura Internazionale riguardanti l'importanza del latte materno come nutriente ma anche grazie ai suoi fattori bioattivi, di promotore metabolico-immunologico e immunomodulatore, ed in particolare alla possibile correlazione di tali funzioni con specifici meccanismi regolatori a livello mucosale e del microbiota non solo nel tratto gastrointestinale ma anche dell'apparato respiratorio [1-42], e considerando l'emergente e sempre più attuale utilizzo del rinocitogramma e dello studio della cellularità nasale [2] in ambito pediatrico, questo studio di coorte di tipo longitudinale prospettico si pone come obiettivi:

- descrivere e conoscere il quadro basale della cellularità nasale del neonato al momento della nascita e del bambino a 12 mesi di vita;
- correlare il quadro della cellularità nasale rilevato alle due epoche di vita con il tipo di alimentazione latte assunta nel primo anno di vita e con i dati ottenuti da anamnesi gravidica, familiare e patologica.

6. MATERIALI E METODI

6.1 LA POPOLAZIONE DELLO STUDIO: i criteri di arruolamento

Lo studio di coorte è di tipo prospettico longitudinale ed è stato condotto su una popolazione di bambini nati presso l'U.O. di Neonatologia dell'ASST Santi Paolo e Carlo, Ospedale San Paolo di Milano.

Lo studio è stato progettato in tre diverse fasi:

- Fase I: raccolta dei dati anamnestici in particolare familiari ed ambientali, e del campione di mucosa nasale con successiva analisi tramite citologia nasale di neonati che rispondono ai criteri di inclusione ed esclusione dello studio di seguito elencati, afferenti al punto nascita dell'Ospedale San Paolo di Milano, nel periodo compreso tra Gennaio e Dicembre 2016.
- Fase II: raccolta dei dati anamnestici ed in particolare auxologici, familiari, ambientali e nutrizionali dei neonati arruolati alla fase I e ripetizione in benessere, del prelievo di mucosa nasale per l'esecuzione della citologia nasale al compimento del 12 mese di vita per tutti i neonati arruolati nella fase I che mantengono tutti i criteri di arruolamento e partecipazione allo studio.
- Fase III (futura): lo studio si completerà con la raccolta dei dati anamnestici, auxologici, familiari, ambientali e nutrizionali e con la ripetizione in benessere del prelievo di mucosa nasale ed analisi tramite citologia nasale al compimento del terzo anno di vita di tutti i bambini arruolati nelle due precedenti fasi di studio

che mantengono validi i criteri di arruolamento e partecipazione allo studio. Inoltre sarà eseguito uno screening allergologico a tutti i bambini arruolati tramite esecuzione di test allergometrici per i principali aero-allergeni.

In tutte le fasi dello studio verrà effettuata una adeguata analisi statistica del campione raccolto e delle correlazioni esistenti mirate agli end-points dello studio prima elencati.

Di seguito i criteri di inclusione:

- Età gestazionale ≥ 37 settimane;
- Neonati di entrambi i sessi;
- Entrambi i genitori di origine italiana (con il rationale di ridurre al minimo le differenze genetiche dovute all'appartenenza a differenti etnie);
- Buon adattamento alla vita extrauterina (APGAR al 5° minuto ≥ 7);
- Nati con qualsiasi tipologia di parto (parto eutocico spontaneo o indotto, parto operativo per applicazione di ventosa, taglio cesareo elettivo o urgente);
- Adesione allo studio attraverso firma del consenso informato da parte di entrambi i genitori;

I criteri di esclusione dello studio sono invece:

- Neonati con riscontro di malformazione della testa e/o del collo (labiopalatoschisi) o di altre malformazioni maggiori
- Neonati con un peso alla nascita non adeguato per età gestazionale (SGA o LGA: Small o Large for Gestional Age)

6.2 LA RACCOLTA DEI DATI E LA CITOLOGIA NASALE

Durante la Fase I dello Studio si è proceduto, previa acquisizione di un consenso informato da parte dei genitori, alla raccolta dei dati anamnestici:

- mediante questionario conoscitivo per la raccolta dettagliata dell'anamnesi, in particolare relativo alla anamnesi familiare (fratelli maggiori, collettività frequentata), esposizione al fumo passivo, familiarità per patologie allergiche e/o otorinolaringoiatriche;
- mediante la consultazione della cartella clinica della madre (dati relativi al decorso della gravidanza, all'assunzione di farmaci o altre sostanze, al riscontro ecografico patologici o di esami infettivologici alterati, al tipo di parto);
- mediante la consultazione della cartella clinica del neonato (dati relativi al decorso del periodo neonatale di degenza e riguardo le misure antropometriche alla nascita).

Entro le prime 24 ore di vita, a ciascun neonato arruolato è stato eseguito il prelievo della mucosa nasale per eseguire l'esame citologico.

Il prelievo citologico è stato effettuato mediante tecnica di scraping con strumento dedicato in materiale plastico confezionato singolarmente in busta sterile (Rhino-probe®, Arlington Scientific, Springville, UT, USA) sotto visione diretta, senza l'ausilio di altri strumenti, a livello della porzione mediale del turbinato inferiore.

Il materiale ottenuto è stato strisciato uniformemente su vetrini porta-oggetto, contrassegnati da un numero identificativo del paziente e dalla data del prelievo, e lasciato asciugare in aria ambiente.

I campioni sono stati sottoposti alla colorazione rapida MGG QUICK STAIN – Bio Optica® - Milano. I coloranti costituenti il kit di colorazione rapida sono gli stessi utilizzati nella formulazione delle tradizionali soluzioni di May-Grunwald-Giemsa; la rapidità con cui si compie il processo di colorazione è dovuta al grado di dissociazione delle specie chimiche attive (eosina e coloranti tiazinici) che rende rapido il loro assorbimento nelle strutture cellulari.

Per ottenere la colorazione ogni vetrino è stato immerso in successione nei tre differenti reagenti, in particolare: cinque secondi nel metanolo, dieci secondi nell'eosina, cinque secondi nel blu di metilene.

Dopo questo procedimento il vetrino è stato lavato con acqua distillata e quindi lasciato asciugare in aria ambiente. Infine, una volta asciugato, è stata applicata una goccia di colla per fissare il vetrino copri-oggetto.

La fase di osservazione è stata effettuata al microscopio ottico.

Lo studio delle cellule del campione è stato realizzato mediante la visione di 50 campi ad alto ingrandimento 1000x. Per permettere una visione ottimale è stata applicata una goccia d'olio tra il vetrino e l'obiettivo della lente.

A seguito della lettura di 50 campi ad alto ingrandimento, le osservazioni sono state riportate all'interno di un'apposita griglia di valutazione.

VALUTAZIONE SEMIQUANTITATIVA DELLA CITOLOGIA NASALE (valutazione campi microscopici 1000x in immersione)					
	assenti	rari (+)	alcuni (++)	numerosi (+++)	numerosissimi (++++)
Cell. Ciliate	0	1-100	101-200	210-300	>300
Cell. Mucipare	0	1-100	101-200	210-300	>300
Neutrofili	0	1-20	21-40	41-100	>100
Eosinofili	0	1-5	6-10	11-30	>30
Mastociti	0	1-5	6-10	11-30	>30
Linfociti	0	1-5	6-10	11-30	>30
Batteri	0	I I I	II II	III III III	
Spore	0	I I I	II II	III III III	

Figura 6: Tabella di valutazione semiquantitativa della citologia nasale (adattato da Atlante di citologia nasale, Matteo Gelardi, Centro Scientifico Editore, edizione 2012)

Durante la Fase II, come da disegno dello Studio, si è invece proceduto al compimento dei 12 mesi di vita per tutti i bambini arruolati durante la Fase I e per i quali si mantengono validi i criteri di inclusione ed esclusione:

- raccolta dei dati anamnestici mediante dettagliato questionario relativo al decorso del primo anno di vita, in particolare interesse mirato a:
 - patologie infettive dell'apparato respiratorio (diagnosi di rinite, flogosi catarrale delle alte vie aeree, otite media acuta),
 - esposizione a fumo passivo,
 - eventuale frequenza della collettività,
 - aspetti nutrizionali e le abitudini alimentari del bambino, in particolare, è stata valutata la tipologia di alimentazione lattea (secondo la

classificazione delle tipologie di alimentazione del neonato dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, revisionata e aggiornata al 2009) dalla nascita al divezzamento e per tutto il primo anno di vita con valutazione specifica di esposizione al latte materno, durata dell'allattamento al seno, durata dell'allattamento al seno esclusivo (quando presente),

- rilevazione delle misure antropometriche,
- valutazione clinica otorinolaringoiatrica e secondo prelievo citologico delle cellule della mucosa nasale (metodica di prelievo, fissaggio e analisi del campione analoga a quella del prelievo neonatale).

6.3 L'ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica del campione è stata effettuata con il sistema IBM SPSS Statistic 21 ® (Statistical Package for Social Science versione 21 - SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

I dati descrittivi sono riportati come valore percentuale, media, deviazione standard (DS) del numero di soggetti. Il confronto è stato effettuato mediante un test non parametrico tra più campioni appaiati (test di Friedman) e un test non parametrico tra due campioni appaiati (test di Wilcoxon), quando appropriati.

Il livello di significatività statistica è stato fissato per $p < 0.05$.

7. RISULTATI

7.1 DATI FASE I: anamnesi e periodo neonatale

Durante la Fase I lo studio ha reclutato 176 neonati che rispondono ai criteri di inclusione ed esclusione. Il campione in base al sesso si suddivide in maschi (92 neonati) e femmine (84 neonati), corrispondenti a percentuali rispettivamente di 52,3% e 47,7% del campione arruolato. Non vi sono differenze statisticamente significative nel campione per quanto riguarda il sesso ($p=0,9$).

Tutti i neonati, come da criteri di inclusione dello Studio risultano nati a termine (età gestazionale ≥ 37 settimane) con buon adattamento alla vita extrauterina (punteggio di APGAR ≥ 7 al quinto minuto di vita). Il 72,7 % del campione ha presentato indice di Apgar pari a 10 al 1', il 21,7% pari a 9, il 4,5% pari a 8 e solo l'1,1% pari a 7. Al 5' il 6,8% ha presentato indice di Apgar pari a 9, mentre la restante percentuale del campione ha presentato indice Apgar pari a 10. Tutti i neonati arruolati sono di peso alla nascita adeguato per età gestazionale (AGA).

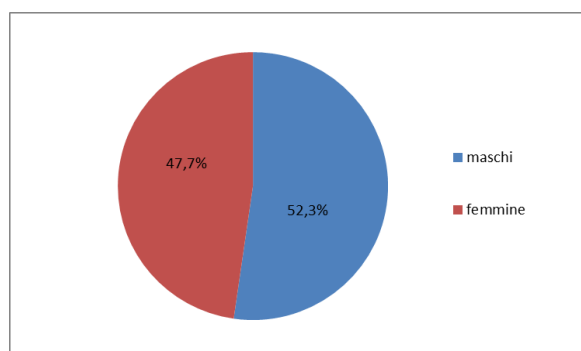


Figura 7: Distribuzione del campione arruolato in base al sesso ($p=0,9$)

Per quanto concerne l'analisi descrittiva dei dati riguardanti il parto ed il periodo neonatale appare inoltre rilevante descrivere:

- la tipologia di parto in base alla quale 140 neonati sono nati da parto vaginale (79,5 % del campione), 36 sono nati da taglio cesareo (20,5% del campione). In particolare per 7 parti (4%) si è resa necessaria l'applicazione di ventosa ostetrica.

Solo in 20 parti (11,4%) si è reso necessario l'intervento del personale medico/ostetrico come assistenza ulteriore al parto.

Va precisato ai fini dello studio che in caso di taglio cesareo, al momento della nascita sono state aspirate le prime vie aeree ed è stata valutata la pervietà delle coane attraverso con sondino naso-gastrico, mentre nei neonati nati da parto vaginale questa pratica è stata eseguita dopo le 24 ore di vita, quindi successivamente all'esecuzione dello scraping per prelievo citologico delle cellule della mucosa nasale.

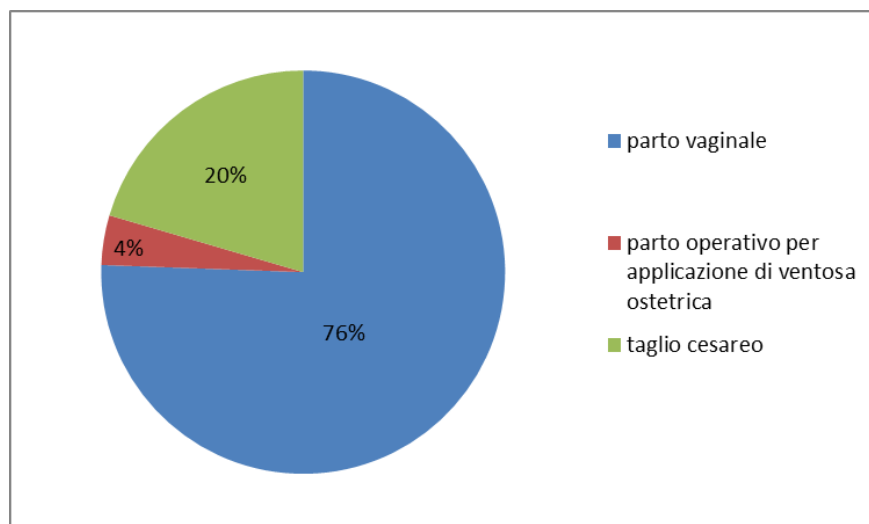


Figura 8: Distribuzione del campione in base alla tipologia di parto

Per quanto concerne l'analisi dei dati riguardanti la gravidanza e l'anamnesi ambientale e familiare, raccolti come precisato in precedenza, tramite questionario e visione della cartella clinica materna, sono emersi:

- nessun riscontro patologico rilevante ai controlli ecografici durante la gravidanza per quanto concerne la crescita fetale, in particolare si segnalano 3 riscontri di oligoidramnios ed un riscontro di polidramnios;
- nessuna positività per le infezioni del complesso ToRCH (Toxoplasma, Rosolia, Citomegalovirus, Herpes simplex virus) né per i virus HIV, HBV e HCV.
- il tampone vagino-rettale per la ricerca dello Streptococco beta emolitico di gruppo B (o Streptococcus agalactiae) è risultato negativo in 156 casi (88,6%) e positivo in 15 casi (8,5 %), non eseguito nei rimanenti casi (2,9 %).

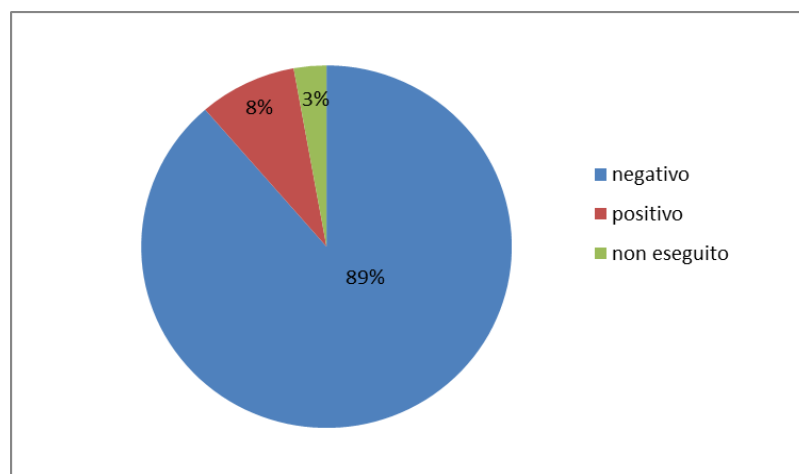


Figura 9: Distribuzione del campione in base all'esito del tampone vagino-rettale per STRAGA

In base all'analisi della anamnesi familiare in particolare rivolta ai problemi di ordine otorinolaringoiatrico inoltre il campione ha presentato sul lato materno:

- nel 26,7 % dei casi anamnesi positiva per rinite ricorrente/cronica;
- nel 16,7 % dei casi anamnesi positiva per sinusite;

- nel 4,4 % anamnesi positiva per OSAS;
- anamnesi positiva per otiti medie acute frequenti nel 14.4%;
- patologia allergica ad aero-allergeni nel 46.7%.

Per quanto concerne l'abitudine al fumo sul lato materno si è rilevata una positività nel 16.7% dei casi, mentre nel 32.2% del campione analizzato si è riscontrata una anamnesi positiva per pregressa abitudine al fumo.

In base all'analisi della anamnesi familiare in particolare rivolta ai problemi di ordine otorinolaringoiatrico inoltre il campione ha presentato sul lato paterno:

- nel 32,2 % casi anamnesi positiva per rinite ricorrente/cronica;
- nel 11,1 % anamnesi positiva per sinusite;
- anamnesi positiva per OSAS nel 11.1 % dei casi;
- anamnesi positiva per otiti medie acute frequenti nell'11,1% dei casi;
- patologia allergica ad aero-allergeni nel 36.7% dei casi.

Per quanto concerne l'abitudine al fumo sul lato paterno nel 36,6% dei casi si è rilevata una positività, mentre nel 7.8 % del campione analizzato si è riscontrata una anamnesi positiva per pregressa abitudine al fumo.

Abitudine al fumo materna	%
Fumo in gravidanza	16,7
Fumo in precedenza	32.2
Mai	51.1
Abitudine al fumo paterna	%
Fumatore	36.6
Ex fumatore	7.8
Mai	55.6

Tabella 1: Distribuzione del campione dei genitori in base all'abitudine al fumo

7.2 DATI FASE I: la citologia nasale

La raccolta dei dati riguardanti la cellularità dei campioni di mucosa nasale ha previsto una valutazione sia qualitativa che quantitativa: la numerosità cellulare dei più frequenti elementi cellulari riscontrabili, cioè come descritto in precedenza cellule ciliate, cellule mucipare, neutrofili, linfociti, eosinofili, macrofagi e mastociti, nonché l'eventuale presenza di patogeni quali batteri, spore e funghi. La presenza è stata espressa utilizzando una scala con simbolo "+", dalla prevalenza minima "+" alla massima "++++".

L'analisi del rinocitogramma di tutti i neonati ha mostrato:

- CELLULE CILIATE: in accordo con i dati della Letteratura, in più della metà dei campioni ne è stata riscontrata un'elevata numerosità ("++++" nel 58% dei casi, 102 casi, e "+++ nel 26,5% dei casi, 48 casi). Bassa cellularità ciliata del campione prelevato solo nel 10,2%, 18 casi "++" e nel 4,5% dei casi con "+", 8 casi.
- le CELLULE MUCIPARE hanno mostrato, anche in questo caso in accordo con i dati della Letteratura, andamento inversamente proporzionale rispetto alla ciliate. Assenti nel 38.6 % del campione (68 casi), presenti "+" in uguale misura (38.6%, 68 casi) presenti "++" nel 18,2% dei casi, 32 casi, in 6 casi, 3.5% "++++"e marcatamente presenti "++++" solo in 2 campioni (1.1%, 2 casi).
- GRANULOCITI NEUTROFILI: presenti in quantità elevata "++++" in 28 casi (15,9%), "+++ nel 11.4% e "++", 20 casi, . Nel 36.4% scarsamente rappresentati "+", 64 casi e assenti in 12 casi (6.8%).

- i MACROFAGI e MASTOCITI: sono stati visualizzati rispettivamente soltanto in 2 campioni (1,1%) e assenti nei restanti 174 casi (98.9%)
- gli EOSINOFILI: presenti, visibili in basso numero (“+”), nel 5,7% del campione, 10 casi e assenti nella rimanente parte, 166 casi (94.3%).
- i LINFOCITI: in numero limitato “+” in 34 neonati (19.4%) e “++” in 2 neonati (1,1%), nei restanti 140 casi (79.5%) assenti.

Gli agenti patogeni che sono stati evidenziati al rinocitogramma neonatale sono stati batteri e funghi:

- i BATTERI: presenti in quantità elevata solo in 2 casi (1.1%), “+++” nel 2,3% dei casi, 4 casi, mentre poco presenti “++” in 12 neonati (6.8%), ancor meno “+” nel 27.3% dei casi, 48 casi ed assenti nei rimanenti 112 casi (62.5 %).
- i FUNGHI: solo in 6 campioni (3.4%) sono state valutate ife fungine, nessuna spora. Nel restante campione assenti 96.6%, 170 casi.

CELLULARITA' NASALE ALLA NASCITA (dati espressi in % del totale)									
	ciliate	mucipare	neutrofili	mastociti	macrofagi	eosinofili	linfociti	batteri	funghi
assente	//	38.6%	6.8%	98.9%	98.9%	94.3%	79.5%	62.5%	96.6%
"+"	4.5%	38.6%	36.4%	1.1%	1.1%	5.7%	19.4%	27.3%	3.4%
"++"	10.2%	18.2%	29.5%	//	//	//	1.1%	6.8%	//
"+++"	26.5%	3.5%	11.4%	//	//	//	//	2.3%	//
"++++"	58.8%	1.1%	15.9%	//	//	//	//	1.1%	//

Tabella 2: Cellularità nasale alla nascita

Prendendo in considerazione i dati del rinocitogramma della Fase I appare già doveroso descrivere la correlazione possibile tra i vari citotipi con:

- modalità di parto, non sono state riscontrate correlazioni statisticamente significative ($p=0.079$ per le cellule ciliate, $p= 0,071$ per le cellule mucipare, $p= 0,080$ per neutrofili, $p= 0,092$ per gli eosinofili, $p=0.083$ per linfociti, $p=0.073$ per batteri).
- abitudine al fumo in corso di gravidanza: non è risultata nessuna correlazione statisticamente significative ($p=0.088$ per le cellule ciliate, $p= 0,53$ per le cellule mucipare, $p= 0,51$ per neutrofili, $p= 0,63$ per gli eosinofili, $p=0.28$ per linfociti, $p=0.75$ per batteri).
- esecuzione di sondaggio nasale alla nascita: non vi sono correlazioni statisticamente significative ($p=0.68$ per le cellule ciliate, $p= 0,45$ per le cellule mucipare, $p= 0,40$ per neutrofili, $p= 0,26$ per gli eosinofili, $p=0.79$ per linfociti, $p=0.22$ per batteri).

7.3 DATI FASE II: anamnesi

Allo scadere del 12 mesi dalla prima valutazione, 164 bambini hanno proseguito lo Studio, 12 dei neonati arruolati alla Fase I hanno abbandonato lo Studio (6,8% di percentuale di abbandono).

L'analisi dei dati anamnestici raccolti dal questionario sottoposto ai genitori hanno potuto evidenziare che:

- per quanto concerne la costituzione del nucleo familiare: 86 bambini (47,8%) sono figli unici, 78 bambini hanno fratelli maggiori; in 66 casi un solo fratello maggiore e in 18 casi più fratelli maggiori.
- per quanto concerne la frequenza della collettività 48 bambini (27,3%) hanno frequentato la collettività durante il primo anno di vita, 116 bambini (65,9%) no.
- per quanto concerne l'esposizione al fumo passivo: solo 8 bambini (4,8%) sono stati esposti abitualmente al fumo passivo, mentre per i restanti casi no.

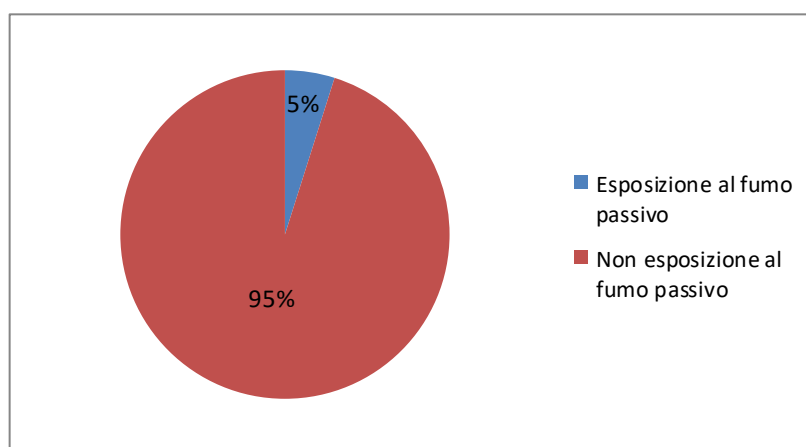


Figura 10: Esposizione al fumo passivo alla Fase II

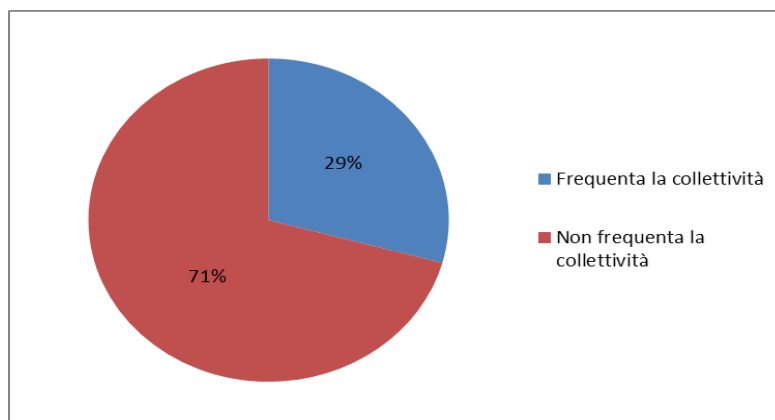


Figura 11: Frequenza della collettività alla Fase II

Nella raccolta delle informazioni anamnestiche, particolare interesse si è rivolto alle principali patologie respiratorie riscontrate durante il primo anno di vita, quali rinite, otite e patologie delle alte e basse vie aeree:

- Otite media acuta (OMA): presente in 22 casi (14.5%) e assente in 142 casi (85.5%)
- Flogosi delle alte vie aeree superiori (IVAS): presente in 150 casi (90.4%) e assente in 14 casi (9.6%)
- Reflusso gastro-esofageo (RGE): presente in 24 casi (14.5%) e assente in 140 casi (85.5%)
- Wheezing ricorrente (WR): presente in 12 casi (7.2%) e assente in 152 casi (92.8%)
- Dermatite atopica (DA): presente in 80 casi (48.7%) e assente in 84 casi (51.2%)

	OMA	IVAS	RGE	WR	DA
SI	22 (14.5%)	150 (90.4%)	24 (14.5%)	12 (7.2%)	80 (48.7%)
NO	142 (85.5%)	14 (9.6%)	140 (85.5%)	152 (92.8%)	84 (51.2%)

Tabella 3: Anamnesi per patologie riscontrate alla Fase II

7.4 DATI FASE II: la citologia nasale e confronto

Con la medesima metodica e classificazione si è proceduto ad analizzare i campioni di citologia nasale ottenuti alla Fase II. Sono state identificate:

- le CELLULE CILIATE: un'elevata numerosità anche in questo caso “++++” nel 37.8% dei casi, 62 casi e “+++” nel 20.7% dei casi, 34 casi. Bassa cellularità ciliata del campione prelevato “++” nel 23.2% dei casi, 38 casi e “+” nel 18.3% dei casi, 30 casi.
- le CELLULE MUCIPARE sono ugualmente risultate meno rappresentate: assenti in 50 casi e cioè il 30.5%, presenti “+” in 60 casi (36.6%), presenti “++” in 42 casi (25.6%), “+++” in 10 casi (6.1%) e marcatamente presenti “++++” in 2 casi (1,2%).
- i GRANULOCITI NEUTROFILI: in quantità elevata “++++” in 36 casi (22%) e “+++” in 54 casi (32.9%), meno rappresentate “++” in 36 casi (22%) e scarsamente rappresentati “+” in 28 casi (17.1%) e assenti in 10 casi (6%).
- i MACROFAGI non sono mai stati visualizzati e MASTOCITI sono stati visualizzati soltanto in 2 solo casi (1,1%) e assenti nei restanti 162 campioni (98.8%).
- gli EOSINOFILI: presenti, visibili in basso numero “+” in 8 casi (4.9%) e “++” in 2 casi (1.2%), nei restanti 154 campioni (93.9%) assenti.
- i LINFOCITI: apprezzati in numero limitato “+” in 38 bambini (23.2%) e “++” in 12 casi (7.3%), nei restanti 114 casi (69.5%) non sono stati visualizzati linfociti.

- non sono stati evidenziati FUNGHI o SPORE.
- i BATTERI: presenti in quantità elevata “++++” in 6 casi (3.7%), “+++” in 22 casi (13.4%), “++” in 44 casi (26.8%) ed infine “+” in 42 casi (25.6%) ed assenti in 50 casi (30,5%).

CELLULARITA' NASALE ALLA NASCITA (dati espressi in % del totale)									
	ciliate	mucipare	neutrofili	mastociti	macrofagi	eosinofili	linfociti	batteri	funghi
assente	//	30.5%	6%	98.8%	//	93.9%	69.5%	30.5%	//
"+"	18.3%	36.6%	17.1%	1.2%	//	4.9%	23.2%	25.6%	//
"++"	23.2%	25.6%	22%	//	//	1.2%	7.3%	26.8%	//
"+++"	20.7%	6.1%	32.9%	//	//	//	//	13.4%	//
"++++"	37.8%	1.2%	22%	//	//	//	//	3.7%	//

Tabella 4: Cellularità nasale all'anno di vita

Ponendo a confronto con una prima analisi statistica i campione ottenuti dall'analisi della citologia nasale nei neonati alla Fase I con quelli dei bambini alla Fase II si possono già rilevare delle significative differenze:

- differenza significativa per quanto concerne le cellule ciliate ($p < 0,05$)

Cellule ciliate	Fase I	Fase II
+ / ++	22	68
+++ / +++++	142	96

- differenza significativa per quanto concerne le cellule mucipare ($p < 0,05$)

Cellule mucipare	Fase I	Fase II
0/+/++	126	110
+++/+ + + +	38	54

- differenza significativa per quanto concerne le cellule neutrofile ($p < 0,05$)

Cellule neutrofile	Fase I	Fase II
0/+/++	118	64
+++/+ + + +	46	100

- differenza significativa per quanto concerne i batteri ($p < 0,05$)

Batteri	Fase I	Fase II
0/+/++	150	92
+++/+ + + +	14	72

- non vi sono invece differenza significativa per quanto concerne i rimanenti citotipi (mastociti $p=1$, eosinofili $p=1$, linfociti $p=0,9$, macrofagi $p=1$, spore $p=1$, ife $p=1$).

In seconda analisi si è proceduto alla correlazione tra le significatività tra i due diversi prelievi di citologia nasale visti in precedenza per le cellule ciliate, le cellule mucipare, i granulociti neutrofile ed i batteri in correlazione con i dati anamnestici ottenuti dalla analisi delle risposte dei genitori al questionario proposto alle famiglie alla Fase II in relazione ai principali fattori anamnestici indagati (esposizione a fumo passivo, presenza in famiglia di fratelli maggiori, frequenza della collettività,

anamnesi patologica del primo anno di vita positiva per: dermatite atopica, rinite frequente, otite media acuta, flogosi delle alte vie aeree e wheezing). I risultati hanno mostrato:

- differenza significativa per quanto concerne le cellule ciliate in correlazione con una anamnesi positiva per dermatite ($p < 0,038$) ed flogosi delle vie aeree superiori (IVAS) ($p < 0,05$)

Cell. Ciliate/ Dermatite	Fase I	Fase II
0/+/++	10	30
+++ /++++	68	48

Cell. Ciliate/ IVAS	Fase I	Fase II
0/+/++	26	64
+++ /++++	122	84

Non significative le correlazione per quanto concerne le cellule ciliate e gli altri dati anamnestici raccolti: otite media acuta ($p=0,8$), Wheezing ($p=0,9$), esposizione a fumo passivo ($p=0,9$), frequenza della collettività ($p=0,7$).

- differenza significativa per quanto concerne le cellule mucipare in correlazione con una anamnesi positiva per flogosi delle alte vie aeree ($p= 0,05$)

Cell. Mucipare/ IVAS	Fase I	Fase II
0/+	114	100
++ /+++ /++++	34	48

Non significative le correlazione per quanto concerne le cellule mucipare e gli altri dati anamnestici raccolti: dermatite (p= 0,33), otite media acuta (p=0,89), Wheezing (p=0,9), esposizione a fumo passivo (p=0,8), frequenza della collettività (p=0,9).

- differenza significativa per quanto concerne le cellule neutrofile in correlazione con una anamnesi positiva per flogosi delle alte vie aeree (p= 0,05)

Cell. Neutrofile/ IVAS	Fase I	Fase II
0/+ /+++	102	64
+++ /++++	46	84

Non significative le correlazione per quanto concerne le cellule neutrofile e gli altri dati anamnestici raccolti: dermatite (p= 0,55), otite media acuta (p=0,27), Wheezing (p=0,38), esposizione a fumo passivo (p=0,9), frequenza della collettività (p=0,52).

- Non significative le correlazione per quanto concerne i batteri ed i dati anamnestici raccolti: dermatite (p=1), flogosi delle alte vie aeree (p=0,3), otite media acuta (p=0,12), Wheezing (p=0,11), esposizione a fumo passivo (p=0,8), frequenza della collettività (p=0,37).

7.5 TIPOLOGIA DI ALIMENTAZIONE LATTEA

In base al tipo di allattamento ed alla durata il campione è stato analizzato e suddiviso in gruppi, in funzione della analisi di correlazione con la cellularità nasale e basandosi sul dato della Letteratura Scientifica Internazionale che descrive come gli effetti del latte materno sia dose e tempo dipendente. E' stata valutata la tipologia di alimentazione lattea (secondo la classificazione delle tipologie di alimentazione del neonato dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, revisionata e aggiornata al 2009) dalla nascita al divezzamento e per tutto il primo anno di vita con valutazione specifica di:

- esposizione al latte materno;
- durata dell'allattamento al seno;
- durata dell'allattamento al seno esclusivo (quando presente).

Nel campione analizzato:

- 20 bambini (12%) non hanno assunto latte materno;
- 144 bambini hanno assunto latte materno in modo esclusivo o complementato (87%). Di questi il 39% ha assunto latte materno fino al compimento dell'anno di vita (64 bambini), mentre 100 bambini non assumevano più latte materno all'anno di vita (61%).

Nell'analisi di un'altra tappa fondamentale nello sviluppo e nell'alimentazione del bambino nei primi mesi di vita, al sesto mese di vita, in concomitanza con il divezzamento, il 64% (104 bambini) dei bambini assumeva ancora latte materno,

mentre il 29%, 48 bambini avevano già un allattamento con formula adattata ed il rimanente 7%, 12 bambini assumeva un allattamento di tipo misto con latte materno e formula adattata.

Allattamento al seno	Alla nascita	Fino a 6° mese	Fino al 12° mese
Si	144 (87%)	104 (64%)	64 (39%)
No	20 (12%)	48 (29%) + 12 (7%)	100 (61%)

L'età media del timing del divezzamento nel campione analizzato è stata di 5,22 mesi (DS 1,65). La media per quanto riguarda la durata dell'allattamento al seno è stata di 8,06 mesi (DS 3,7), mentre per quanto concerne l'allattamento al seno esclusivo la media nel campione della durata è stata 4,82 mesi (DS 1,87).

Andando più nello specifico nell'analisi della durata in mesi dell'allattamento materno esclusivo, dato utile come detto in precedenza per la futura correlazione statistica con la cellularità nasale, il campione ha presentato le seguenti caratteristiche:

- allattamento al seno esclusivo a 3 mesi di vita: 130 bambini (79,2 %)
- allattamento al seno esclusivo a 4 mesi di vita: 124 bambini (75,6 %)
- allattamento al seno esclusivo a 5 mesi di vita: 122 bambini (74,3 %)
- allattamento al seno esclusivo a 6 mesi di vita: 92 bambini (56,1%)

7.6 CITOLOGIA NASALE E ALIMENTAZIONE LATTEA

Ultimo importante passo dell'analisi statistica dei dati è la correlazione tra cellularità nasale riscontrata nei campioni dei due periodi ed alimentazione lattea del bambino nel primo anno di vita. Si è quindi proceduto per quanto concerne le linee cellulari indagate in precedenza che hanno fatto riscontrare differenze significative tra le due fasi del prelievo citologico, ad indagare quale fosse la possibile influenza del tipo di alimentazione lattea del bambino.

- Per quanto concerne le cellule ciliate, si è riscontrata una differenza significativa in base al tipo di allattamento predominante ed anche alla durata dell'allattamento al seno: un maggior numero di campioni con bassa numerosità nei soggetti con allattamento al seno con durata in mesi maggiore, quindi rapporto inversamente proporzionale ($p < 0,05$).

Il dato statistico è stato ottenuto dividendo ulteriormente il campione sia in questa analisi che nelle successive, in base alla durata in termini di mesi dell'allattamento al seno:

- Inizialmente (gruppi contrassegnati da cat2) il campione è stato suddiviso in due gruppi in base a durata di allattamento al seno minore o maggiore di 6 mesi;
- Mentre in seconda analisi (nella classificazione cut4) il campione è stato ulteriormente stratificato in 4 categorie in base alla durata dell'allattamento al seno in mesi nel primo anno di vita: gruppo 1 durata <

4 mesi, gruppo 2 durata compresa tra 5 e 7 mesi, gruppo 3 durata compresa tra 7 e 9 mesi e gruppo 4 infine con durata maggiore di 9 mesi.

Ecco i dati ottenuti esemplificati in tabella per maggior chiarezza:

Allattamento al seno più di 6 mesi/ cell. ciliate (cat2) p<0,05	Fase I	Fase II
+ / ++	12	40
+++ / +++++	84	56

- Per quanto concerne le cellule mucipare, non si è riscontrata una differenza significativa in base al tipo di allattamento predominante ($p=0,8$) e nemmeno alla durata dell'allattamento al seno: un maggior numero di campioni con bassa numerosità nei soggetti con allattamento al seno con durata in mesi maggiore, quindi rapporto inversamente proporzionale ma non significativo ($p=0,6$ per cat2; $p=0,8$ per cut4).
- Per quanto concerne i neutrofili, si è riscontrata una differenza significativa in base al tipo di allattamento predominante ed alla durata dell'allattamento al seno: un maggior numero di campioni con alta numerosità nei soggetti con allattamento al seno con durata in mesi maggiore, quindi rapporto direttamente proporzionale (cat2 $p=0,05$).

Allattamento al seno più di 6 mesi/ neutrofili (cat2) p=0,05	Fase I	Fase II
0/+ /+++	72	42
+++ /+++++	24	54

- Per quanto concerne i batteri, si è riscontrata una differenza significativa in base al tipo di allattamento predominante ed alla durata dell'allattamento al seno: un maggior numero di campioni con alta numerosità nei soggetti con allattamento al seno con durata in mesi minore, quindi rapporto inversamente proporzionale (p=0,046; p=0,038).

Allattamento al seno meno di 6 mesi/ batteri (cat2) p=0,046	Fase I	Fase II
0/+ /+++	72	42
+++ /+++++	24	54

Non sono state riscontrate altre tendenze significative in base all'allattamento al seno o alla durata nel corso del primo anno di vita per le altre linee cellulari (p>0,05).

8. DISCUSSIONE

Lo studio ha permesso come previsto l'analisi del campione di mucosa nasale del neonato e del bambino al primo anno di vita e la correlazione tra la possibile variabilità delle popolazioni cellulari osservate e gli specifici aspetti anamnestici raccolti, in particolare la tipologia di alimentazione lattea durante il primo anno di vita. Il campione raccolto infatti risponde ai criteri posti e l'abbandono è risultato non influente ai fini dell'analisi statistica (6,8% del campione).

In primo luogo i risultati dello studio hanno mostrato una statisticamente significativa tendenza nel corso del primo anno di vita, alla diminuzione delle cellule ciliate, un aumento delle cellule mucipare, dei granulociti neutrofili e dei batteri a livello della mucosa nasale ($p < 0,05$).

Questi dati concordano con quanto atteso in base alla Letteratura Internazionale per quanto atteso nel soggetto adulto e quindi in rapporto alla crescita ed al fisiologico cambiamento dell'assetto citologico della mucosa nasale.

L'esposizione continua a fattori infiammatori, infettivi e irritativi a livello della mucosa nasale determina un danno citopatico proprio a carico delle cellule ciliate causandone un corteo di modificazioni strutturali, racchiuse sotto il termine di ciliocitoforia [9].

Questo spiegherebbe come anche nel campione analizzato le cellule ciliate lasciano via via il posto alle cellule mucipare con un concomitante aumento della numerosità di cellule di granulociti neutrofili e di batteri.

Questo dato, peraltro in base all'analisi statistica effettuata ed in concordanza con i dati della Letteratura Internazionale in merito, andrebbe di pari passo con le significatività riscontrate nel confronto proprio tra questa variazione della cellularità nella citologia nasale dei due campioni nei due diversi tempi e i dati raccolti dalle anamnesi mediante questionario ai genitori.

La diminuzione delle cellule ciliate, l'aumento di quelle mucipare e della componenti infiammatoria-infettiva di granulociti neutrofili e batteri, si correla in modo significativo con:

- per quanto concerne le cellule ciliate un rapporto inversamente proporzionale con la presenza di dermatite ($p= 0,038$) e flogosi ricorrente delle alte vie aeree ($p < 0,05$);
- per quanto concerne cellule mucipare e granulociti neutrofili un rapporto direttamente proporzionale con la presenza di flogosi ricorrente delle alte vie aeree ($p < 0,05$).

Va precisato che la valutazione di tutte le altre eventuali associazioni esistenti tra la citologia nasale e specifici aspetti anamnestici (esposizione a fumo passivo, presenza in famiglia di fratelli maggiori, frequenza della collettività e anamnesi patologica del primo anno di vita positiva per dermatite atopica, reflusso, rinite frequente, otite media acuta, flogosi delle alte vie aeree e wheezing) non ha evidenziato altre correlazioni statisticamente significative ($p > 0,5$).

Per quanto concerne invece l'allattamento al seno il campione analizzato ha mostrato buoni tassi di allattamento al seno sia esclusivo che complementato. L'analisi è stata mirata, come da finalità dello studio, ad interpretare una possibile correlazione tra variazione del rinocitogramma nel primo anno di vita e tipo e durata di alimentazione latte.

L'effetto protettivo dose dipendente dell'allattamento al seno nei confronti di molteplici patologie è grandemente documentato nella Letteratura Scientifica Internazionale. Come descritto con un precoce allattamento al seno la mamma trasmette al neonato un pool di molecole bioattive come immunoglobuline specifiche ed altri elementi immunologici per la difesa dell'organismo che proseguono la loro funzione protettiva e preventiva per tutta la durata dell'allattamento [1]. Alcuni Studi si sono incentrati sulla possibile influenza dell'allattamento al seno, sulla diminuita incidenza di patologie infettive delle alte vie aeree. In particolare, una storia di allattamento al seno per più di tre mesi è associata ad un rischio inferiore alla restante popolazione di sviluppare otite fino al 50%; il rischio di ospedalizzazione per infezione delle basse vie respiratorie nel primo anno di vita è ridotto del 73% nei bambini allattati esclusivamente al seno per più di quattro mesi; in caso di bronchiolite da virus respiratorio sinciziale (RSV), il quadro clinico nei bambini allattati esclusivamente al seno è meno grave, con una minor durata dell'ospedalizzazione e una minor necessità di ossigenoterapia [32-33-35-42]. Infine la Letteratura degli ultimi anni ha proprio puntato l'attenzione sulla possibile influenza diretta tra latte materno, durata dell'allattamento al seno e vie aeree studiate dal punto microscopico e infettivologico: correlazione tra microbiota della mucosa nasale e allattamento al seno [47].

In quest'ottica i risultati dello studio hanno evidenziato una variazione statisticamente significativa non univoca per quanto concerne la citologia nasale in relazione alla tipologia di alimentazione latte assunta nel primo anno di vita: hanno mostrato infatti una correlazione inversamente proporzionale tra la durata dell'allattamento al seno e la diminuzione della numerosità delle cellule ciliate, dato che, come descritto in precedenza, rientra nel processo di cambiamento fisiologico della mucosa nasale ($p < 0,05$) ed inoltre non hanno evidenziato differenza significativa nell'aumento del numero di cellule mucipare in relazione al tipo o alla durata dell'allattamento al seno ($p = 0,87$).

Correlazione invece direttamente proporzionale tra tipologia, ed anche durata dell'allattamento al seno, e l'aumento della numerosità di granulociti neutrofili nel rinocitogramma analizzato ($p = 0,05$). Dato forse da correlare, come detto in precedenza, probabilmente con l'ipotesi della stimolazione ambientale dei fattori irritanti-infettivi.

Infine ad avvalorare l'ipotesi protettiva dell'allattamento al seno nei confronti della mucosa nasale i dati analizzati mostrano un rapporto significativo e inversamente proporzionale tra allattamento al seno assente o limitato nel tempo e numerosità di flora batterica ($p = 0,038$ e $p = 0,046$). Questo dato confermerebbe infatti il ruolo anti-infettivo del latte materno dovuto alla ricchezza di componenti ad azione immunologica e alla sua azione protettiva nei confronti della mucosa nasofaringea e del suo microbiota [47].

Concludendo e mettendo in relazione i dati ottenuti dall'analisi del rinocitogramma con i dati anamnestici riguardo patologie respiratorie o allergiche con quelli riguardanti l'allattamento al seno, emerge quindi come una diminuzione fisiologica

della numerosità di cellule ciliate sia in associazione con un aumento del riscontro di dermatite e di frequenza di infezioni delle vie aeree superiori nonché di una maggiore durata di allattamento al seno; mentre, tale correlazione non è valida per quanto concerne l'aumento della numerosità delle cellule mucipare. Le cellule di granulociti neutrofili aumentano nel tempo ed in relazione ai casi ricorrenti di flogosi delle alte vie aeree e ad una maggiore durata di allattamento al seno; mentre una minor durata di tale allattamento correla con un aumento della numerosità nel campione di flora batterica e delle infezioni delle alte vie aeree.

Tali dati risulterebbero in linea con quanto riportato dalla Letteratura recente, ma andrebbero confermati con l'analisi mirata del microbiota e della componente infiammatoria della mucosa nasale [47].

9. CONCLUSIONE

Lo studio ha analizzato la cellularità nasale del neonato, ambito di applicazione della citologia nasale ancora poco conosciuto e scarsamente riportato nella Letteratura Scientifica, descrivendone una struttura diversa da quanto descritta in Letteratura per l'adulto e proprio in quest'ottica la rivalutazione del rinocitogramma della mucosa nasale al compimento del primo anno di vita, ha consentito la valutazione dei fisiologici cambiamenti della citologia nasale caratteristici per l'età pediatrica: riduzione nel numero delle cellule ciliate e aumento delle cellule neutrofile, mucipare e della componente batterica. La metodica si è confermata essere anche per l'età pediatrica, una tecnica economica, di facile impiego, scarsamente invasiva e ripetibile.

Le variazioni ed il cambiamento della citologia nasale nel bambino nel primo anno di vita è stata quindi posta in relazione con l'azione nota protettiva dell'allattamento al seno: ipotesi confermata. I dati hanno evidenziato come un prolungato allattamento al seno correli con una fisiologica diminuzione della numerosità di cellule ciliate, un aumento della componente immunologica, i granulociti neutrofilo, e come un diminuito periodo di assunzione di latte materno correli invece con un aumento della flora batterica. Inoltre la variazione della componente cellulare e l'aumento della parte infiammatoria-infettiva correla, oltre che con la durata dell'allattamento al seno, con la presenza ed il rischio di dermatite e flogosi delle alte vie aeree: il tutto ad avvalorare l'importanza dell'analisi nello specifico dei meccanismi che regolano l'azione protettiva del latte materno sulla mucosa respiratoria.

Una valutazione dettagliata della componente immunologica e del microbiota della mucosa nasale, potrà porre ulteriore chiarezza sui termini dell'effetto protettivo del latte materno sulla mucosa nasale del bambino.

Il proseguimento dello studio, con il possibile aumento della popolazione arruolata, la valutazione degli ulteriori dati anamnestici riguardanti aspetti immuno-infettivologici associato anche al dato della sensibilizzazione allergica, potrà mettere ancora più in chiaro gli aspetti protettivi sulla mucosa nasale dell'allattamento al seno.

10. BIBLIOGRAFIA

1. LA Hanson. "Breast-feeding and immune function". *Proc Nutr Soc.* 2007 Aug; 66(3): 384-96.
2. M. Gelardi, G. Luigi Marseglia, A. Licari, M. Landi, I. Dell'Albani, C. Incorvaia, F. Frati, and N. Quaranta, "Nasal cytology in children: recent advances", *Ital J Pediatr.* 2012 Sep; 25:38-51
3. G. Ciprandi, M. Milanese, M. A. Tosca, I. Cirillo, A. Vizzaccaro, and V. Ricca, "Nasal eosinophils correlate with FEV1 in patients with perennial allergic rhinitis associated to asthma", *Eur. Ann. Eur Ann Allergy Clin Immunol.* 2004 Dec;36(10):363-5.
4. Sala O, Marchiori C, Soranzo G "Nasal cytology in the diagnosis of chronic rhinitis in children" *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 1988;8 Suppl 19:25-33.
5. Berger G, Kogan T, Paker M, Berger-Achituv S, Ebner Y " Pediatric chronic rhinosinusitis histopathology: differences and similarities with the adult form". *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2011 Jan;144(1):85-90
6. M. Gelardi, P. Cassano, M. Cassano, and M. L. Fiorella, "Nasal Cytology : Description of a Hyperchromatic Supranuclear Stria as a Possible Marker for the Anatomical and Functional Integrity of the Ciliated Cell" *Am J Rhinol.* 2003 Sep-Oct;17(5):263-8.
7. M. Gelardi, M. L. Fiorella, G. Leo, and C. Incorvaia, "Cytology in the diagnosis of rhinosinusitis", *Pediatr Allergy Immunol.* 2007 Nov;18 Suppl 18:50-2.
8. J. Shinogi, Y. Majima, K. Takeuchi, T. Harada, and Y. Sakakura, "Quantitative cytology of nasal secretions with perennial allergic rhinitis in children: comparison of non infected and infected conditions" *Laryngoscope.* 1998 May;108(5):703-5.
9. C. Chapelin, A. Coste, L. Gilain, F. Poron, F. Verra, and E. Escudier, "Modified epithelial cell distribution in chronic airways inflammation" *Eur Respir J.* 1996 Dec;9(12):2474-8.

10. Gelardi, Landi “La citologia nasale nell’approccio diagnostico-terapeutico delle riniti vasomotorie in età pediatrica” RIAIP 2011; 05: 28,34
11. Gelardi M, Fiorella ML, Fiorella R, Russo C, Passalacqua G ”When allergic rhinitis is not only allergic” Am J Rhinol Allergy. 2009 May-Jun;23(3):312-5.
12. Marseglia GL, Incorvaia C, La Rosa M, Frati F, Marcucci F “Sublingual immunotherapy in children: facts and needs” Ital J Pediatr. 2009 Oct 23;35(1):31.
13. Ballard, Morrow “Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors” Pediatr Clin North Am. 2013 Feb; 60(1): 49–74.
14. Shehadeh N, Aslih N, Shihab S, Werman MJ, Sheinman R, Shamir R. “Human milk beyond one year post-partum: lower content of protein, calcium and saturated very long-chain fatty acids”. J Pediatr. 2006 Jan;148(1):122-4.
15. Johnston M, Landers S, Noble L, Szucs K, Viehmann L. “Breastfeeding and the use of human milk” Pediatrics. 2012 Mar;129(3):e827-41.
16. WHO. Global Strategy for infant and young child feeding. Geneva: 2003.
17. Minda H, Kovács A, Funke S, Szász M, Burus I, Molnár S, Marosvölgyi T, Decsi T. “Changes of fatty acid composition of human milk during the first month of lactation: a day to day approach in the first week” Ann Nutr Metab. 2004;48(3):202-9.
18. Schack-Nielsen L and Michaelsen KF “Advances in our understanding of biology of human milk and its effects on the offspring” J Nutr. 2007 Feb;137(2):503S-510S.
19. Gil A “Modulation of immune response mediated by dietary nucleotides” European Journal of Clinical Nutrition, Eur J Clin Nutr. 2002 Aug;56 Suppl 3:S1-4.
20. Wharton B, Morley R, Isaacs E, Cole T, Lucas A “Low plasma taurine and later neuro development” Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2004 Nov;89(6):F497-8.
21. Lonnerdal B “Nutritional roles of lactoferrin” Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2009 May 12 (3):293-297
22. Newburg David S. “Oligosaccharides in Human Milk and Bacterial Colonization” J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2000;30 Suppl 2:S8-17.
23. Hanson LA “Session 1: Feeding and infant development breast-feeding and immune function” Proc Nutr Soc. 2007 Aug;66(3):384-96.

24. Kent JC1, Mitoulas LR, Cregan MD, Ramsay DT, Doherty DA, Hartmann PE. "Volume and frequency of breastfeedings and fat content of breast milk throughout the day" *Pediatrics*. 2006 Mar;117(3):e387-95.
25. Jan Philipp Schuchardt, Michael Huss, Manuela Strauss-Grabo, Andreas Hahn "Significance of long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFAs) for the development and behavior of children" *Eur J Pediatr*. 2010 Feb;169(2):149-64
26. Agostoni C, Marangoni F, Lammardo AM, Giovannini M, Riva E, Galli C. "Breastfeeding duration, milk fat composition and developmental indices at 1 year of life among breastfed infants" *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2001 Feb;64(2):105-9.
27. Lawrence M, Gartner MD, Frank R, Greer MD "Prevention of Rickets and vitamin D deficiency: new guidelines for vitamin D intake" *Pediatrics*. 2003 Apr;111(4 Pt 1):908-10.
28. MF Picciano "Nutrient Composition of human milk" *Pediatr Clin North Am*. 2001 Feb;48(1):53-67.
29. Domellöf M, Lönnerdal B, Dewey KG, Cohen RJ, Hernell O. "Iron, Zinc and Copper concentration in breast milk are independent of maternal mineral status" *Am J Clin Nutr*. 2004 Jan;79(1):111-5.
30. Ortega RM, Martínez RM, Quintas ME, López-Sobaler AM, Andrés P. "Calcium levels in maternal milk: relationships with calcium intake during the third trimester of pregnancy" *Br J Nutr*. 1998 Jun;79(6):501-7.
31. Krebs NF. "Dietary zinc and iron sources: growth and cognitive development in breastfed infants" *J Nutr*. 2000 Feb;130(2S Suppl):358S-360S.
32. Johnston M, Landers S, Noble L, Szucs K, Viehmann L. "Breastfeeding and the use of human milk" *Pediatrics*. 2012 Mar;129(3):e827-41.
33. Yun Kyung Choi, Ji-Myung Kim, Ji-Eun Lee, Mi Sook Cho, Bong Soo Kang, Hyeon Choi, Yuri Kim "Association of Maternal Diet With Zinc, Copper, and Iron Concentrations in Transitional Human Milk Produced by Korean Mothers" *Clin Nutr Res*. 2016 Jan;5(1):15-25
34. Chris Gale, Karen M Logan, Shalini Santhakumaran, James RC Parkinson, Matthew J Hyde, and Neena Modi "Effect of breastfeeding compared with

- formula feeding on infant body composition: a systematic review and meta-analysis” *Am J Clin Nutr* 2012 Mar;95(3):656–69
35. Patricia Palmeira, Mag da Carneiro-Sampa “Immunology of breast milk” *Rev Assoc Med Bras* (1992). 2016 Sep;62(6):584-593.
 36. Teresa Grzelak, Urszula Woźniak, Krystyna Czyżewska ”The influence of natural feeding on human health: short- and long-term perspectives” *Prz Gastroenterol*. 2014;9(1):4-10.
 37. Lamberti LM, Zakarija-Grković I, Fischer Walker CL, Theodoratou E, Nair H, Campbell H, Black RE. “Breastfeeding for reducing the risk of pneumonia morbidity and mortality in children under two: a systematic literature review and meta-analysis” *BMC Public Health*. 2013;13 Suppl 3:S18.
 38. Jackson S1, Mathews KH, Pulanic D, Falconer R, Rudan I, Campbell H, Nair H. ”Risk factors for severe acute lower respiratory infections in children: a systematic review and meta-analysis” *Croat Med J*. 2013 Apr;54(2):110-21.
 39. Newburg DS “Do the binding properties of oligosaccharides in milk protect human infants from gastrointestinal bacteria?” *J Nutr*. 1997 May;127(5 Suppl):980S-984S.
 40. Munblit D, Peroni DG, Boix-Amorós A, Hsu PS, Van't Land B, Gay MCL, Kolotilina A, Skevaki C, Boyle R, Collado MC, Garssen J, Geddes DT, Nanan R, Slupsky C, Wegienka G, Kozyrskyj AL, Warner JO “Human Milk and Allergic Diseases: An Unsolved Puzzle” *Nutrients*. 2017 Aug 17;9(8).
 41. Hill DR, Newburg DS. “Clinical applications of bioactive milk components” *Nutr Rev*. 2015 Jul;73(7):463-76.
 42. Luan NN, Wu QJ, Gong TT, Vogtmann E, Wang YL, Lin B. “Breastfeeding and ovarian cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies” *Am J Clin Nutr*. 2013 Oct; 98(4):1020-31.
 43. Berens P, Labbock M “ABM Clinical Protocol#13: Contraception during breastfeeding, Revises 2015” *Breastfeed Med*. 2015 Jan-Feb;10(1):3-12
 44. Pokhrel S, Quigley MA, Fox-Rushby J, McCormick F, Williams A, Trueman P, Dodds R, Renfrew MJ “Potential economic impacts from improving breastfeeding rates in the UK” *Arch Dis Child*. 2015 Apr;100(4):334-40

45. Cattaneo A, Ronfani L, Burmaz T, Quintero-Romero S, Macaluso, Di Mario S. "Infant feeding and cost of health care: a cohort study" *Acta Paediatr.* 2006 May; 95(5):540-6.
46. K. V. ZaitsevS. A. MezheritskiiN. P. StepanenkoA. A. GostyukhinaO. B. ZhukovaE. I. Kondrat'evaI. A. StepanovaA. N. DzyumanE. E. NikolaevskayaV. A. Vorob'evN. G. AbdulkinaA. A. ZaitsevS. Yu. Yur'evO. P. KorshunovaL. S. LitvinovaI. A. Khlusov "Immunological and Phenotypic Characterization of Cell Constituents of Breast Milk" *Cell and Tissue Biology* September 2016; 10 (5): pp 410–415
47. Biesbroek G1, Bosch AA, Wang X, Keijser BJ, Veenhoven RH, Sanders EA, Bogaert D. "The impact of breastfeeding on Nasopharyngeal Microbial Communities in Infant" *Am J Respir Crit Care Med.* 2014 Aug 1;190(3):298-308.
48. J. Penders, C. Thijs, C. Vink, FF Stelma, B Snijders, I. Kummeling, PA. van den Brandt, EE. Stobbering "Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy" *Pediatrics* 2006 Aug; 118(2):511-521.
49. Mackie RI1, Sghir A, Gaskins HR. "Developmental Microbial Ecology of the Neonata GIT" *Am J Clin Nutr.* 1999 May;69(5):1035S-1045S.
50. H. Bisgaard, N. Li, K. Bonnelykke, B. L. K. Chawes, T. Skov, G. PaludanMüller, J. Stokholm, B. Smith, and K. A. Krogfelt "Reduced diversity of the intestinal microbiota during infancy is associated with increased risk of allergic disease at school age" *J Allergy Clin Immunol.* 2011 Sep;128(3):646-52.e1-5.
51. A. L. Kozyrskyj, S. Bahreinian, and M. B. Azad "Early life exposures: impact on asthma and allergic disease" *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2011 Oct;11(5):400-6.
52. P. M. Munyaka, E. Khafipour, and J.-E. Ghia "External influence of early childhood establishment of gut microbiota and subsequent health implications" *Front Pediatr.* 2014 Oct 9;2:109.
53. D. Daley "The evolution of the hygiene hypothesis: the role of early-life exposures to viruses and microbes and their relationship to asthma and allergic diseases" *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2014 Oct;14(5):390-6

54. M. Pistiner, D. R. Gold, H. Abdulkerim, E. Hoffman, and J. C. Celedén “ Birth by cesarean section, allergic rhinitis, and allergic sensitization among children with a parental history of atopy” *J Allergy Clin Immunol*. 2008 Aug;122(2):274-9.
55. G. Wegienka, E. Zoratti, and C. C. Johnson “The Role of the Early-Life Environment in the Development of Allergic Disease” *Immunol Allergy Clin North Am*. 2015 Feb;35(1):1-17.
56. S. Thavagnanam, J. Fleming, A. Bromley, M. D. Shields, and C. R. Cardwell “A meta-analysis of the association between Caesarean section and childhood asthma” *Clin Exp Allergy*. 2008 Apr;38(4):629-33.
57. H. Renz-Polster, M. R. David, A. S. Buist, W. M. Vollmer, E. A. O’Connor, E. A. Frazier, and M. A. Wall. “Caesarean section delivery and the risk of allergic disorders in childhood” *Clin Exp Allergy*. 2005 Nov;35(11):1466-72.
58. J. H. Seo, H. Y. Kim, Y. H. Jung, E. Lee, S. I. Yang, H. S. Yu, Y. J. Kim, M. J. Kang, H. J. Kim, K. S. Park, J. W. Kwon, B. J. Kim, H. Bin Kim, E. J. Kim, J. S. Lee, S. Y. Lee, and S. J. Hong “Interactions between innate immunity genes and early-life risk factors in allergic rhinitis” *Allergy Asthma Immunol Res*. 2015 May;7(3):241-8