

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA



**Università
di Genova**

Tesi di Dottorato in Scienze della Salute
Curriculum Epidemiologia e Prevenzione vaccinale

**Caratterizzazione clinica ed epidemiologica del Virus
Respiratorio Sinciziale (RSV) in adulti over 50:
Studio RESPIRA-50**

XXXVIII ciclo di Dottorato di Ricerca

Candidata: Dott.ssa Giada Garzillo

Matricola: 4789907

Relatore: Prof. Giancarlo Icardi

Relatore: Prof. Andrea Orsi

Correlatore: Dott.ssa Bianca Bruzzone

Correlatore: Dott.ssa Valentina Ricucci

Anno accademico 2024/2025



Abstract

Il virus respiratorio sinciziale (RSV) è comunemente noto come causa di infezioni respiratorie gravi nei bambini, ma la sua importanza come agente patogeno negli adulti, in particolare nei pazienti di età avanzata, è spesso sottovalutata. RSV provoca comunemente sintomi lievi simili al raffreddore e le persone che lo contraggono solitamente guariscono in una settimana circa senza bisogno di cure mediche. Tuttavia, nei neonati di età inferiore ai sei mesi, nelle persone di età superiore ai 50 anni e, soprattutto, nelle persone con un sistema immunitario compromesso, RSV può causare malattia grave e, in alcuni casi, anche decesso del paziente. Nell'UE, in Norvegia e nel Regno Unito, RSV causa ogni anno il ricovero ospedaliero di circa 213 000 bambini sotto i cinque anni, alcuni dei quali necessitano di cure intensive, e di circa 158 000 adulti ogni anno. Ogni anno in Europa una persona di oltre 50 anni su venti contrae un'infezione da RSV.

A differenza dell'influenza, l'andamento epidemiologico di RSV acquisito in comunità in pazienti adulti ambulatoriali è ancora poco documentato. Una delle sfide principali per la sorveglianza e la gestione clinica dell'RSV negli adulti risiede nell'identificazione di una efficace definizione di caso. Spesso, le piattaforme di sorveglianza esistenti si basano sulla definizione di "sindrome simil-influenzale" (ILI), ma non è chiaro se questa sia idonea per includere i casi di RSV. Per colmare questa lacuna, il mio lavoro di tesi si è occupato di indagare questi aspetti attraverso lo studio prospettico "RESPIRA-50", un progetto biennale iniziato nel 2023 con gli obiettivi primari di identificare una definizione di caso ottimale per l'RSV, di esplorare in dettaglio l'andamento di questa infezione nella popolazione adulta e di caratterizzare le varianti virali con metodi molecolari.

I risultati dello studio RESPIRA-50 suggeriscono che una sorveglianza basata sulla sindrome simil-influenzale (ILI) potrebbe sottostimare in modo significativo il vero carico di malattia legato all'RSV negli adulti di età pari o superiore a 50 anni. La definizione di caso ARI, che include una più ampia gamma di sintomi respiratori acuti, sembrerebbe invece essere più adatta a catturare i casi di RSV in questa popolazione.

L'elevata incidenza di complicazioni, come bronchite e polmonite, nella popolazione di pazienti ambulatoriali oggetto del mio studio, evidenzia che l'RSV non è una malattia benigna negli adulti anziani. L'onere clinico ed economico associato a queste complicanze è considerevole, con un conseguente consumo sostanziale di risorse sanitarie. Questo studio sottolinea la necessità di migliorare i sistemi di sorveglianza e di sviluppare strategie di prevenzione mirate, come i vaccini, per proteggere gli adulti vulnerabili da questa infezione. I dati raccolti in questa

tesi costituiscono una base importante per le ricerche future, con l'obiettivo di definire in modo più preciso l'impatto clinico ed epidemiologico dell'RSV negli adulti e ottimizzare le strategie di sorveglianza e gestione clinica.

INDICE

1	INTRODUZIONE	6
1.1.	Infezioni respiratorie.....	6
1.1.1.	Storia evolutiva delle infezioni respiratorie.....	8
1.1.2.	Epidemiologia e sorveglianza sanitaria.....	8
1.2.	Virus respiratori.....	11
1.2.1.	Virus influenzale.....	11
1.2.2.	SARS-CoV-2 e pandemia da COVID-19.....	13
1.3.	Virus respiratorio sinciziale (RSV).....	14
1.3.1.	Genoma e replicazione.....	15
1.3.2.	Patogenesi.....	19
1.3.3.	Terapia.....	21
1.3.4.	Prevenzione.....	23
1.3.5.	Epidemiologia.....	25
2	SCOPO DELLA TESI	27
3	MATERIALI E METODI	29
3.1	Design dello studio e selezione dei partecipanti.....	29
3.2	Raccolta dei campioni.....	30
3.3	Analisi dei campioni.....	31
3.3.1	Estrazione dell'acido nucleico e RT-PCR.....	31
3.3.1.1	Allplex Respiratory Panels 1–4.....	32
3.3.1.2	Allplex SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV.....	33
3.3.1.3	Test rapido antigenico (RADT).....	34
3.3.2	Sequenziamento.....	35
3.3.2.1	Sequenziamento NGS.....	35
3.3.2.2	Sequenziamento Sanger.....	37
3.4	Statistica.....	39
4	RISULTATI	40
4.1	Risultati stagione 2023/2024.....	40
4.2	Risultati stagione 2024/2025.....	50
5	DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	57
5.1	Discussione.....	57
5.2	Conclusioni.....	61
6	BIBLIOGRAFIA	62
7	RINGRAZIAMENTI	72

1. INTRODUZIONE

1.1 Infezioni respiratorie

Le infezioni respiratorie (respiratory tract infections, RTI) sono tra le principali cause di morbosità e mortalità a livello globale. Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), le infezioni acute delle vie respiratorie inferiori causano circa 2,5 milioni di morti ogni anno, con una particolare incidenza nei bambini sotto i 5 anni e negli anziani [1]. Le infezioni comprendono un ampio spettro di malattie infettive che coinvolgono le vie aeree superiori (naso, faringe, laringe) e inferiori (bronchi, bronchioli, alveoli) [1,2]. Si distinguono comunemente tra:

- Infezioni del tratto respiratorio superiore (URTI, upper respiratory tract infections) — ad esempio rinite, faringite, laringite, sinusite;
- Infezioni del tratto respiratorio inferiore (LRTI, lower respiratory tract infections) — ad esempio bronchite, bronchiolite, polmonite, esacerbazione di BPCO, tubercolosi polmonare.

Un'ulteriore distinzione riguarda le infezioni “comunitarie”, acquisite in comunità e le infezioni “nosocomiali”, acquisite in ospedale. Esse possono essere “acute” se relative ad un tempo preciso e risolte in brevi periodi (come nel caso di infezioni respiratorie causate dal virus dell'influenza), oppure “croniche/ricorrenti” quando un soggetto mostra una condizione respiratoria recidivante [2].

Le infezioni respiratorie possono essere causate da un numero considerevole di patogeni respiratori come virus, batteri, funghi e parassiti. [3] Essi possono penetrare attraverso vie di trasmissioni altamente contagiose (*droplets*, superfici contaminate) e diffondersi velocemente tra diversi soggetti.

Le infezioni respiratorie acute sono tra le malattie più frequenti a prescindere dalla fascia d'età [2]. Nei bambini sotto i 5 anni, le forme respiratorie acute rappresentano una delle prime cause di mortalità per malattie infettive: si stimano, infatti, oltre 4 milioni di decessi annui associati alle infezioni respiratorie [1,2]. Negli adulti, le infezioni polmonari che colpiscono le basse vie respiratorie (polmonite, bronchite grave) sono fra le principali cause di ospedalizzazione e morte [3]. La polmonite acquisita in comunità (*community-acquired pneumonia*, CAP) rimane una delle principali cause di morte per malattia infettiva nel mondo, con un'elevata letalità soprattutto nelle persone anziane e con comorbidità [3].

Queste stime dimostrano quanto le infezioni respiratorie comportino un ingente costo sanitario (ospedalizzazioni, terapie antibiotiche/antivirali, cure intensive), rappresentando ad oggi un importante fardello mondiale per il sistema sanitario. Inoltre, la diffusione globale di antibiotico-resistenza, l'emergenza di nuovi patogeni virali (es. SARS-CoV-2) e l'invecchiamento demografico rendono il problema sempre attuale e in evoluzione [4].

La gravità delle infezioni respiratorie, però, impatta in modo differente a seconda del reddito e delle condizioni igieniche del paese, dove la mortalità infantile e l'accesso alle cure sono limitati [5].

Negli ultimi decenni si sono osservati cambiamenti epidemiologici legati a cambiamenti demografici (invecchiamento, urbanizzazione), modifiche nei fattori di rischio (fumo, inquinamento atmosferico, condizioni socioeconomiche, livelli di immunodepressione, HIV, terapie immunosoppressive), vaccinazioni (per es. vaccino pneumococcico, vaccini antinfluenzali) che hanno modificato la circolazione di ceppi batterici/virali e ridotto mortalità/resistenza, interventi di protezione individuale non farmacologici, come quelli introdotti durante la pandemia COVID-19 (mascherine, distanziamento, igiene delle mani) che hanno influenzato anche la circolazione di altri virus respiratori [6]. Tutti questi fattori impattano in modo importante sull'andamento e l'epidemiologia delle infezioni respiratorie: in Cina, ad esempio, dopo la pandemia, la prevalenza e stagionalità dei patogeni respiratori ha subito variazioni significative [6]. In Giappone, invece, studi su kit PCR multiplex durante la pandemia da COVID-19, hanno dimostrato come molti virus respiratori siano significativamente meno rappresentati e sia diventata predominante la presenza di SARS-CoV-2, soprattutto in alcune fasce di età [7].

La rapida diffusione dei patogeni respiratori tra le diverse popolazioni a rischio è favorita dalla modalità con cui essi si trasmettono. La trasmissione delle infezioni respiratorie, infatti, avviene prevalentemente per via aerea, attraverso le goccioline respiratorie emesse con tosse, starnuti o conversazioni, ma può avvenire anche per contatto con superfici contaminate [7,8].

Le infezioni respiratorie possono essere causate da batteri, virus, funghi e parassiti ma le più diffuse sono le infezioni virali. Il solo virus influenzale è responsabile di circa 290.000-650.000 morti all'anno nel mondo [8], mentre il virus respiratorio sinciziale si stima causi circa 3,6 milioni di ricoveri ospedalieri e circa 100.000 morti infantili all'anno [9]. Anche la flora batterica residente può influenzare la suscettibilità, la severità e il decorso: cambiamenti nella diversità e composizione della flora batterica locale sono stati associati ad un aumento di infezioni respiratorie [3].

1.1.1 Storia evolutiva delle infezioni respiratorie

La storia evolutiva delle infezioni respiratorie è strettamente legata all'evoluzione umana, ai cambiamenti demografici e ambientali, e alla continua co-evoluzione tra patogeni e ospite. Il tratto respiratorio umano presenta difese innate e acquisite per resistere all'instaurarsi di potenziali infezioni esogene ma i patogeni respiratori continuano ad evolversi per eludere il sistema immunitario e persistere nella popolazione [10].

L'evoluzione dei patogeni respiratori è stata accelerata dai grandi cambiamenti: basti pensare all'aumento della densità di popolazione, che ha incrementato la frequenza del contatto ospite-ospite e favorito la trasmissione e la persistenza dei virus respiratori epidemici. Altro fattore importante per l'evoluzione delle infezioni respiratorie è la capacità di effettuare salti interspecie nelle zoonosi, dove il patogeno generalmente infetta animali ma, ad un certo punto, acquisisce la capacità di infettare l'uomo per la prima volta (es. Influenza e Coronavirus) [11].

1.1.2 Epidemiologia e sistemi di sorveglianza

L'epidemiologia studia la distribuzione e la frequenza delle malattie e delle condizioni o eventi legati alla salute in popolazioni ben definite, nonché l'applicazione di questo studio serve per valutare l'andamento della condizione nella popolazione [12]. Il fine dell'epidemiologia è quello di studiare come è distribuita una condizione all'interno di una determinata popolazione, individuando gli eventuali fattori di rischio, rendendo possibile introdurre nuove strategie terapeutiche al fine di contrastare l'andamento della condizione. Questo sistema è applicabile in più campi della medicina: esso, infatti, spazia dall'oncologia alle malattie infettive [13].

Per creare una rete di scambio di informazioni, sono nati i sistemi di sorveglianza delle malattie infettive ovvero reti che raccolgono, analizzano e diffondono dati su casi di malattie per monitorarne l'andamento, orientare interventi di sanità pubblica, verificarne l'efficacia e identificare fattori di rischio. Uno dei sistemi italiani per sorvegliare l'andamento delle malattie infettive in comunità è il Sistema informativo delle malattie infettive (Simi), basato sulle segnalazioni dei medici [14]. Il sistema comprende segnalazioni immediate per allertare gli operatori di sanità pubblica e riepiloghi mensili di tutte le malattie infettive notificate, compilati da ogni Azienda sanitaria locale. Il Simi è stato ridefinito nel Decreto ministeriale - 15 dicembre 1990. Oltre al Simi, le altre componenti del sistema di sorveglianza delle malattie infettive sono i sistemi di sorveglianza speciale per le meningiti, la legionellosi, l'influenza, la malattia di Creutzfeldt-Jacob, salmonellosi E.Coli O157 VTEC e Campylobacter (Enternet), il morbillo

(circolare del 20 aprile 2007), la Rosolia congenita e in gravidanza, le epatiti virali acute (Seieva), le malattie sessualmente trasmesse, l'antibiotico resistenza (Ar-Iss), la sorveglianza delle malattie infettive prevenibili da vaccino (Spes) [15].

Per quanto riguarda le infezioni respiratorie, in Italia, esiste la rete di sorveglianza RespiVirNet, sistema di Sorveglianza Integrata (epidemiologica e virologica) dei casi di sindromi simil-influenzali e dei virus respiratori (prima denominata Influnet). RespiVirNet si basa sulle segnalazioni dei Medici di Medicina Generale (MMG), Pediatri di Libera Scelta (PLS) e Laboratori di Riferimento Regionale per la diagnosi di virus respiratori. La sorveglianza è coordinata dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS) con il sostegno del ministero della Salute [16].

RespiVirNet è attiva a partire dalla 46esima settimana dell'anno fino alla 17esima settimana dell'anno successivo. Essa è una rete sentinella che integra due componenti principali, la sorveglianza epidemiologica e la sorveglianza virologica:

1. Sorveglianza Epidemiologica (RespiVirNet-Epi): ha l'obiettivo di determinare l'inizio, la durata e intensità dell'epidemia stagionale. Un campione di Medici di Medicina Generale (MMG) e Pediatri di Libera Scelta (PLS) (i cosiddetti "medici sentinella"), distribuiti sull'intero territorio nazionale, raccoglie e segnala settimanalmente all'ISS il numero di casi di sindromi simil-influenzali (ILI) osservati tra i propri assistiti, suddivisi per fascia d'età.
2. Sorveglianza Virologica (RespiVirNet-Vir): ha come obiettivo il monitoraggio della circolazione dei diversi virus respiratori. Una rete di Laboratori di Riferimento Regionale analizza campioni biologici (tamponi naso-faringei) prelevati da un sottogruppo di pazienti ILI segnalati dai medici sentinella.

La funzione principale di RespiVirNet è fornire dati in tempo reale per stimare l'impatto della circolazione del patogeno d'interesse, consentendo di identificare i virus respiratori maggiormente circolanti in Italia. L'ISS elabora i dati e produce un rapporto settimanale (RespiNews) per informare il Ministero della Salute, le Regioni e la cittadinanza [15, 16].

RespiVirNet rappresenta l'evoluzione diretta del precedente sistema di sorveglianza italiano denominato Influnet, nato nel 1999 con l'obiettivo specifico di sorvegliare l'influenza stagionale (o sindromi simil-influenzali, ILI) e la circolazione dei soli virus influenzali.

InfluNet si concentrava, quindi, su un unico agente patogeno, sebbene fosse già impostato su un modello integrato (epidemiologico e virologico) a rete sentinella. La necessità di espandere il sistema di sorveglianza è emersa con forza a seguito di due eventi cruciali:

- La pandemia da COVID-19 (SARS-CoV-2): durante la pandemia, il vecchio sistema InfluNet è stato rapidamente adattato (stagione 2020-2021) per includere il monitoraggio del SARS-CoV-2, dimostrando che l'influenza non era l'unica minaccia virale significativa.
- La co-circolazione dei patogeni: l'esperienza pandemica ha evidenziato come le sindromi respiratorie acute (come le ILI) non siano causate solo dal virus influenzale, ma da una complessa co-circolazione di numerosi virus (RSV, rinovirus, adenovirus, ecc.) che hanno un impatto sanitario significativo.

Per rispondere a questa nuova consapevolezza epidemiologica e in linea con le raccomandazioni internazionali (WHO/ECDC), il sistema InfluNet è stato formalmente trasformato in RespiVirNet a partire dalla stagione 2022-2023. L'obiettivo è diventato quello di avere una visione olistica e continuativa di tutti i principali virus respiratori, in un'ottica di preparazione pandemica e gestione stagionale [16].

1.2 Virus respiratori

I virus respiratori sono un gruppo di agenti patogeni responsabili di infezioni che colpiscono il tratto respiratorio umano, includendo il naso, la gola e i polmoni. Questi virus possono causare una vasta gamma di malattie, dalle comuni infezioni delle vie aeree superiori, come il raffreddore, a condizioni più gravi come la polmonite [17]. Alcuni dei virus respiratori più noti includono i virus influenzali, i coronavirus (come il SARS-CoV-2, responsabile della pandemia da COVID-19), ed il virus respiratorio sinciziale (RSV) [18].

1.2.1 Virus dell'Influenza

L'influenza è una malattia infettiva respiratoria acuta causata dal virus dell'influenza (Flu virus), un virus a RNA appartenente alla famiglia degli Orthomyxoviridae. Causa una malattia stagionale, con picco epidemico durante il periodo invernale, che può comportare quadri sintomatologici da lievi a gravi caratterizzati da febbre, dolori ossei e muscolari, rinite, tosse, cefalea e malessere generale. È il principale virus causa di infezioni respiratorie, le cui epidemie stagionali sono associate a morbosità e mortalità elevate [19]. Globalmente, ogni anno, il virus influenzale colpisce tra il 5 e il 15% della popolazione adulta (350 milioni-1 miliardo di persone), un'incidenza che sale al 20-30% nei bambini. Tra i 3 e i 5 milioni di casi di influenza riportati annualmente evolvono in complicanze che causano il decesso in circa il 10% dei casi (250.000-500.000 soggetti), soprattutto tra i gruppi di popolazione a rischio (bambini sotto i 5 anni, anziani e persone affette da malattie croniche) [16]. Il tasso di mortalità italiano, registrato nella stagione influenza precedente 2024/2025, ha registrato una media di 321 decessi settimanali [15].

Il virus dell'Influenza si suddivide in 4 tipi principali, classificati in base alle caratteristiche delle nucleoproteine e delle proteine della matrice:

- Flu A, infettivo per l'uomo ed altre specie animali. Esiste un'ulteriore suddivisione in sottotipi, che distingue i sottotipi virali sulla base delle diverse combinazioni delle proteine di superficie [emoagglutinina (HA) e neuraminidasi (NA)]. Ad oggi sono stati identificati 18 tipi diversi di antigene HA e 11 tipi di antigeni NA, che conducono a 198 combinazioni possibili, ma solo poche di esse sono agenti patogeni umani [19].
- Flu B, presente solo nell'uomo. A partire dagli anni '80 sono emersi due lignaggi antigenicamente e geneticamente distinti che sono stati denominati B/Victoria e B/Yamagata.

Sono stati ampiamenti dimostrati processi di scambio genetico intra-lignaggio e inter-lignaggio tra i due [20].

- Flu C: provoca un'infezione generalmente asintomatica o simile al raffreddore comune [19].
- Flu D: identificata recentemente ed isolata, per ora, solo nei suini e bovini. La possibilità di infezione per l'uomo resta ancora oggetto di studio. [21]

Una caratteristica importante dei virus influenzali è la capacità di variare, cioè di acquisire cambiamenti nelle proteine di superficie che permettono loro di aggirare la barriera costituita dalla immunità presente nella popolazione che in passato ha subito l'infezione influenzale.

I cambiamenti possono avvenire secondo due meccanismi distinti, *l'antigenic drift* e *l'antigenic shift*. Il primo presuppone la comparsa di mutazioni puntiformi nei geni codificanti HA e/o NA, ed è generalmente causa delle epidemie stagionali e delle variazioni costanti dei vaccini che devono tener conto di tali variazioni. Il secondo meccanismo suppone, invece, la completa sostituzione di parti geniche, a causa di *shift* genici in seguito a meccanismi di ricombinazione, ed è generalmente causa della comparsa di nuovi ceppi virali e di probabili pandemie [21, 22].

La storia registra diverse pandemie di influenza, da quella del 1580 che si diffuse dall'Asia all'Europa ed Africa, ad altre che si sono verificate nel corso dei secoli sia sul continente europeo che in Gran Bretagna come l'Influenza Russa (1889), l'Influenza Spagnola (1918), l'Influenza Asiatica (1957), l'Influenza di Hong Kong (1968), l'Influenza Suina (2009) [23].

Attualmente in Italia sono disponibili vaccini antinfluenzali quadrivalenti che contengono 2 virus di tipo A (H1N1 e H3N2) e 2 virus di tipo B, che proteggono particolari categorie a rischio (anziani over 65 e/o soggetti immunodepressi) dai sintomi gravi della malattia [24].

1.2.2 SARS-CoV-2 e pandemia da COVID-19

Il SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*) è un nuovo ceppo di Coronavirus, il cui nome è un chiaro riferimento al virus SARS-CoV del 2002 che, nonostante appartenga ad un ceppo differente, condivide con esso circa il 79% del suo genoma. I primi casi si sono registrati a fine Dicembre 2019 a Wuhan, in Cina, in alcuni pazienti che presentavano polmoniti e che dichiaravano di essere stati al *Wuhan's South China Seafood City Market*. Per tale ragione è stata ipotizzata la trasmissione da parte di animali infetti in vendita. Il serbatoio principale è rappresentato dal pangolino, un formichiere squamoso. L'11 Marzo 2020 l'OMS ha poi dichiarato la pandemia da COVID-19 [25].

È un virus respiratorio appartenente alla famiglia Coronaviridae e genere Betacoronavirinae. Ad oggi la circolazione di Sars-CoV-2 segue l'andamento tipico dei diversi virus respiratori: in Italia, nel mese di Ottobre 2025 sono stati registrati 4272 nuovi casi, con un tasso di positività del 11.1% [26].

1.3 Virus respiratorio sinciziale (RSV)

Il Virus Respiratorio Sinciziale (RSV), o Human Respiratory Syncytial Virus (hRSV), è un agente patogeno umano di fondamentale importanza nel campo della virologia e della sanità pubblica globale [28]. RSV è stato isolato per la prima volta nel 1955 in scimpanzé che mostravano sintomi riconducibili a malattie respiratorie. [29]. Classificato come un virus a RNA a singolo filamento negativo non segmentato, RSV appartiene alla famiglia dei Pneumoviridae, genere Orthopneumovirus [30].

RSV è riconosciuto come la principale causa globale di infezioni respiratorie acute (ARI) e di infezioni del tratto respiratorio inferiore (LRTIs) nei neonati e nei bambini piccoli [28]. Nonostante l'attenzione sia storicamente focalizzata sulla popolazione pediatrica, le infezioni da RSV colpiscono in realtà tutte le fasce d'età, compresi gli adulti over 50 e gli anziani, in cui possono causare morbilità e mortalità significative, specialmente in soggetti con condizioni di salute preesistenti [31, 32].

L'infezione da RSV è caratterizzata da un elevato tasso di morbilità, con un onere economico considerevole per i sistemi sanitari a causa del gran numero di ospedalizzazioni, soprattutto tra i bambini di età inferiore ai due anni [29]. Le infezioni si manifestano tipicamente con un andamento stagionale, spesso in concomitanza o in alternanza con altre infezioni virali respiratorie [28, 33]. Storicamente, i picchi stagionali di RSV hanno rappresentato una sfida costante, sebbene le dinamiche di circolazione possano aver subito alterazioni in anni recenti, in parte a causa delle misure di contenimento adottate per altre pandemie [34].

Alla luce della pandemia di COVID-19, è aumentata la consapevolezza della morbilità e della mortalità associate ai virus respiratori. Nonostante l'RSV sia stato identificato e studiato per decenni, solo recentemente l'accelerazione nella ricerca ha portato allo sviluppo e all'approvazione di strategie preventive innovative, quali i vaccini ed anticorpi monoclonali [35].

La mortalità nei paesi sviluppati non è comune, verificandosi in meno di 10 individui per 1.000.000 soggetti nati [33]. Tuttavia, a livello globale, RSV è una delle principali cause di morte e nel mondo: uno ogni 50 decessi tra i bambini da 0 a 5 anni e uno ogni 28 decessi tra i bambini di età compresa tra 1 mese e 6 mesi è attribuibile a RSV [34]. Oltre alla malattia acuta, ci sono evidenze che suggeriscono che l'infezione da RSV in età infantile possa scatenare respiro sibilante persistente o ricorrente e asma, collegando la morbilità da RSV a malattie croniche [36]. Tuttavia, la comprensione dettagliata delle interazioni virus-

ospite, delle dinamiche di trasmissione e della risposta immunitaria indotta dall'infezione o dalle strategie di immunizzazione rimane un campo di ricerca attivo e cruciale per affinare gli approcci terapeutici e preventivi [33, 34, 35].

1.3.1 Genoma e replicazione

RSV è un virus a RNA a filamento singolo e lineare che codifica per 11 proteine. Il virus presenta due glicoproteine transmembrana coinvolte nell'ingresso virale nelle cellule: la glicoproteina di attacco (G) e la glicoproteina di fusione (F) [36]. Sono le due principali proteine di interesse clinico in quanto mediano l'ingresso virale e sono i principali bersagli della risposta immunitaria umana [37].

Le infezioni da RSV sono classificate in due gruppi co-circolanti, chiamati A e B, che hanno subito una divergenza circa 350 anni fa, e ciascuno di essi è ulteriormente suddiviso in diversi sottogruppi [38]. È un virus pleiomorfo in cui la forma filamentosa è dominante, con un diametro di circa 50 nm e una lunghezza da 1 a 10 µm, mentre la particella virale sferica ha generalmente un diametro compreso tra 150 e 250 nm [39]. Il virione contiene un genoma virale a RNA a filamento singolo, non segmentato e in senso antisense, di circa 15,2 kb. Il genoma completo è segmentato in 10 geni che codificano per 2 proteine non strutturali (NSP) e 9 proteine strutturali (SP) [Figura 1]. Le proteine non strutturali, NS1 e NS2, sono associate principalmente all'evasione dalla risposta immunitaria innata. In particolare, NS1 è coinvolta nella regolazione della risposta ospite, inclusa l'inibizione della risposta all'interferone (IFN) di tipo I, l'inibizione della maturazione delle cellule dendritiche e la promozione della risposta infiammatoria. NS2 previene la produzione di segnali a valle dell'IFN tipo I [40].

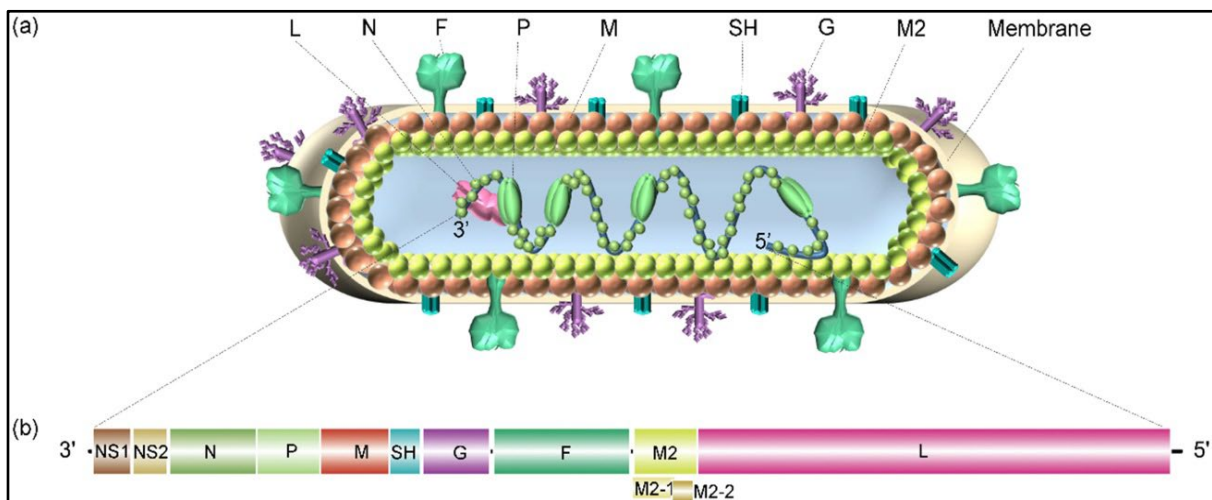


Figura 1: Diagramma schematico del virione RSV e della struttura del suo genoma (a). La struttura generale del virione RSV e le proteine da esso codificate. (b)

L'organizzazione del genoma di RSV consiste in 11 *open reading frames* (ORF), inclusi 2 ORF adiacenti alla regione *leader* 3' che codificano per proteine non strutturali correlate all'evasione della risposta immunitaria innata, e ORF che codificano per proteine strutturali: nucleoproteina (N), fosfoproteina (P), proteina della matrice (M), proteina idrofobica piccola (SH), glicoproteina (G), proteina di fusione (F), proteina M2 e proteina polimerasi (L) [36].

La nucleoproteina (N) è fondamentale per il legame virale all'RNA genomico. La fosfoproteina (P) è un importante cofattore della polimerasi che forma tetrameri, e che agisce non solo come co-fattore dei monomeri della proteina N e collegamento della proteina L al complesso nucleoproteina-acido ribonucleico, ma anche come proteina *chaperon* per prevenire il legame della proteina N di nuova sintesi all'RNA della cellula ospite [41]. La proteina della matrice (M) si trova all'interno dell'*envelope* virale e svolge un ruolo di supporto e partecipa al processo di trascrizione dell'RNA virale. La proteina SH è una piccola proteina idrofobica che ha la funzione di canale ionico pentamerico e si ritiene possa essere correlata all'apoptosi ritardata delle cellule infettate [42]. La proteina L contiene tre domini enzimatici conservati: un dominio RNA-dipendente RNA polimerasi (RdRp), un dominio poli-ribonucleotide transferasi (PRNTasi o capping) e un dominio metiltransferasi (MTasi), che catalizza la metilazione del capsido. La RdRp avvia due processi di sintesi di RNA indotti da promotori virali: la replicazione del genoma e la trascrizione del mRNA [41, 42].

La glicoproteina (G) è ricca di residui di serina, treonina e prolina. Dopo la traduzione, questa glicoproteina virale viene modificata in una proteina altamente glicosilata con 4-5 zuccheri, che rappresentano circa il 60% del peso molecolare di queste glicoproteine mature [43]. Come proteina di attacco, essa collega i virioni alle cellule bersaglio, interagendo con le molecole sulla superficie della cellula ospite. Oltre alla forma legata alla membrana, la proteina G virale viene anche prodotta in una forma solubile secretoria in seguito alla traduzione alternativa del secondo codone AUG nell'ORF. Successivamente, l'N-terminale viene idrolizzato e modificato per formare un nuovo N-terminale. Sebbene sia la forma di membrana che quella secretoria mediano la fuga immunitaria del RSV, la forma solubile ha la capacità di indurre comunque la produzione di anticorpi specifici diretti contro la proteina G virale, riducendo l'attività antivirale dei leucociti mediata dalla regione cristallizzabile del frammento (Fc) [44]. La proteina G consiste in un dominio transmembrana idrofobico N-terminale (circa 40-65 amminoacidi) e un dominio extracellulare C-terminale (circa 66-298 amminoacidi). Presenta una breve regione centrale conservata (CCR) nel dominio extracellulare, che è interposta tra due regioni *mucina-like* (che determinano i sottogruppi antigenici A e B) e che fiancheggiano entrambi i lati della proteina [45]. Il CCR contiene un nodo di cistina e quattro cisteine che formano due ponti disolfuro [46]. Nel complesso, la proteina G virale ha un alto grado di variazione tra le diverse specie virali. La funzione principale della proteina G virale è quella di legare i virioni alla superficie cellulare, interagendo con le molecole di adesione della cellula ospite [47, 48].

La proteina di fusione (F), appartenente alle proteine di fusione di classe I, è sintetizzata in un precursore contenente 574 amminoacidi, che viene poi scisso da una proteasi della cellula ospite per produrre un eterodimero collegato da ponti disolfuro. Successivamente, si forma una proteina F matura per mediare la fusione della membrana virale con la membrana della cellula ospite [47]. Inoltre, la proteina F è critica anche per la fusione delle cellule infettate con le cellule vicine [48]. La proteina F matura è ancorata sulla superficie della membrana dell'RSV da un dominio transmembrana e presenta una conformazione di trimero "a molla" [49].

Il processo per cui RSV entra nelle cellule ospiti inizia con il legame dei virioni ai recettori di superficie delle cellule ospiti e dalla fusione della membrana virale e della cellula ospite. Le proteine strutturali SH, G ed F sono codificate per localizzarsi sulla superficie del virus [50]. La molecola di adesione intercellulare-1 (ICAM-1), una glicoproteina di tipo 1 nella superfamiglia delle immunoglobuline, promuove l'ingresso di RSV nelle cellule epiteliali umane legandosi alla proteina F dell'RSV, il che è importante per la replicazione e l'infezione virale [51, 52].

Il meccanismo di ingresso è avviato in primis dalla proteina G, in quanto attiva la subunità α -1 della Na^+/K^+ ATPasi (ATP1A1), la quale, a sua volta, attiva la tirosin-chinasi c-Src che attiva l'EGFR (recettore del Fattore di Crescita Epidermico) attraverso la sua fosforilazione in posizione Tyr 845 [53]. I segnali a valle dell'EGFR portano al riarrangiamento dell'actina e ad increspature sulla membrana plasmatica che facilitano l'ingresso del virus. L'RSV può penetrare nella cellula in grandi macropinosomi pieni di liquido formati dall' *envelope* virale. Nei macropinosomi, la proteina F dell'RSV viene scissa per una seconda volta sotto l'azione di un enzima *furina-like*, consentendo a RSV di entrare nell'ospite in modo efficace [54].

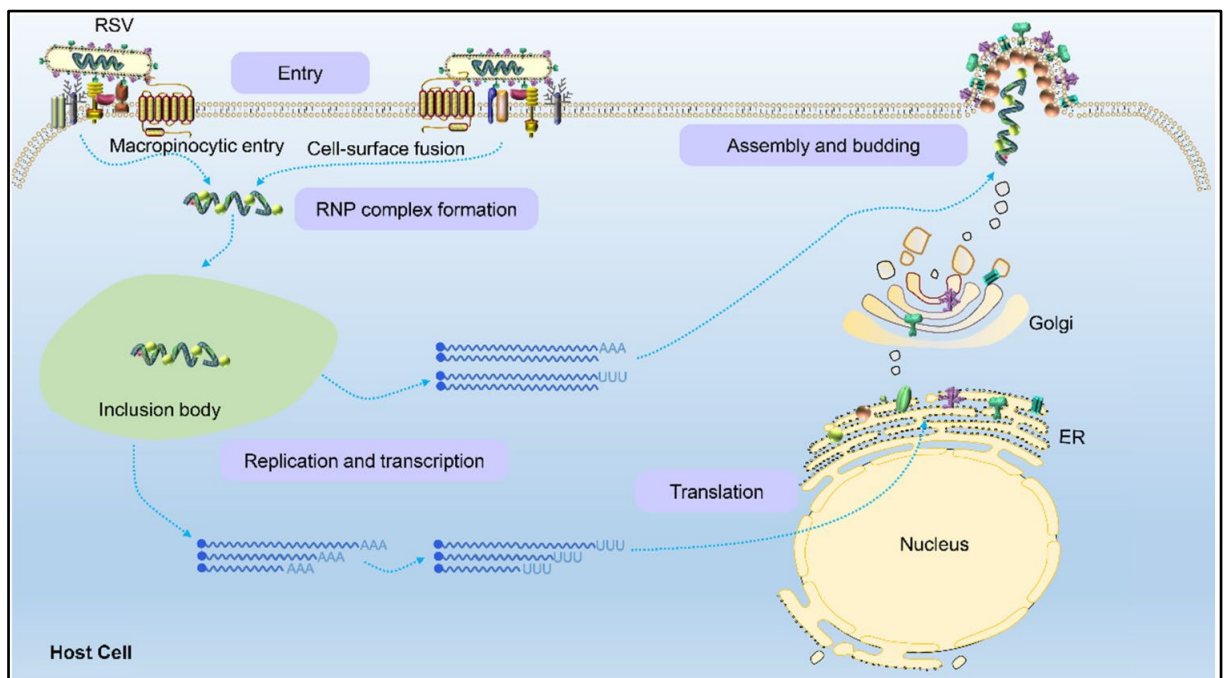


Figure 2. Schema riassuntivo del ciclo di replicazione di RSV.

1.3.2 Patogenesi

L'RSV si trasmette principalmente attraverso il contatto stretto con goccioline di saliva o muco [29, 55]. I sintomi iniziano circa 3-7 giorni dopo l'infezione da RSV e includono febbre, naso che cola o chiuso, tosse, senso di oppressione al petto, respiro sibilante e dispnea. Dopo un periodo di incubazione di circa 3-8 giorni, il virus infetta inizialmente le cellule epiteliali ciliate del tratto respiratorio superiore (rinofaringe), dove avviene la replicazione [56-57]. L'infezione può poi diffondersi nel tratto respiratorio inferiore, causando malattie come la bronchiolite o la polmonite, soprattutto nei neonati e nei bambini piccoli [58].

È molto probabile che l'infezione da RSV colpisca il sistema respiratorio, con la maggior parte del danno alle vie aeree mediato dalla risposta immunitaria, non dalla replicazione virale stessa. Il principale target cellulare dell'infezione da RSV è la cellula epiteliale respiratoria (AEC). Nelle AEC, la proteina F dell'RSV inibisce la produzione di interferone- λ (IFN- λ) indotta dal fattore regolatore dell'interferone 1 (il più critico IFN di tipo III nella risposta immunitaria per contrastare RSV) inducendo l'attivazione dell'EGFR, il che porta a un continuo aumento dell'infezione virale [59]. La proteina F, oltre che essere essenziale per l'ingresso e la fusione del virus, comporta la formazione di sincizi nella cellula ospite, sebbene la citopaticità dell'RSV sia relativamente bassa rispetto ad altri virus respiratori [60].

Le proteine non strutturali (NS1 e NS2) dell'RSV sono cruciali nell'evasione immunitaria, in particolare nell'inibizione della produzione e della segnalazione dell'interferone di tipo I (IFN-I) [61]. NS1 e NS2 sono due geni trascritti nelle prime fasi della replicazione virale, promuovendo sin da subito l'inibizione delle componenti del sistema immunitario [62]. I complessi NS1 e NS2 vengono trasportati ai mitocondri per formare il degradosoma, che può degradare una varietà di proteine coinvolte nella via dell'IFN-I [63]. La proteina NS1 svolge anche un ruolo nel modificare le cellule CD4⁺/CD8⁺. Contemporaneamente, NS1 inibisce l'attivazione e la proliferazione delle cellule T CD4⁺ e CD8⁺ [64], e blocca l'attivazione e la proliferazione delle cellule Th17 con effetto antivirale [65].

Durante l'infezione da RSV, si ha una massiva secrezione di muco nei tessuti polmonari coinvolti, a causa del rilascio di NF- κ B da parte dei macrofagi alveolari e dai mastociti durante la risposta immunitaria innata, con conseguente produzione di IL-6 e fattore di necrosi tumorale- α (TNF- α) [66]. L'accumulo di questi fattori infiammatori recluta ulteriormente un gran numero di granulociti (come i neutrofili) nel sito infetto. Il reclutamento di neutrofili nelle vie aeree dei pazienti può aumentare l'espressione di alcune proteine, come la mieloperossidasi (MPO) [67]. L'eccessiva secrezione di muco, l'attività delle ciglia e le cellule epiteliali esfoliate

presenti nelle vie aeree causate dall'infezione da RSV, insieme a neutrofili e linfociti presenti nel sito d'infezione, portano all'ostruzione del tratto respiratorio coinvolto.

È per questo motivo che si ritiene plausibile che la patogenesi da RSV, soprattutto nei casi gravi, non sia dovuta alla patogenicità del virus [68], bensì sia associata ad una risposta immunitaria inadeguata, presente anche con una bassa carica virale [69]. La gravità della malattia è spesso determinata dall'equilibrio tra l'eliminazione del virus e la natura della risposta immunitaria [70, 71].

In particolare, durante l'infezione da RSV, la gravità della bronchiolite è correlata ad altri fattori, come l'insorgenza di infezioni secondarie causate da batteri respiratori. L'attività del sistema immunitario, inoltre, rende le vie aeree danneggiate più inclini alle infezioni batteriche secondarie. [72] Sebbene gli anticorpi neutralizzanti proteggano dalle reinfezioni o ne riducano la gravità, l'immunità umorale è spesso incompleta [73].

Gli effetti dell'infezione da RSV negli adulti e nei bambini più grandi tendono ad essere correlati a patologie delle vie respiratorie superiori, inclusa rinite e altri sintomi del raffreddore comune. Nei bambini, in particolare neonati, lattanti e bambini in età prescolare, gli effetti virali sul tratto respiratorio inferiore sono più predominanti e portano alle sequele più gravi e potenzialmente letali di questa infezione, inclusa la bronchiolite [74]. Il lume bronchiolare dei bambini, neonati o lattanti, estremamente più piccolo rispetto ad un soggetto adulto, si occlude più facilmente durante l'infezione virale [75]. Inoltre, le fonti di ventilazione alveolare presenti nei bambini (i pori di Kohn e i canali di Lambert) sono relativamente immature, rendendo il polmone di questi soggetti più incline all'ostruzione [76]. Queste proprietà fisiche del polmone, se combinate con un sistema immunitario in via di sviluppo, rendono i lattanti e i bambini piccoli più suscettibili a episodi di bronchiolite clinicamente significativi [77].

Il muco normalmente presente nelle vie respiratorie rappresenta il rivestimento fluido che protegge le vie aeree e intrappola il particolato inalato dall'ambiente. Il movimento sincronizzato delle ciglia, esse stesse immerse in uno strato fluido periciliare, lavora per trasferire il muco dal tratto respiratorio inferiore al tratto superiore. Questo movimento, quando combinato con una tosse efficace, è la prima linea di difesa del corpo contro gli agenti patogeni e i detriti ambientali. Nella bronchiolite, questo meccanismo è compromesso, in parte a causa dell'aumento della produzione di muco e in parte a causa degli effetti virali sulle ciglia [76], causando gli effetti gravi della malattia che si manifestano nei soggetti con infezione da RSV [77].

1.3.3 Terapia

L'infezione da RSV è una malattia autolimitante nei bambini e adulti sani. Tuttavia, la terapia è essenziale per apportare benefici nei soggetti che mostrano gli effetti gravi della malattia. Gli obiettivi finali delle misure terapeutiche sono alleviare i sintomi, diminuire la durata e la gravità della malattia e ridurre il rischio di trasmissione. La terapia di supporto è il gold-standard, in quanto non esiste una terapia specifica post-esposizione. In alcuni soggetti gravi, però, ci sono delle opzioni terapeutiche per accelerare il processo di guarigione [78].

La ribavirina, ad esempio, è un analogo nucleosidico ad ampio spettro che inibisce la replicazione dei virus a DNA e RNA. È disponibile in formulazioni aerosol, orali e endovenose [78, 79]. La formulazione in aerosol è la più difficile da somministrare in quanto richiede dispositivi di inalazione specializzati, perché potrebbe rappresentare un rischio, a causa di inalazione indiretta, anche per gli operatori sanitari. Gli effetti collaterali riportati in seguito all'utilizzo di ribavirina includono broncospasmo, respiro corto, dolore toracico, eruzione cutanea e congiuntivite [80]. La ribavirina somministrata per via orale, invece, sembra essere un'alternativa efficace nel trattamento dell'infezione da RSV [81], poiché associata ad una buona *clearance* virale, ed è anche un'alternativa sicura, facile ed economica rispetto alla forma aerosolizzata. Tuttavia, nel complesso, a causa dell'alto costo e dei potenziali effetti collaterali avversi, la ribavirina non è attualmente raccomandata per i bambini immunocompetenti. Dato che sono stati osservati benefici nei pazienti gravemente immunocompromessi, resta un'opzione l'uso clinico del trattamento in queste popolazioni [82].

Altri agenti antivirali promettenti sono attualmente in fase di studio in studi randomizzati controllati, come RV521 (NCT04225897) [83] e AK0529 (ziresovir) [84], che utilizzano l'inibizione della fusione o della replicazione virale come meccanismo d'azione.

L'utilizzo di immunoglobuline anti-RSV, come il Palivizumab [85], è un'opzione terapeutica per l'infezione acuta da RSV, in quanto è stato dimostrato un forte effetto neutralizzante sul virus. Il Palivizumab è un'immunoglobulina monoclonale ricombinante, approvata nel 1999 in Italia per la profilassi contro la malattia grave da RSV in gruppi selezionati ad alto rischio. Attualmente non è stato ritirato ma non è più impiegato in quanto sostituito da altri anticorpi monoclonali più efficaci nella profilassi pre-esposizione [86]. Diversi studi, comunque, mostrano una riduzione della replicazione dell'RSV in seguito all'utilizzo di immunoglobuline specifiche post-esposizione, mostrando una riduzione della carica virale e prevenendo il successivo sviluppo di forme gravi della malattia [87, 88].

Considerando la patogenesi di RSV, dunque la complessa interazione tra il genoma virale e il sistema immunitario dell'ospite che comporta una risposta immunitaria massiva e un rilascio di citochine pro-infiammatorie [89], ci sono diversi potenziali approcci terapeutici [90] che possono essere applicati per contrastare l'ostruzione delle vie aeree, in particolare mucolitici [91], broncodilatatori [92] e agenti antinfiammatori [93]. Tra questi approcci terapeutici ritroviamo la dornase alfa, L'N-acetilcisteina (NAC) e broncodilatatori.

La dornase alfa (DNasi ricombinante umana alfa, hrDNase) può essere utile per sciogliere i tappi di muco osservati nella bronchiolite da RSV, i quali contengono grandi quantità di DNA extracellulare, un sottoprodotto del reclutamento dei leucociti e della successiva degradazione [94]. La dornase alfa è un composto che scinde il DNA extracellulare e riduce la viscosità del muco; dunque, è stata proposta come trattamento per la bronchiolite da RSV [95]. Pertanto, l'hrDNase nebulizzata può essere considerata nei casi gravi, sebbene non sia generalmente raccomandata come trattamento per l'infezione da RSV.

L' N-acetilcisteina (NAC) è un composto che idrolizza i legami disolfuro delle mucine e ha ulteriori effetti antiossidanti, proprietà che possono essere utili nei casi di bronchiolite [96]. Non sono disponibili studi di efficacia nel trattamento di bronchiolite da RSV, dunque, sono necessari ulteriori studi prima che l'NAC possa essere considerata una terapia per l'infezione da RSV.

I broncodilatatori, come il salbutamolo e l'albuterolo, sono due agonisti β -2 adrenergici che agiscono rilassando la muscolatura liscia delle vie aeree e alleviando l'ostruzione. Il loro utilizzo non è raccomandato di routine come opzione terapeutica per la bronchiolite, ma in futuro potrebbero essere sperimentati per valutare la risposta nei lattanti quando il sibilo polmonare rappresenta la caratteristica predominante dell'infezione e la sua evoluzione può essere utilizzata per valutare la risposta del farmaco [97].

1.3.4 Prevenzione

Poiché l'approccio terapeutico principale per l'infezione acuta da RSV è la terapia di supporto, l'attenzione rimane sulla prevenzione della malattia grave e dell'ospedalizzazione. Inoltre, poiché l'immunità sterilizzante contro RSV non si ottiene tramite l'infezione e, di conseguenza, le reinfezioni si verificano nel corso della vita in bambini e adulti [98], è imperativa la necessità di una immunizzazione efficiente e duratura.

Il primo vaccino contro RSV fu valutato poco dopo il primo isolamento del virus in bambini gravemente malati [99]. Sfortunatamente, il vaccino iniziale inattivato con formalina dimostrò che, in seguito all'esposizione naturale a RSV, i neonati vaccinati manifestavano una malattia da RSV potenziata dal vaccino, con un tasso di ricovero dell'80% e la morte di due bambini [100]. Questo evento ha bloccato lo sviluppo dei vaccini contro RSV per molti anni a causa di problemi di sicurezza; tuttavia, poiché la comprensione della biologia di RSV e del suo meccanismo d'azione ha continuato ad evolversi, ci sono stati molti progressi nelle strategie di prevenzione di RSV [101].

I diversi approcci preventivi potrebbero essere classificati in due categorie: in primo luogo, l'immunizzazione passiva con anticorpi monoclonali (mAb) o la vaccinazione materna durante la gravidanza e, in secondo luogo, l'immunizzazione attiva tramite vari tipi di vaccini progettati per neonati e adulti.

È noto che RSV presenti due sottotipi, RSV-A e RSV-B, distinti principalmente per le variazioni nella proteina G, mentre la proteina F, più conservata [102], è il bersaglio migliore per lo sviluppo di vaccini e anticorpi monoclonali. I target vaccinali sono specifici per la conformazione pre-fusione (pre-F) della proteina F, in quanto questa forma sembrerebbe essere associata ad una maggiore produzione di anticorpi neutralizzanti [103].

In Italia, l'AIFA (Agenzia Italiana del Farmaco) ha approvato diversi metodi di prevenzione contro RSV. Nello specifico, la prima profilassi anti-RSV è stata approvata nel gennaio del 2023 con l'anticorpo monoclonale Nirsevimab (*Beyfortus*), indicato nella prevenzione delle patologie del tratto respiratorio inferiore nei neonati e nei bambini (LRTI) nel primo anno di vita causate da RSV [104]. Si è dimostrato efficace nella riduzione dell'80% delle infezioni da RSV che richiedono assistenza medica e nel 77% delle ospedalizzazioni. Viene somministrato mediante una singola iniezione intramuscolare e fornisce una protezione di almeno 5 mesi, utile a coprire l'intera stagione autunno/inverno che è il periodo in cui è prevista la maggior circolazione del virus [105].

L'utilizzo di Nirsevimab ha sostituito completamente Palivizumab, che per anni è stato l'unico strumento di immunizzazione preventiva contro RSV, anche se con un raggio d'azione limitato. Palivizumab è sempre stato riservato a una profilassi selettiva e non universale. Le indicazioni principali in Italia includono bambini ad altissimo rischio, come bambini nati con età gestazionale inferiore alla 35esima settimana e con età inferiore ai 6 mesi al tempo dell'immunoprofilassi, bambini con displasia broncopolmonare (DBP) e/o altre patologie polmonari gravi, con età inferiore ai 2 anni, e bambini (età inferiore ai 2 anni) con cardiopatia congenita emodinamicamente significativa e/o con altre condizioni gravi (es. alcune immunodeficienze o patologie neuromuscolari) [106].

Attualmente esiste un altro anticorpo monoclonale utile per l'immunoprofilassi passiva contro RSV (Clesrovimab, *Enflonsia*) che è in fase di approvazione da parte di AIFA [107].

Nel dicembre dello stesso anno, l'AIFA ha autorizzato il primo vaccino contro RSV per la prevenzione della LRTI causata da RSV in soggetti adulti di età pari o superiore a 60 anni. Il Vaccino è RSVpreF3 OA (*Arexvy*) costituito dall'Antigene RSVPreF3 (ricombinante, adiuvato) e viene somministrato con una singola dose per via intramuscolare a livello del deltoide [108].

Nell'ottobre 2024, è stato approvato un altro vaccino rivolto ai soggetti over 60 e alle donne in gravidanza tra la 24° e 36° esima settimana, per la protezione passiva del neonato dalla nascita fino ai 6 mesi di età. Si tratta del vaccino RSVpreF (*Abrysvo*), vaccino bivalente (per sottotipo A e B) non adiuvato e composto da due proteine pre-F (RSVpreF) da somministrare come iniezione monodose nel muscolo [109].

L'ultimo vaccino approvato dall'AIFA per la prevenzione contro RSV nel novembre 2024 è stato il vaccino a mRNA, mRNA-1345 (*mResvia*), monovalente (specifico solo per il sottotipo A). L'mRNA contenuto nel vaccino codifica per la glicoproteina F stabilizzata nella sua conformazione di pre-fusione. È somministrato come una singola iniezione intramuscolare (generalmente nel muscolo deltoide) [110].

1.3.5 Epidemiologia

La circolazione di RSV, così come quella del virus dell'influenza e di altri virus respiratori, mostra un forte aumento tipicamente durante la stagione invernale, con la co-circolazione di diversi patogeni respiratori che esercita una notevole pressione sui sistemi sanitari [111, 112]. Negli ultimi anni, la pandemia da COVID-19 ha portato ad una riduzione iniziale della circolazione dell'RSV durante i mesi nei quali si osserva la normale circolazione degli altri virus respiratori (grazie alle misure preventive come l'utilizzo di mascherine, il distanziamento sociale), seguita da una circolazione tardiva rispetto al normale picco epidemico [111].

A livello globale, si stimano circa 33 milioni di episodi di ARI (infezioni respiratorie acute) associate a RSV in bambini da 0 a 5 anni. L'incidenza totale è di circa 62,8 per 1.000 bambini in età prescolare. Il tasso di incidenza è significativamente più alto nei lattanti: circa 86,5 per 1.000 nei bambini sotto i 6 mesi di età [113].

L'impatto dell'RSV è caratterizzato da una forte disparità tra paesi ad alto reddito (HIC) e paesi a basso/medio reddito (LMIC), dove si verifica la quasi totalità dei decessi. Circa 3,2 milioni di ricoveri si verificano solo nei Paesi in via di sviluppo, a fronte di 344.000 ricoveri nei Paesi industrializzati [114].

Oltre il 97% dei decessi pediatrici per RSV si verifica nei paesi a basso e medio reddito e si stima che 1 su 50 decessi di bambini di età compresa tra 0 e 5 anni sia attribuibile a RSV [115].

Il tasso di incidenza di RSV a livello globale è diverso per i soggetti anziani. Si stima, infatti, un tasso di incidenza di circa 600,7 casi per 100.000 persone/anno in soggetti over 65 anni [116]. Negli adulti over 60 anni che presentano infezioni respiratorie acute, il tasso di positività all'RSV è in media tra il 10-17% a seconda della stagione [113]. Negli Stati Uniti, si stimano fino a 160.000 ricoveri totali all'anno in adulti 65 anni [117]. Il tasso di mortalità tra i ricoverati over 65 anni nei Paesi Industrializzati è circa 6,1%. Nei Paesi in Via di Sviluppo, questo tasso può arrivare al 9,1%.

La circolazione di RSV in Europa, invece, è monitorata dall'ECDC attraverso il sistema *European Respiratory Virus Surveillance Summary* (ERVISS), che integra il monitoraggio di RSV, influenza e SARS-CoV-2 [116]. Dai dati del sistema ERVISS, circa il 30% dei pazienti con ARI ricoverati in ospedale è risultato positivo all'RSV nel periodo novembre 2022-dicembre 2024 [118].

In Italia, la sorveglianza integrata dei virus respiratori, incluso l'RSV, è gestita dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS) attraverso il sistema RespiVirNet [119, 120]. Nella stagione 2023-2024, RSV è risultato positivo nel 16% dei campioni analizzati attraverso la sorveglianza virologica, posizionandosi come il terzo virus respiratorio più frequentemente rilevato, dopo l'Influenza A/B (34%) e il SARS-CoV-2 (17%) [121]. In Italia, come in altri Paesi, si osserva la co-circolazione dei due principali sottotipi (RSV-A e RSV-B), con una predominanza storica del sottotipo B fino al 2018, ed un aumento del sottotipo A a partire dalla stagione 2019-2020 fino alla stagione 2024-2025 [122]. La fascia di età più colpita, in termini di incidenza cumulativa di sindromi simil-influenzali (ILI/ARI) e positività all'RSV, è costantemente quella dei bambini di 0-4 anni [123]. L'incidenza cumulativa di ILI/ARI in questa fascia d'età è stata pari a 63,2% nella stagione 2023-2024 e 70,8% nella 2022-2023 (percentuale relativa all'incidenza totale in tutte le fasce d'età) [121].

Nella stagione 2023-2024, la positività ai test per l'RSV ha raggiunto circa il 7,2% su un totale di 4341 campioni analizzati, mentre, durante la stagione 2024-2025, la positività ai test per l'RSV ha raggiunto circa il 10,6% su un totale di 4857 campioni analizzati [123].

2. SCOPO DELLA TESI

Inizialmente identificato come un agente patogeno prevalentemente pediatrico, il virus respiratorio sinciziale (RSV) è sempre più associato a malattie respiratorie negli adulti, infatti, per ridurre i ricoveri ospedalieri e i tassi di letalità causati da RSV, sono recentemente diventati disponibili diversi vaccini per gli adulti. Numerose revisioni in letteratura [124-126] indicano la presenza lacune nella valutazione delle caratteristiche epidemiologiche e cliniche dell'RSV nei soggetti adulti.

Innanzitutto, non esiste una definizione clinica di caso di RSV universalmente accettata che determini la raccolta di un campione biologico per le analisi virologiche. Diversi paesi europei, tra cui l'Italia, hanno recentemente incorporato la sorveglianza del RSV nelle piattaforme di monitoraggio dell'influenza già esistenti, basate sulle definizioni di casi di sindrome simil-influenzale (ILI). La rete italiana RespiVirNet rappresenta, infatti, l'evoluzione diretta del precedente sistema di sorveglianza italiano denominato InFluNet, nato nel 1999, con l'obiettivo specifico di sorvegliare l'influenza stagionale (o sindromi simil-influenzali, ILI) e la circolazione dei soli virus influenzali. InFluNet si concentrava su un unico agente patogeno, ma ad oggi è necessario indagare anche altri patogeni respiratori che, allo stesso modo dell'influenza, rappresentano un fardello per il sistema sanitario nazionale. In Italia, dunque, la sorveglianza di RSV è stata solo recentemente integrata nelle piattaforme di monitoraggio, come la rete RespiVirNet. La sorveglianza dei virus respiratori in altri paesi si basa su una definizione di caso di infezione respiratoria acuta (ARI) più ampia, mentre altri paesi riportano sia i tassi di incidenza di ILI sia di ARI [127]. Poiché una sempre più ampia corte di adulti anziani positivi al RSV non presenta febbre come sintomo, sembra che le definizioni di caso basate sulla febbre, quindi su una ILI, sottostimino l'onere del RSV [128]. Una delle sfide principali per la sorveglianza e la gestione clinica dell'RSV negli adulti, infatti, risiede nell'identificazione di una definizione di caso efficace.

Per quanto riguarda gli esiti correlati al RSV negli adulti anziani, la maggior parte delle evidenze è limitata a studi retrospettivi basati su registri condotti in contesti ospedalieri, mentre pochissime indagini prospettiche basate sulla comunità hanno indagato l'andamento del RSV in pazienti adulti ambulatoriali. L'elevata incidenza di complicanze, come bronchite e polmonite, in una popolazione di pazienti non ospedalizzati, evidenzia che l'RSV non è una malattia benigna negli adulti, in particolare anziani. L'onere clinico ed economico associato a

queste complicanze è considerevole, con un conseguente consumo sostanziale di risorse sanitarie.

Lo scopo della tesi è confrontare i tassi di RSV rilevati dalle definizioni di caso di ARI rispetto a quelli di caso di ILI e descrivere l'andamento epidemiologico di RSV in una popolazione colpita come quella dei soggetti con un'età uguale o superiore ai 50 anni.

Per indagare meglio questi aspetti, il mio lavoro di tesi si è concentrato sullo studio prospettico "RESPIRA-50". Si tratta di un progetto biennale, condotto sul territorio genovese, iniziato nel 2023 e concluso nel 2025 con l'obiettivo primario di riprodurre due reti parallele di sorveglianza sentinella, basate sulle definizioni di casi ARI e ILI, al fine di confrontare i tassi di RSV e di altri patogeni respiratori rilevati utilizzando queste consolidate definizioni sindromiche di caso. Lo studio mira, inoltre, ad identificare una definizione di caso specifica per l'RSV e ad esaminare le conseguenze cliniche ed economiche dell'infezione da RSV in adulti residenti nella comunità di età ≥ 50 anni. La popolazione target scelta riflette l'ampliamento dell'indicazione per il vaccino RSV, che ora comprende individui ≥ 50 anni, rispetto alla soglia precedente di ≥ 60 anni.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Design dello studio e selezione dei partecipanti

Lo studio è stato condotto nella città metropolitana di Genova, durante le stagioni 2023/2024 e 2024/2025. Ogni stagione è stata definita come il periodo compreso tra la 42esima settimana (metà ottobre) e la 17esima settimana (fine aprile), in linea con il periodo definito dalla rete italiana di sorveglianza RespiVirNet.

Lo studio è stato condotto in collaborazione con 38 medici di medicina generale (MMG), i quali sono stati randomizzati ed assegnati casualmente (1:1) a uno dei due gruppi per arruolare individui con una sintomatologia compatibile con ARI o ILI, rispettivamente. Per definire i soggetti arruolati come “caso ARI” o “caso ILI”, sono stati utilizzati i criteri del Centro Europeo per la Prevenzione e il Controllo delle Malattie (ECDC) [129]:

- ARI: insorgenza improvvisa di ≥ 1 sintomo respiratorio (tosse, mal di gola, difficoltà respiratoria, raffreddore) e giudizio del MMG in merito ad un’infezione in corso;
- ILI: insorgenza improvvisa di ≥ 1 sintomo sistemico (febbre o sensazione di febbre, malessere, mal di testa, mialgia) e ≥ 1 sintomo respiratorio (tosse, mal di gola, difficoltà respiratoria).

L’obiettivo è stato arruolare individui con un’età ≥ 50 anni che si presentavano per richiedere assistenza al medico e che soddisfacevano almeno uno dei due criteri europei ARI o ILI. L’ipotesi iniziale era che ogni MMG eseguisse tamponi su circa 20–30 pazienti per stagione, dunque un numero campionario totale di circa 960–1440 soggetti. Tuttavia, poiché alla fine della prima stagione, diversi MMG hanno arruolato un numero < 30 pazienti, per la seconda stagione, sono stati aggiunti altri 12 MMG, raggiungendo un totale di 38 MMG. Durante il periodo dello studio, la vaccinazione contro RSV negli adulti non era finanziata pubblicamente in Italia; tuttavia, i vaccini autorizzati potevano essere acquistati privatamente. Alla fine dello studio, è stato verificato lo stato vaccinale per RSV in un registro disponibile sul territorio ligure, dove è obbligatoria la registrazione di tutti i vaccini somministrati. Dei 1443 soggetti arruolati, solo 16 (1%) avevano ricevuto una singola dose di un vaccino RSV adiuvato (tra marzo e giugno 2024), e nessuno di questi individui è risultato positivo per RSV.

Sono stati arruolati solo individui di età ≥ 50 anni, in grado di fornire consenso informato e che soddisfacevano le definizioni di caso ARI/ILI. Sono stati esclusi i soggetti che non soddisfacevano i criteri dell'ECDC, coloro erano residenti in strutture di assistenza a lungo termine, coloro che erano già risultati positivi al RSV nella stagione dello studio o avevano sviluppato sintomi oltre 7 giorni prima della visita dal medico di base.

3.2 Raccolta dei campioni

Il giorno dell'arruolamento, i MMG, ottenuto il consenso informato, hanno eseguito una valutazione di base (t0), raccogliendo dati demografici (sesso, età, nazionalità) e anamnesi medica (presenza di condizioni di salute pregresse), e valutato i segni e sintomi associati alla visita. Successivamente, i medici hanno raccolto un campione tramite tampone nasofaringeo che è stato immerso in un mezzo di trasporto (UTM, Copan Italia; Brescia, Italia), identificato con un codice a barre e spedito al laboratorio di riferimento regionale U.O. di Igiene situato presso l'Ospedale Policlinico San Martino (Genova, Italia). Tutti i soggetti arruolati sono stati testati per 27 patogeni respiratori. Gli individui risultati positivi al RSV sono stati monitorati per un massimo di 30 giorni, mentre coloro risultati negativi hanno concluso lo studio al t0. La prima telefonata di follow-up (t1) è stata effettuata 14 ± 1 giorni dopo l'insorgenza dei sintomi e sono state raccolte le informazioni ritenute correlate all'infezione da RSV: eventuale sviluppo di complicanze, ulteriori visite dal medico, visite specialistiche (tipo e numero), farmaci utilizzati (marca, tipo, dosaggio, frequenza e durata), test diagnostici e procedure (tipo e numero), eventuali accessi al pronto soccorso (PS) o ricoveri e numero di giorni lavorativi persi.

Per i pazienti che si erano completamente ripresi entro il giorno 14 (giudizio personale inteso come ritorno allo stato pre-infezione) si è concluso lo studio, mentre è stata effettuata una seconda chiamata di follow-up (t2) al giorno 30 ± 1 per gli individui non completamente guariti. Tutte le chiamate di follow-up sono state eseguite sistematicamente da un medico facente parte del team dello studio.

3.3 Analisi dei campioni

Tutti i campioni sono stati testati presso il laboratorio di riferimento regionale U.O. di Igiene, Ospedale Policlinico San Martino (Genova, Italia). La diagnosi di RSV, in qualità di parassita endocellulare obbligato, è avvenuta mediante Real-Time PCR (reazione a catena della polimerasi in tempo reale, RT-PCR).

La Real-Time PCR è il metodo gold-standard in biologia molecolare per la diagnosi di patogeni virali come RSV, in quanto si avvale di una DNA-polimerasi DNA dipendente termoresistente (Taq polimerasi) per l'amplificazione del target d'interesse. L'analisi in tempo reale avviene grazie all'ausilio di fluorofori ovvero molecole che, se eccitate da una fonte, emettono fluorescenza. La fonte che garantisce l'emissione di fluorescenza è, generalmente, un laser presente nel termociclatore, ovvero lo strumento che consente le variazioni di temperatura e dunque l'alternanza delle diverse fasi di PCR. La fluorescenza emessa avrà un andamento di tipo logaritmico, direttamente proporzionale alla quantità di genoma presente nel campione originale. Ogni curva di amplificazione avrà il proprio *cycle threshold* (Ct), ovvero il ciclo di amplificazione in cui la fluorescenza registrata supera il rumore di fondo, indicato dalla linea soglia: la curva assumerà un andamento tipicamente esponenziale fino al raggiungimento di un plateau. Il Ct è generalmente inversamente proporzionale al quantitativo di DNA/RNA presente nel campione.

3.3.1 Estrazione dell'acido nucleico e RT-PCR

Gli acidi nucleici sono stati estratti su piattaforma automatizzata STARlet (Seegene Inc., Seoul, Corea), strumento che effettua l'estrazione del materiale genetico e un PCR-Set Up, in quanto dispensa i reagenti e gli estratti utili per effettuare la successiva PCR. Il kit utilizzato per l'estrazione è stato lo STARMag 96×4 Universal Cartridge (Seegene Inc., Seoul, Corea). Il volume di *input* (tampone nasofaringeo) è stato di 200 µL di campione, seguito da un volume di eluizione di 100 µL.

La rilevazione di RSV è avvenuta mediante tre saggi differenti:

- Allplex Respiratory Panels 1–4 (RSV incluso nel Panel 1) [Seegene, Seoul, Corea]
- Allplex SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV [Seegene, Seoul, Corea]
- Un test rapido di rilevamento dell'antigene RSV (RADT; STANDARD Q RSV Ag; SD Biosensor, Suwon-si, Corea).

Per garantire le stesse condizioni ed evitare una doppia raccolta del campione, motivo che avrebbe potuto ridurre la *compliance* del paziente, sia RT-PCR che RADT sono stati eseguiti in laboratorio usando lo stesso campione. Considerando l'alta sensibilità e specificità per il Allplex Respiratory Panel 1, che differenzia anche i sottotipi RSV A e B, è stato considerato come saggio standard di riferimento.

3.3.1.1 Allplex Respiratory Panels 1–4

Il kit Allplex Respiratory Panel 1-4 è un kit PCR multiplex, ovvero un saggio che consente la rilevazione simultanea di 26 patogeni respiratori, suddivisi in patogeni virali e batterici. Il kit Respiratory Panels prevede 4 diversi kit (suddivisi da 1 a 4) per evitare la formazione di dimeri di primers e rilevazione di aspecifici.

I kit Respiratory Panels 1,2 e 3 consentono la rilevazione dei soli patogeni virali: RSV A e B; influenza A(H1N1) pdm09, A(H3N2) e B; adenovirus; rhinovirus; enterovirus; metapneumovirus; virus parainfluenzali 1, 2, 3 e 4; bocavirus 1–4; coronavirus 229E, NL63 e OC43. I target batterici sono rilevati mediante il kit Respiratory Panel 4: Haemophilus influenzae (HI); Streptococcus pneumoniae (SP); Bordetella pertussis; Bordetella parapertussis; Mycoplasma pneumoniae; Legionella pneumophila; e Chlamydomphila pneumoniae.

Nei quattro kit sono presenti i reagenti necessari per l'esecuzione di una PCR, ovvero:

- MOM, contenente dNTPs, primers specifici per l'amplificazione dei target e sonde fluorescenti per la rilevazione in tempo reale;
- BUFFER, contenente buffer con MgCl per il corretto funzionamento enzimatico;
- NUCLEASE FREE WATER (NFW), contenente acqua priva di nucleasi, utilizzata anche come controllo negativo di PCR;
- ENZYME, contenente una mix enzimatica con DNA polimerasi termoresistente (TaqPolimerasi) e trascrittasi inversa (per la conversione dell'RNA in cDNA).

La mix di amplificazione è così composta come segue:

- MOM: 5 µL/campione;
- BUFFER: 5 µL/campione;
- NFW: 5 µL/campione;
- ENZYME: 2 µL/campione.

Solo il kit Respiratory Panel 4 non presenta il buffer, dunque, la mix di reazione sarà così composta:

- MOM: 5 µL/campione;
- NFW: 7 µL/campione;
- ENZYME: 5 µL/campione.

Per ogni reazione sono stati utilizzati 8 µL di estratto (DNA/RNA) e 17 µL di mix di amplificazione in un volume finale di 25 µL.

L'RT-PCR è stata eseguita sul sistema CFX96 (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, USA), termociclatore che consente le diverse variazioni di temperatura per garantire le fasi di PCR.

Il profilo termico della PCR è così suddiviso:

- 50 °C per 20' (fase di retrotrascrizione)
- 95 °C per 15' (fase di denaturazione)
- 95 °C per 10'', 60 °C per 1', 72 °C per 10'' (45 cicli)

La durata totale è di 138 minuti. Il rilevamento della fluorescenza è stato eseguito a 60 °C e 72 °C. Le curve di amplificazione ed i valori Ct sono stati visualizzati utilizzando il software Seegene Viewer (Seegene Inc., Seoul, Corea). I campioni con valori Ct < 40 sono stati considerati positivi.

Il kit Allplex Respiratory Panel 1-4 consente la sottotipizzazione di RSV A e RSV B e la sua sensibilità per rilevare i due sottotipi è, rispettivamente, del 100% [intervallo di confidenza (IC) al 95%: 92,9–100%] e del 100% (IC al 95%: 91,6–100%). La specificità è anch'essa del 100% (IC al 95%: 95,3–100%) per entrambi i sottotipi.

3.3.1.2 Allplex SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV

Il kit Allplex SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV è stato utilizzato per la rilevazione di SARS-CoV-2, patogeno escluso dal precedente kit di amplificazione. Il kit rileva simultaneamente quattro virus: SARS-CoV-2 (geni N, RdRp e S), influenza A, influenza B e RSV (senza differenziazione dei sottotipi).

Rispetto all'Allplex Respiratory Panel 1, il rilevamento dell'RSV, in termini di sensibilità, è del 98,7%, mentre la specificità è del 100%.

La mix di amplificazione è così composta come segue:

- MOM: 5 µL/campione;
- NFW: 5 µL/campione;
- ENZYME: 5 µL/campione.

Per eseguire la PCR e ridurre il volume di campione richiesto per entrambe le analisi, è stato utilizzato lo stesso eluato, proveniente dall'estrazione effettuata su piattaforma automatizzata STARlet. L'RT-PCR successiva è stata eseguita sul sistema CFX96 (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, USA). Per ogni reazione, sono stati utilizzati 5 µL di acidi nucleici in un volume finale di reazione di 20 µL.

Il profilo termico della PCR prevede:

- 50 °C per 20'
- 95 °C per 15'
- 95 °C per 10'', 60 °C per 15'', 72 °C per 10'' (45 cicli)

La durata totale è di 103 minuti. Il rilevamento della fluorescenza è stato eseguito a 60 °C e 72 °C. Le curve di amplificazione e i valori Ct sono stati visualizzati utilizzando il software Seegene Viewer (Seegene Inc., Seoul, Corea). I campioni con valori Ct < 40 sono stati considerati positivi.

3.3.1.3 Test rapido antigenico (RADT)

Il test rapido antigenico (RADT) è un test immunocromatografico rapido per il rilevamento qualitativo dell'antigene G di RSV. L'analisi è stata eseguita secondo le istruzioni del produttore, utilizzando i tamponi nasofaringei eluiti in terreno di trasporto. Per l'esecuzione del test, è stato utilizzato 1 ml di campione aggiunto direttamente alla provetta contenente il buffer di estrazione fornito dal kit. Sono state dispensate quattro gocce del campione ed attesi 15 minuti, come da indicazioni.

La sensibilità dichiarata dal produttore del test è del 92,45% e la specificità è del 98,44%.

3.3.2 Sequenziamento

Tutti i campioni risultati positivi per RSV sono stati analizzati con sequenziamento Sanger o *Next-Generation Sequencing* (NGS) per la caratterizzazione molecolare delle varianti virali.

Su un totale di 1443 campioni, sono stati sequenziati 64 campioni positivi per RSV (81%), su un totale di 79 campioni positivi, utilizzando due metodiche differenti di sequenziamento sulla base del limite imposto dal Ct di rilevazione della PCR, ovvero sono stati esclusi 15 campioni positivi per RSV che presentavano il Ct di rilevazione superiore al 37esimo ciclo. I campioni con Ct < 32 sono stati sequenziati mediante sequenziamento NGS per l'analisi dell'intero genoma e i campioni con Ct > 32 mediante sequenziamento Sanger del solo gene G, compatibilmente con le indicazioni fornite nei diversi kit. Tutte le sequenze sono state successivamente caricate nel database GISAID (*Global Initiative on Sharing All Influenza Data*) (<https://gisaid.org/>).

3.3.2.1 Sequenziamento NGS

L'RNA virale è stato estratto mediante il kit ELITE InGenius SP 200, compatibile con il sistema automatizzato ELITE InGenius (ELITechGroup, Puteaux, Francia). Il volume di input è stato 200 µL, eluito in un volume finale di 50 µL.

La piattaforma automatizzata ELITE InGenius è un sistema che estrae il materiale genetico sfruttando il principio delle biglie magnetiche: le biglie, fornite dal kit di estrazione, presentano un nucleo paramagnetico e sono rivestite esternamente da una matrice superficiale di silice. La silice (diossido di silicio) è un composto chimico, con carica elettrica positiva, che lega il DNA/RNA a causa della sua alta affinità per l'acido nucleico che presenta una carica negativa. La formazione del legame tra silice ed acido nucleico avviene per la formazione di interazioni elettrostatiche e ponti idrogeno, che garantiscono la corretta eluzione e purificazione del materiale genetico. Il tempo di estrazione è di circa 35 minuti.

Al fine di rimuovere il DNA umano presente inevitabilmente nel campione, potenziale causa di amplificazioni aspecifiche, sono stati pre-trattati 25 µL di RNA con una DNasi, utilizzando il kit DNA-free DNA Removal Kit (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lituania). Per l'amplificazione dell'intero genoma dell'RSV, è stato utilizzato il sistema SuperScript IV One-Step RT-PCR (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lituania), suddividendo il protocollo di amplificazione in due reazioni RT-PCR separate. Nel totale, sono state utilizzate

sei coppie di primer per coprire completamente l'intero genoma di RSV. Da sei coppie di primers si sono generati sei ampliconi genici distinti.

La preparazione della *library*, ovvero l'insieme dei costrutti genici compatibili con il sistema di sequenziamento, è stata eseguita utilizzando il kit Illumina Microbial Amplicon Prep (Illumina Inc., Hayward, CA, USA), partendo da 20 µL del pool genico, derivante dall'unione dei sei ampliconi. Il kit prevede una fase di tagmentazione ed una reazione per l'aggiunta di *index*.

La tagmentazione è un processo enzimatico, ad opera di trasposasi, che svolge due azioni contemporaneamente: frammentazione, in cui il DNA viene tagliato in frammenti con una dimensione specifica e "*tagging*", fase in cui le trasposasi attaccano simultaneamente delle sequenze specifiche di DNA, chiamate adattatori, alle estremità dei frammenti.

Gli *index* (o *barcodes*) sono brevi sequenze di DNA che fungono da identificatori unici per ciascun campione ed il loro scopo principale è consentire il *multiplexing*, ovvero unire e sequenziare contemporaneamente più librerie di DNA (provenienti da campioni diversi) in un'unica corsa di sequenziamento. Essi vengono aggiunti ai singoli campioni mediante una reazione PCR, prevista dal kit di sequenziamento.

La qualità finale della *library* è stata valutata tramite elettroforesi su gel con una percentuale di agar pari a 1,5%, utilizzando il Midori GREEN Direct (NIPPON Genetics EUROPE, Düren, Germania) come sistema di rilevazione, in quanto intercalante della doppia elica di DNA.

Il *pool* finale di campioni, per garantire la fase di *multiplexing*, è stato eseguito unendo 5 µL di ciascun campione ("*pooled*") in un'unica mix di reazione. Il pool è stato successivamente purificato con 0,9x µL di AMPure XP Beads (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) ed eluito in 55 µL di *resuspension buffer* (RSB). Il sequenziamento è avvenuto mediante piattaforma di sequenziamento iSeq 100 (Illumina Inc., Hayward, CA, USA), con una concentrazione finale della *library* di 55 pM. L'analisi dei file FASTQ è stata eseguita con la *pipeline* Dragen Microbial Amplicon (Illumina Inc., Hayward, CA, USA) e le sequenze consenso ottenute sono state ulteriormente analizzate utilizzando il software online Nextclade (<https://clades.nextstrain.org/>).

3.3.2.2 Sequenziamento Sanger

L'RNA virale è stato estratto partendo da un input di 200 μ L di campione utilizzando, anche in questo caso, il sistema ELITE InGenius (ELITechGroup, Puteaux, Francia), con un'eluizione finale in 50 μ L.

Il sequenziamento Sanger consente di ottenere una sequenza nucleotidica di un gene specifico: è stato, infatti, sequenziato il gene codificante la glicoproteina G di RSV per l'analisi delle varianti virali. È stato sequenziato l'intero gene G ed amplificato tramite RT-PCR, utilizzando il set di primers descritto da Zatlava et al. [130, 131], con il kit di amplificazione SuperScript IV One-Step RT-PCR System (Invitrogen di Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lituania).

Il profilo termico di amplificazione è stato il seguente:

- 45 °C per 30'
- 98 °C per 2'
- 98 °C per 30'', 55 °C per 30'', 72 °C per 2' ed un'estensione finale a 72 °C per 5' (40 cicli).

La fase successiva è stata una *Nested* PCR. La *Nested* PCR è una PCR standard modificata dall'aggiunta di una coppia di primers esterni al frammento d'interesse, al fine di aumentare la resa della reazione. La *Nested* PCR è stata eseguita con 5 μ L di DNA precedentemente amplificato ed i reagenti forniti dal kit Platinum II Taq Hot-Start DNA Polymerase (Invitrogen di Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lituania). Il profilo termico di amplificazione è stato il seguente:

- 4 C° per 2'
- 94 C° per 30'', 55 C° per 30'', 68 C° per 2', con un'estensione finale di 68 C° per 5' (40 cicli).

L'ultima reazione è stata la PCR per l'esecuzione del sequenziamento, in quanto avviene l'incorporazione di dNTPs modificati, ovvero dideossinucleotidi trifosfato (ddNTPs) per generare dei frammenti marcati che consentiranno la rilevazione delle singole basi nucleotidiche presenti nel frammento d'interesse.

I prodotti delle diverse PCR sono stati due ampliconi di grandezze differenti: 969 bp per RSV A e 954 bp per RSV B. I prodotti di amplificazione sono stati caricati su un gel di agarosio all'1,5% con il Midori Green Direct (NIPPON Genetics EUROPE, Düren, Germania) come colorante intercalante del DNA, al fine di controllare l'esito delle diverse amplificazioni.

I prodotti di PCR sono stati, infine, purificati con il kit *ExoSAP-IT PCR Product Cleanup Reagent* (applied biosystems di Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lituania), al fine di purificare ulteriormente l'amplificato da contaminanti (primers in eccesso, dNTPs non incorporati) che potrebbero interferire con la fase successiva.

Il sequenziamento Sanger è stato eseguito sul sistema SeqStudio Genetic Analyzer (applied biosystems di Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA). Le sequenze consenso, ottenute mediante l'allineamento con i genomi di riferimento (EPI_ISL_412866 e EPI_ISL_1653999 rispettivamente per RSV A e RSV B), sono state successivamente analizzate utilizzando il software online Nextclade (<https://clades.nextstrain.org/>).

3.4 Analisi statistica

I tassi di rilevazione e di complicità dell'RSV sono stati espressi con intervalli di confidenza (IC) esatti al 95% (*Clopper-Pearson*). Le caratteristiche dei pazienti arruolati nei gruppi ARI e ILI, così come quelle dei pazienti risultati positivi e negativi all'RSV, sono state confrontate tramite il test esatto di Fisher o *t-test*.

Considerando la natura dei dati “*a cluster*”, è stata utilizzata la regressione logistica con equazioni di stima generalizzata (GEE) per studiare l'associazione tra la positività all'RSV e il gruppo di sorveglianza, nonché tra la positività all'RSV e i segni/sintomi riportati. L'entità dell'effetto è stata espressa come *odds ratio* (OR) con IC al 95%.

La variabile dipendente era il rilevamento di qualsiasi RSV o il singolo rilevamento di RSV. I modelli GEE di base sono stati corretti per adattare l'effetto delle dimensioni variabili dei cluster (ovvero, il numero di tamponi raccolti dai singoli medici di base), includendo il logaritmo della dimensione del cluster come *offset*.

Sono state quindi condotte diverse analisi di sensibilità:

1. L'*offset* della dimensione del cluster è stato escluso dalla specificazione del modello.
2. Sono stati aggiunti potenziali fattori: stagione, sesso, età, nazionalità, stato di fumatore e presenza di comorbidità.
3. Per ridurre il rumore dovuto ai GP con pochi arruolamenti, il set di dati è stato limitato ai cluster con > 30 tamponi.

In tutti i modelli è stato utilizzato lo schema di varianza *sandwich*, per calcolare errori standard. I dati sono stati analizzati utilizzando i pacchetti R, v. 4.5.0 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

4. RISULTATI

4.1 Risultati stagione 2023/2024

Nella prima stagione dello studio, 2023/2024, sono stati arruolati un totale di 524. Sei soggetti sono stati esclusi perché non rientravano nei requisiti: quattro erano < 50 anni e due sono stati sottoposti a tampone al di fuori della finestra temporale consentita. In aggiunta, un campione è stato scartato dai test, in quanto mancante di un fiocco di cotone all'interno della provetta di trasporto, pertanto, l'analisi si è basata su 517 campioni. Di questi, il 48.4 % (n = 250) e il 51.6 % (n = 267) degli individui sono stati arruolati dai MMG (Medici di Medicina Generale) rispettivamente nei gruppi ARI e ILI. Due terzi (62.3 %) degli individui arruolati erano donne e la loro età media era 66.7 anni. Le malattie cardiovascolari (34.2 %) e respiratorie (19.7 %) erano le più frequentemente registrate. I gruppi ARI e ILI erano comparabili in termini di caratteristiche sociodemografiche, mese della visita dal MMG e prevalenza della maggior parte delle condizioni di salute sottostanti, eccetto per il diabete (11.2 % vs 5.2 %; p = 0.015) e le malattie reumatiche (2.0 % vs 11.2 %; p < 0.001). Inoltre, il periodo tra l'insorgenza dei sintomi e la visita dal MMG è stato in media più breve nel gruppo ILI (3.0 vs 3.5 giorni; p = 0.002) (Tabella 1). In particolare, tutti i pazienti (100%; 267/267) appartenenti al gruppo ILI soddisfacevano anche la definizione di ARI, mentre il 96.0% (240/250) degli individui nel gruppo ARI soddisfaceva anche la definizione di ILI.

Caratteristiche	Livello	Totale (n = 517)	ARI (n = 250)	ILI (n = 267)	p-value
Sesso	Femmina	62.3 (322)	61.6 (154)	62.9 (168)	0.79
	Maschio	37.7 (195)	38.4 (96)	37.1 (99)	
Età (anni)	Media (SD)	66.7 (10.6)	67.3 (10.6)	66.2 (10.6)	0.27
	50–59	28.4 (147)	26.0 (65)	30.7 (82)	0.51
	60–69	35.4 (183)	36.8 (92)	34.1 (91)	
	≥ 70	36.2 (187)	37.2 (93)	35.2 (94)	
Nazionalità	Italiano	93.0 (481)	93.6 (234)	92.5 (247)	0.73
	Straniero	7.0 (36)	6.4 (16)	7.5 (20)	
Tamponi per mese	Ott 2023	8.1 (42)	8.0 (20)	8.2 (22)	0.55
	Nov 2023	26.5 (137)	26.4 (66)	26.6 (71)	
	Dic 2023	13.7 (71)	14.0 (35)	13.5 (36)	
	Gen 2024	18.2 (94)	17.2 (43)	19.1 (51)	
	Feb 2024	14.3 (74)	16.8 (42)	12.0 (32)	
	Mar 2024	10.3 (53)	10.8 (27)	9.7 (26)	
	Apr 2024	8.9 (46)	6.8 (17)	10.9 (29)	
Ritardo del tampone	Media (SD)	3.2 (1.7)	3.5 (1.7)	3.0 (1.6)	0.002
Condizioni di salute pregresse	Cardiovascolari	34.2 (177)	33.2 (83)	35.2 (94)	0.64
	Respiratorie	19.7 (102)	19.6 (49)	19.9 (53)	0.99
	Diabete	8.1 (42)	11.2 (28)	5.2 (14)	0.015
	Epatiche	1.4 (7)	2.0 (5)	0.7 (2)	0.27
	Renali	3.9 (20)	5.2 (13)	2.6 (7)	0.17
	Reumatiche	6.8 (35)	2.0 (5)	11.2 (30)	< 0.001
	Anemia	4.1 (21)	5.2 (13)	3.0 (8)	0.27
	Demenza	2.1 (11)	2.4 (6)	1.9 (5)	0.77
	Cancro	9.3 (48)	7.2 (18)	11.2 (30)	0.13
	Immunosoppressione	3.7 (19)	3.6 (9)	3.7 (10)	0.99
Fumo	Mai fumato	56.9 (294)	56.8 (142)	56.9 (152)	0.51
	Ex-fumatore	27.5 (142)	29.2 (73)	25.8 (69)	
	Fumatore	15.7 (81)	14.0 (35)	17.2 (46)	

Tabella 1: Caratteristiche dei soggetti arruolati. (ARI: infezione respiratoria acuta; ILI: sindrome simil-influenzale; SD: deviazione standard).

Il 25.9% (IC 95%: 22.2–29.9%) ed il 37.5 % (IC 95%: 33.3–41.9%) dei pazienti ha riportato un precedente contatto rispettivamente con bambini e adulti sintomatici: mentre la prevalenza dei contatti precedenti con bambini malati era simile ($p = 0.69$) tra i gruppi ARI (26.8 %) e ILI (25.1 %), i contatti con soggetti sintomatici adulti erano più frequenti nel gruppo ILI (41.6 % vs 33.2 %; $p = 0.056$). Rispetto al gruppo ARI, gli adulti nel gruppo ILI hanno riportato più frequentemente febbre o stato febbrile (79.0 % vs 62.0 %; $p < 0.001$), nausea (26.6 % vs 18.8 %; $p = 0.037$), mal di gola (65.9 % vs 56.4 %; $p = 0.030$), ronchi (24.0 % vs 16.8 %; $p = 0.050$), starnuti (73.4 % vs 64.8 %; $p = 0.036$) e alterazione dell'olfatto (19.1 % vs 12.4 %; $p = 0.041$) (Tabella 2).

Sintomo	Livello	% (n/Totale) ARI (N=250)	% (n/Totale) ILI (N=267)	p-value
Sistemico	Febbre/stato febbrile	62.0 (155/250)	79.0 (211/267)	< 0.001
	37–37.9 °C	46.4 (71/153)	40.7 (81/199)	
	38–38.9 °C	45.1 (69/153)	45.7 (91/199)	0.27
	≥ 39	8.5 (13/153)	13.6 (27/199)	
	Brividi	58.8 (147/250)	61.0 (163/267)	0.65
	Mal di testa	59.2 (148/250)	65.2 (174/267)	0.17
	Mialgia	62.0 (155/250)	65.5 (175/267)	0.41
	Artralgia	60.8 (152/250)	62.2 (166/267)	0.79
	Malessere	90.4 (226/250)	84.6 (226/267)	0.063
	Appetito ridotto	44.4 (111/250)	48.7 (130/267)	0.33
Nausea	18.8 (47/250)	26.6 (71/267)	0.037	
Diarrea	10.8 (27/250)	11.2 (30/267)	0.89	
Respiratorio	Qualsiasi tosse	92.4 (231/250)	91.8 (245/267)	0.87
	Tosse con espettorato	59.2 (148/250)	55.4 (148/267)	0.42
	Dispnea	23.6 (59/250)	21.0 (56/267)	0.53
	Ronchi	16.8 (42/250)	24.0 (64/267)	0.050
	Sibilo	18.0 (45/250)	12.4 (33/267)	0.085
	Tachipnea	2.8 (7/250)	4.1 (11/267)	0.48
	Necessità di O2	0.8 (2/250)	0.7 (2/267)	0.99
	Bassa/ridotta SaO2	5.3 (13/247)	5.7 (15/263)	0.85
	Mal di gola	56.4 (141/250)	65.9 (176/267)	0.030
	Starnuti	64.8 (162/250)	73.4 (196/267)	0.036
	Congestione nasale/Rinorrea	75.2 (188/250)	76.0 (203/267)	0.84
	Olfatto alterato	12.4 (31/250)	19.1 (51/267)	0.041
	Gusto alterato	13.6 (34/250)	19.1 (51/267)	0.098

Tabella 2: Frequenza dei sintomi tra i soggetti arruolati.

Nel complesso, RSV è stato rilevato nel 7,0 % dei campioni (IC al 95 %: 4,9–9,5 %; 36/517). La prevalenza di RSV nel gruppo ARI (8,0 %; IC al 95 %: 5,0–12,1 %; 20/250) era superiore rispetto al gruppo ILI (6,0 %; IC al 95 %: 3,5–9,5 %; 16/267) con un OR (Odds Ratio) di 1,36 (IC al 95 %: 0,69–2,70), sebbene la differenza tra i gruppi ARI e ILI non sia risultata significativa ($p = 0,39$). È da notare che tutti i 36 individui positivi all'RSV soddisfacevano sia la definizione di caso ARI che quella ILI. Più in generale, ≥ 1 patogeno è stato identificato nel 76,2 % (394/517) degli individui e questo dato era simile tra i gruppi ARI (75,2 %) e ILI (77,2 %) (Tabella 3). Il restante 23,8 % (123/517) è risultato negativo per tutti i patogeni virali e batterici. A parte l'RSV, altri virus respiratori rilevati sono stati il rhinovirus (19,7 %), SARS-CoV-2 (14,7 %), l'influenza (11,4 %) e il metapneumovirus (8,3 %). Tra i batteri, l'*Haemophilus influenzae* (19,0 %) e lo *Streptococcus pneumoniae* (4,4 %) sono stati i più rappresentati. Contrariamente all'RSV, la positività per l'influenza (10,4 % vs 12,4 %) e SARS-CoV-2 (12,4 % vs 16,9 %) era inferiore nel gruppo ARI rispetto al gruppo ILI e gli OR corrispondenti erano 0,82 (IC al 95 %: 0,48–1,42) e 0,70 (IC al 95 %: 0,43–1,15). Le differenze tra i gruppi non erano significative né per l'influenza ($p = 0,49$) né per SARS-CoV-2 ($p = 0,17$).

Patogeno	% (n)	
	ARI (n = 250)	ILI (n = 267)
≥ 1	75.2 (188)	77.2 (206)
Any RSV	8.0 (20)	6.0 (16)
RSV A	4.4 (11)	4.1 (11)
RSV B	3.6 (9)	1.9 (5)
SARS-CoV-2	12.4 (31)	16.9 (45)
Any influenza	10.4 (26)	12.4 (33)
Influenza A(H1N1)pdm09	8.4 (21)	8.6 (23)
Influenza A(H3N2)	1.2 (3)	2.2 (6)
Influenza A	0.8 (2)	1.1 (3)
Influenza B	0 (0)	0.4 (1)
Adenovirus	2.0 (5)	0.4 (1)
Enterovirus	0 (0)	0.4 (1)
Metapneumovirus	9.2 (23)	7.5 (20)
Parainfluenza virus 1	0 (0)	0.7 (2)
Parainfluenza virus 2	0 (0)	0 (0)
Parainfluenza virus 3	0.8 (2)	3.4 (9)
Parainfluenza virus 4	0.8 (2)	1.5 (4)
Bocavirus	0 (0)	0 (0)
Coronavirus 229E	1.2 (3)	1.5 (4)
Coronavirus NL63	0 (0)	0 (0)
Coronavirus OC43	3.6 (9)	4.9 (13)
Rhinovirus	20.0 (50)	19.5 (52)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6.0 (15)	3.0 (8)
<i>Bordetella pertussis</i>	0.4 (1)	0.4 (1)
<i>Bordetella parapertussis</i>	0 (0)	0 (0)
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	0 (0)	0.4 (1)
<i>Haemophilus influenzae</i>	21.2 (53)	16.9 (45)
<i>Legionella pneumophila</i>	0 (0)	0 (0)
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	2.4 (6)	0.4 (1)

Tabella 3: Risultati dei patogeni respiratori rilevati mediante RT-PCR, suddivisi in gruppo ARI e ILI.

Tra i campioni positivi all'RSV, il 52,8 % (19/36) aveva una singola positività per RSV, il restante 47,2 % dei campioni mostrava delle co-infezioni con almeno un altro patogeno, di cui *Haemophilus influenzae* era il più frequente (Tabella 4). La prevalenza di singole infezioni da RSV era del 4,8 % (IC al 95 %: 2,5–8,2 %; 12/250) nel gruppo ARI e del 2,6 % (IC al 95 %: 1,1–5,3 %; 7/267) nel gruppo ILI con un OR di 1,87 (IC al 95 %: 0,73–4,84).

Co-infezioni	% (casi/totale)
RSV A + <i>Haemophilus influenzae</i>	13.9 (5/36)
RSV A + Rhinovirus	2.8 (1/36)
RSV A + Influenza A(H3N2)	2.8 (1/36)
RSV A + Enterovirus	2.8 (1/36)
RSV A + Rhinovirus + <i>Haemophilus influenzae</i>	2.8 (1/36)
RSV A + Coronavirus OC43 + <i>Haemophilus influenzae</i>	2.8 (1/36)
RSV A + Parainfluenza virus 3 + Rhinovirus + <i>Haemophilus influenzae</i>	2.8 (1/36)
RSV B + <i>Haemophilus influenzae</i>	5.6 (2/36)
RSV B + Influenza A(H1N1)pdm09	2.8 (1/36)
RSV B + Adenovirus	2.8 (1/36)
RSV B + Metapneumoovirus	2.8 (1/36)
RSV B + Metapneumoovirus + <i>Haemophilus influenzae</i>	2.8 (1/36)

Tabella 4: Frequenza delle co-infezioni dei campioni risultati positivi per RSV.

La maggior parte (86,1 %; 31/36) dei casi di RSV è stata rilevata tra gennaio e febbraio 2024 (Figura 3A). Infatti, a gennaio [ARI: 20,9 % (9/43); ILI: 15,7 % (8/51)] e a febbraio [ARI: 19,0 % (8/42); ILI: 18,8 % (6/32)] circa un quinto di tutti i campioni è risultato positivo all'RSV. Rispetto al gruppo ILI, la curva di andamento osservata nel gruppo ARI è risultata anticipata dunque traslata verso sinistra (Figura 3B). Entrambi i sottotipi di RSV, A (61,1 %; 22/36) e B (38,9 %; 14/36), hanno co-circolato durante la stagione.

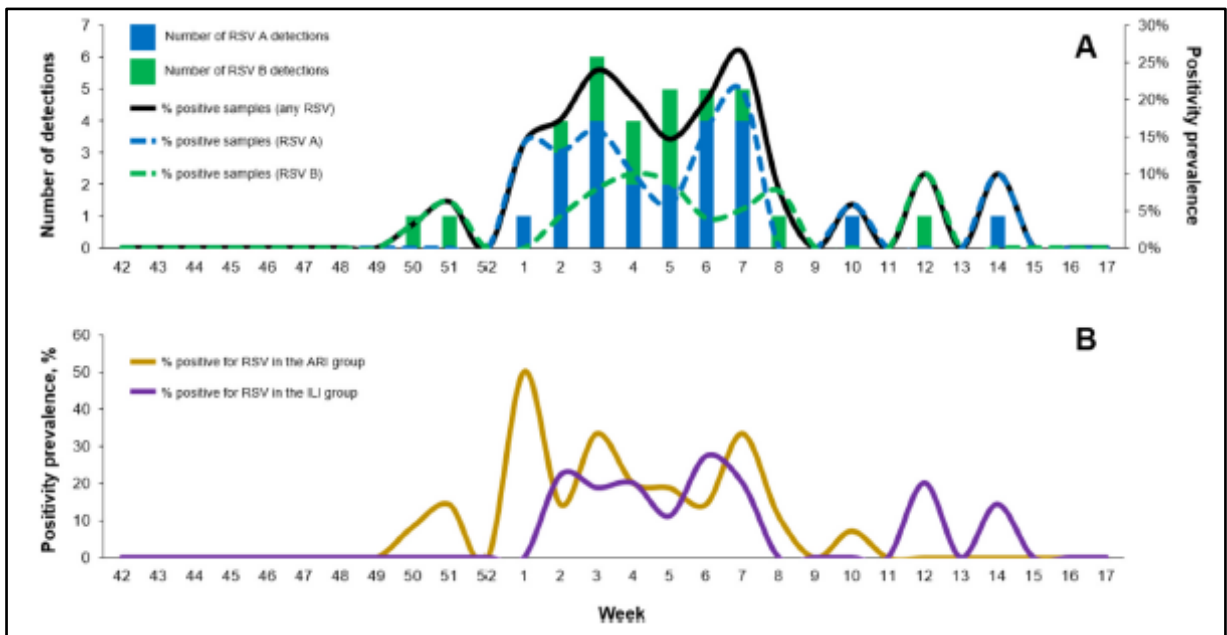


Figura 3: Andamento settimanale dei campioni positivi per RSV, suddivisi per sottotipo (A) e gruppo di studio ARI o ILI (B).

Dei campioni RSV sequenziati appartenenti al sottotipo A (n = 17), il 47,1 %, 23,5 %, 11,8 %, 11,8 % e 5,9 % appartenevano rispettivamente ai *subclades* A.D.1, A.D.5.1, A.D.5.2, A.D.3 e A.D.5. La popolazione di RSV B (n = 12) era rappresentata dai *subclades* B.D.E.1 (66,7 %) e B.D.4.1.1 (33,3 %) (Tabella 5).

Sottotipo	Nome sequenza	EPI ISL	Data prelievo	Metodo	Clade
A	hRSV/A/Italy/LIG0102-1/2024	EPI_ISL_19046486	01/02/2024	NGS	A.D.3
A	hRSV/A/Italy/LIG0201-1/2024	EPI_ISL_19028656	02/01/2024	Sanger	A.D.1
A	hRSV/A/Italy/LIG0502-1/2024	EPI_ISL_19028665	05/02/2024	NGS	A.D.1
A	hRSV/A/Italy/LIG0504-1/2024	EPI_ISL_19054862	05/04/2024	Sanger	A.D.1
A	hRSV/A/Italy/LIG0602-1/2024	EPI_ISL_19028667	06/02/2024	NGS	A.D.1
A	hRSV/A/Italy/LIG0602-2/2024	EPI_ISL_19028666	06/02/2024	Sanger	A.D.1
A	hRSV/A/Italy/LIG0602-3/2024	EPI_ISL_19028664	06/02/2024	Sanger	A.D.5.1
A	hRSV/A/Italy/LIG0703-1/2024	EPI_ISL_19028668	07/03/2024	Sanger	A.D.1
A	hRSV/A/Italy/LIG0801-1/2024	EPI_ISL_19045982	08/01/2024	NGS	A.D.5
A	hRSV/A/Italy/LIG1001-1/2024	EPI_ISL_19028657	10/01/2024	Sanger	A.D.5.2
A	hRSV/A/Italy/LIG1201-1/2024	EPI_ISL_19028372	12/01/2024	Sanger	A.D.1
A	hRSV/A/Italy/LIG1601-1/2024	EPI_ISL_19028658	16/01/2024	Sanger	A.D.5.1
A	hRSV/A/Italy/LIG1601-2/2024	EPI_ISL_19028609	16/01/2024	Sanger	A.D.5.1
A	hRSV/A/Italy/LIG1601-3/2024	EPI_ISL_19045981	16/01/2024	NGS	A.D.5.2
A	hRSV/A/Italy/LIG2301-1/2024	EPI_ISL_19028659	23/01/2024	Sanger	A.D.5.1
A	hRSV/A/Italy/LIG2801-1/2024	EPI_ISL_19045983	28/01/2024	NGS	A.D.3
A	hRSV/A/Italy/LIG2901-1/2024	EPI_ISL_19028662	29/01/2024	Sanger	A.D.1
B	hRSV/B/Italy/LIG0102-1/2024	EPI_ISL_19045985	01/02/2024	NGS	B.D.E.1
B	hRSV/B/Italy/LIG0502-1/2024	EPI_ISL_19046487	05/02/2024	NGS	B.D.E.1
B	hRSV/B/Italy/LIG0801-1/2024	EPI_ISL_19045982	08/01/2024	NGS	B.D.E.1
B	hRSV/B/Italy/LIG1112-1/2023	EPI_ISL_19028646	11/12/2023	NGS	B.D.4.1.1
B	hRSV/B/Italy/LIG1502-1/2024	EPI_ISL_19046533	15/02/2024	NGS	B.D.4.1.1
B	hRSV/B/Italy/LIG1601-1/2024	EPI_ISL_19045980	16/01/2024	NGS	B.D.4.1.1
B	hRSV/B/Italy/LIG1803-1/2024	EPI_ISL_19046537	18/03/2024	NGS	B.D.E.1
B	hRSV/B/Italy/LIG1912-1/2023	EPI_ISL_19028655	19/12/2023	NGS	B.D.E.1
B	hRSV/B/Italy/LIG2102-1/2024	EPI_ISL_19046534	21/02/2024	NGS	B.D.E.1
B	hRSV/B/Italy/LIG2201-1/2024	EPI_ISL_19028661	22/01/2024	Sanger	B.D.E.1
B	hRSV/B/Italy/LIG2301-1/2024	EPI_ISL_19028660	23/01/2024	NGS	B.D.E.1
B	hRSV/B/Italy/LIG2901-1/2024	EPI_ISL_19045984	29/01/2024	NGS	B.D.4.1.1

Tabella 5: Risultati del sequenziamento (sanger o NGS) dei campioni positivi per RSV.

Tra gli individui positivi all'RSV (n = 36), il malessere (88,9 %) è stato il sintomo sistemico più comune. Il 63,9 % dei soggetti presentava febbre o febbre di basso grado. I sintomi respiratori più comuni includevano la tosse generica (94,4 %), gli starnuti (80,6 %) e la tosse con espettorato (75,0 %). Il respiro sibilante (*wheezing*) era presente in un quarto (25,0 %) dei soggetti (Tabella 6). Rispetto ai soggetti negativi all'RSV (n = 481), quelli risultati positivi presentavano una prevalenza maggiore (75,0 % vs 55,9 %; p = 0,035) di tosse con espettorato. La durata media di un episodio di RSV è stata di 18,8 giorni e durante questo periodo i pazienti hanno visitato il proprio MMG 1,5 volte. Tutti, tranne uno (97,2 %), hanno assunto almeno un farmaco a causa dell'infezione da RSV e a due terzi (61,1 %) è stato prescritto almeno un antibiotico. Complessivamente, 7 (19,4 %) pazienti hanno eseguito 12 procedure diagnostiche, di cui la più frequente è stata la radiografia del torace (50,0 %). Inoltre, quattro (11,1 %) individui hanno effettuato una visita specialistica. Un terzo degli individui (33,3 %; IC al 95 %: 18,6–51,0 %) ha sviluppato almeno una complicanza, di cui la polmonite è stata registrata nell'8,3 % (3/36) dei pazienti. C'è stato un solo caso ospedalizzato (2,8 % rispetto ai soggetti positivi all'RSV e 8,3 % rispetto ai casi complicati) che ha interessato una donna di 71 anni che ha sviluppato un versamento pleurico. Il suo campione è risultato positivo per RSV B ed *Haemophilus influenzae*. Non sono stati registrati decessi durante il follow-up.

Sintomo		% (n) qualsiasi RSV (n=36)	% (n) singola rilevazione RSV (n=19)
Sistemico	Febbre/febbricola	63,9 (23)	57,9 (11)
	37–37,9 °C	40,9 (9)a	45,5 (5)
	38–38,9 °C	45,5 (10)a	54,5 (6)
	≥39 °C	13,6 (3)a	0 (0)
	Brividi	63,9 (23)	47,4 (9)
	Mal di testa	50,0 (18)	52,6 (10)
	Mialgia	55,6 (20)	52,6 (10)
	Artralgia	50,0 (18)	42,1 (8)
	Malessere	88,9 (32)	89,5 (17)
	Appetito ridotto	55,6 (20)	47,4 (9)
	Nausea	22,2 (8)	21,1 (4)
	Diarrea	16,7 (6)	21,1 (4)
Respiratorio	Tosse generica	94,4 (34)	100 (19)
	Tosse con espettorato	75,0 (27)	89,5 (17)
	Dispnea	25,0 (9)	56,3 (5)
	Ronchi	25,0 (9)	21,1 (4)
	Respiro sibilante (Wheezing)	25,0 (9)	21,1 (4)
	Tachipnea	0 (0)	0 (0)
	Necessità di O2	0 (0)	0 (0)
	SaO2 bassa/ridotta	5,6 (2)	5,3 (1)
	Mal di gola	55,6 (20)	47,4 (9)
	Starnuti	80,6 (29)	73,7 (14)
	Congestione nasale/Rinorrea	66,7 (24)	68,4 (13)
	Alterazione dell'olfatto	25,0 (9)	15,8 (3)
	Alterazione del gusto	22,2 (8)	15,8 (3)

Tabella 6: Frequenza dei sintomi dei soggetti arruolati risultati per RSV.

4.2 Risultati stagione 2024/2025

Nell'arco delle due stagioni, i 38 Medici di Base (MMG) (18 nei gruppi ARI e 20 nei gruppi ILI) hanno arruolato 1443 soggetti (2023/2024: n = 524; 2024/2025: n = 919). Dodici soggetti (0,8%) sono stati esclusi per le seguenti ragioni: cinque erano < 50 anni; quattro sono stati sottoposti a tampone al di fuori della finestra temporale consentita; due non soddisfacevano la definizione di ARI/ILI; e un campione mancava del fiocco di cotone all'interno della provetta di trasporto, risultando un campione non idoneo all'analisi. Il totale dei soggetti arruolati, dunque, è stato di 1431. L'età media dei partecipanti era di 67,9 anni e il sesso femminile è stato prevalente (62,4%). Due terzi (61,7%) dei pazienti avevano almeno una comorbidità, tra cui le malattie cardiovascolari (42,9%) e respiratorie (17,7%) erano le più prevalenti (Tabella 7).

Il 51,8% (n = 741) e il 48,2% (n = 690) dei soggetti è stato arruolato da MMG suddivisi random nei gruppi ARI e ILI, rispettivamente.

Caratteristica	Livello	n (%)			p-value (ARI vs. ILI)
		Totale (n = 1431)	ARI (n = 741)	ILI (n = 690)	
Sesso	Femmina	893 (62,4)	465 (62,8)	428 (62,0)	0,79
	Maschio	538 (37,6)	276 (37,2)	262 (38,0)	
Età, anni	Media (DS)	67,9 (11,3)	68,7 (11,3)	67,1 (11,1)	0,009
	50-64	622 (43,5)	300 (40,5)	322 (46,7)	0,058
	65-74	379 (26,5)	204 (27,5)	175 (25,4)	
	> 75	430 (30,0)	237 (32,0)	193 (28,0)	
Nazionalità	Italiana	1340 (93,6)	711 (96,0)	629 (91,2)	< 0,001
	Straniera	91 (6,4)	30 (4,0)	61 (8,8)	
Stagione	2023/2024	517 (36,1)	250 (33,7)	267 (38,7)	0,054
	2024/2025	914 (63,9)	491 (66,3)	423 (61,3)	
Condizioni di salute preesistenti	> 1	883 (61,7)	446 (60,2)	437 (63,3)	0,23
	Cardiovascolari	614 (42,9)	319 (43,0)	295 (42,8)	0,92
	Respiratorie	254 (17,7)	129 (17,4)	125 (18,1)	0,73
	Diabete	121 (8,5)	70 (9,4)	51 (7,4)	0,18
	Epatica	34 (2,4)	14 (1,9)	20 (2,9)	0,23
	Renale	63 (4,4)	35 (4,7)	28 (4,1)	0,61
	Anemia	56 (3,9)	29 (3,9)	27 (3,9)	0,99
	Obesità	142 (9,9)	74 (10,0)	68 (9,9)	0,99
	Demenza	33 (2,3)	15 (2,0)	18 (2,6)	0,49
	Cancro	149 (10,4)	64 (8,6)	85 (12,3)	0,024
Immunosoppressione	52 (3,6)	24 (3,2)	28 (4,1)	0,48	
Fumatore	No	808 (56,5)	641 (86,5)	568 (82,3)	0,034
	Sì	222 (15,5)	100 (13,5)	122 (17,7)	

Tabella 7: Caratteristiche dei soggetti arruolati nelle stagioni 2023/2024 e 2024/2025.

L'RSV è stato rilevato nel 5,2% (75/1431; IC 95% 4,1–6,5%) dei partecipanti e il suo tasso di rilevamento è risultato più alto nella stagione 2023/2024 rispetto alla stagione 2024/2025 (7,0% contro 4,3%). L'RSV ha rappresentato il 7,8% (75/965) di tutte le rilevazioni virali e il 5,7% (75/1315) di tutte le rilevazioni virali/batteriche. Durante la prima stagione, l'RSV ha raggiunto un picco tra gennaio e febbraio 2024 con un tasso di positività mensile massimo del 18,9%. Al contrario, nella stagione 2024/2025, i tassi di rilevamento osservati si sono stabilizzati ad un livello relativamente basso (Figura 4A). Sebbene siano circolati entrambi i sottotipi di RSV, l'RSV A è risultato predominante in entrambe le stagioni (2023/2024: 61,1%; 2024/2025: 69,2%) (Figura 4B).

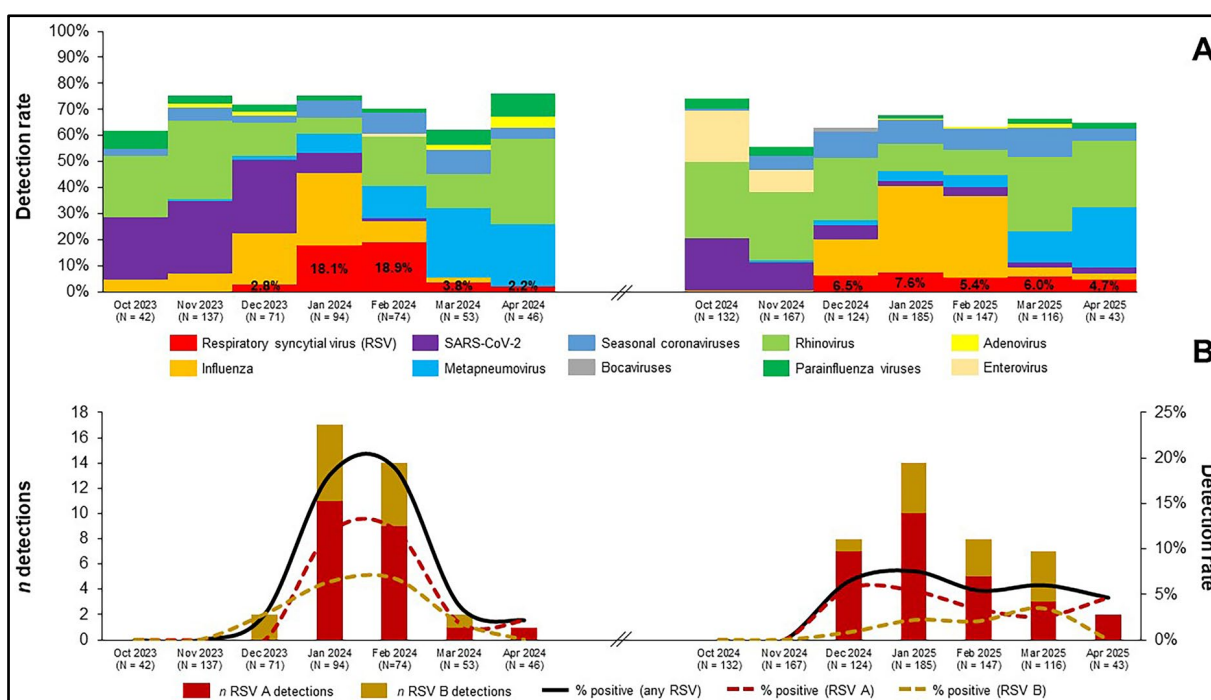


Figura 4: Andamento di RSV e di altri virus respiratori nella stagione 2023/2024 e 2024/2025 (A) ed andamento di RSV, suddiviso per sottotipo durante le due stagioni (B).

I campioni positivi all' RSV A e successivamente sequenziati (n = 41) è stata eterogenea in quanto rappresentata dai *clades* A.D.1 (26,8%), A.D.3 (51,2%) e A.D.5 (22,0%). Le sequenze dei ceppi di RSV B (n = 23) appartenevano a quattro diversi *clades*, di cui B.D.E.1 (69,6%) era il più rappresentato. In tabella 8 sono mostrati i dati relativi ai campioni caratterizzati con metodiche di sequenziamento raccolti nella stagione 2024/2025.

Sottotipo RSV	Clade	Stagione	n (totale isolati)	%	Codice GISAID
A (n = 41)	A.D.1	2024/2025	2	4.9	EPI_ISL_19687321, EPI_ISL_19866267
A (n = 41)	A.D.1.4	2024/2025	2	4.9	EPI_ISL_19687322, EPI_ISL_19866268
A (n = 41)	A.D.1.5	2024/2025	3	7.3	EPI_ISL_19866266, EPI_ISL_19866265, EPI_ISL_1986668
A (n = 41)	A.D.3	2024/2025	19	46.3	EPI_ISL_19687309, EPI_ISL_19687322, EPI_ISL_19687310, EPI_ISL_19687312, EPI_ISL_19687316, EPI_ISL_19687313, EPI_ISL_19687314, EPI_ISL_19687315, EPI_ISL_19687319, EPI_ISL_19866266, EPI_ISL_19866258, EPI_ISL_19866341, EPI_ISL_19866257, EPI_ISL_19866266, EPI_ISL_19866255, EPI_ISL_19866340, EPI_ISL_19866256, EPI_ISL_19866261, EPI_ISL_19866259
A (n = 41)	A.D.5.1	2024/2025	1	2.4	EPI_ISL_19866339
A (n = 41)	A.D.5.2	2024/2025	1	2.4	EPI_ISL_19866268
B (n = 23)	B.D.4.1.1	2024/2025	1	4.3	EPI_ISL_19866273
B (n = 23)	B.D.E.1	2024/2025	9	39.1	EPI_ISL_19687311, EPI_ISL_19687320, EPI_ISL_19687318, EPI_ISL_19866368, EPI_ISL_19866272, EPI_ISL_19866271, EPI_ISL_19866269, EPI_ISL_19866343, EPI_ISL_19866270

Tabella 8: Analisi filogenetica dei ceppi di RSV, rilevati nei campioni di soggetti arruolati nella stagione 2024/2025.

Dei 75 casi di RSV, 47 (62,7%) erano singole rilevazioni di RSV, 10 (13,3%) campioni erano co-rilevati con altri virus respiratori, di cui il rinovirus umano era il più comune, 11 (14,7%) erano co-rilevati con H. influenzae e/o S. pneumoniae, mentre i restanti sette (9,3%) campioni mostravano un pattern misto di co-rilevazione virale/batterica. I risultati delle diverse co-infezioni sono mostrati nel Grafico 1.

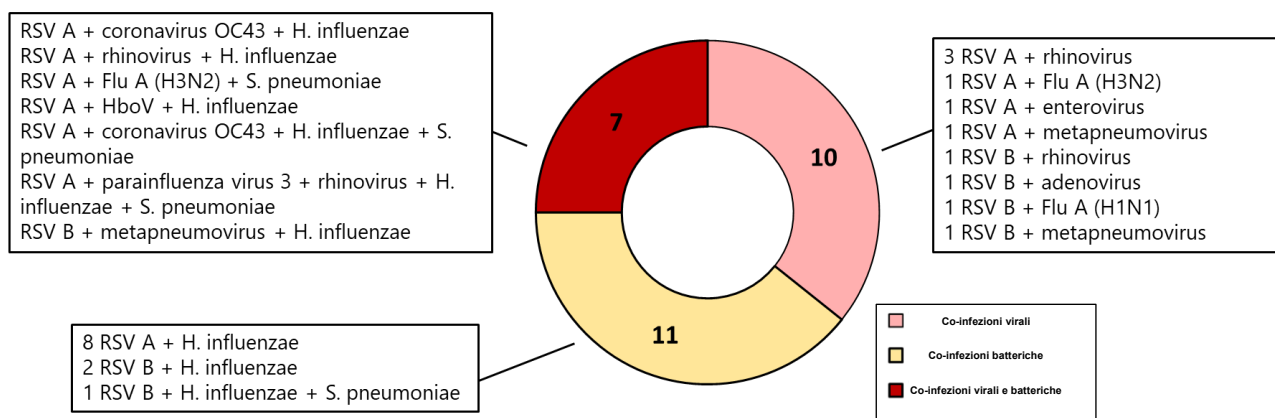


Grafico 1: Risultati dei 28 campioni che mostravano pattern di co-infezioni molteplici (solo virali, solo batteriche, virali e batteriche).

Il test antigenico RADT ha mostrato un più basso PPA (Percentuale di Concordanza Positiva) pari al 22,7%, rispetto ai risultati in PCR, mentre NPA (Percentuale di Concordanza Negativa) è stato del 100%. Infatti, se fosse stato utilizzato solo il RADT, la prevalenza complessiva di RSV sarebbe scesa dal 5,2% all'1,2%. Il RADT per RSV ha avuto una performance comparativamente buona (PPA 63,2%) solo per i campioni con elevata carica virale (soglia del ciclo < 25) (Tabella 9).

Parametro	% (n/Totale)	IC 95%
PPA	22.7 (17/75)	14.7–33.3
ct RT-PCR < 25	63.2 (12/19)	41.0–80.9
ct RT-PCR 25–29	21.7 (5/23)	9.7–41.9
ct RT-PCR < 30	40.5 (17/42)	27.0–55.5
ct RT-PCR > 30	0 (0/33)	0–10.4
NPA	100 (1,356/1,356)	99.7–100
Accuratezza complessiva	95.9 (1,373/1,431)	94.8–96.9
Valore predittivo positivo	100 (17/17)	81.6–100
Valore predittivo negativo	95.9 (1,356/1,414)	94.7–96.8

Tabella 9: Performance diagnostiche del test antigenico rapido (RADT) per RSV, confrontate con i valori *ct* (*cycle threshold*) ottenuti in RT-PCR.

Analogamente, anche la performance diagnostica dei due saggi RT-PCR ha mostrato delle nette differenze: rispetto all'Allplex Respiratory Panel 1, PPA e NPA dell'Allplex SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV erano rispettivamente dell'85,3% e del 100%. La minore sensibilità di quest'ultimo kit ha interessato prevalentemente i campioni a bassa carica (soglia del ciclo > 30). I soggetti risultati positivi all'RSV erano prevalentemente rappresentati da una proporzione maggiore di femmine (77,3% contro 61,6%) e avevano almeno una condizione cronica (72,0% contro 61,1%), in particolare malattia renale (9,3% contro 4,1%) e obesità (18,7% contro 9,4%).

Nel complesso, il tasso di rilevamento dell'RSV nel gruppo ARI (5.8%; 43/741) è risultato superiore rispetto al gruppo ILI (4.6%; 32/690). Questo andamento è stato osservato in modo coerente sia nella stagione 2023/2024 (ARI: 8.0%; ILI: 6.0%) che 2024/2025 (ARI: 4.7%; ILI: 3.8%) e per entrambi i sottotipi RSV A (ARI: 3.8%; ILI: 3.0%) e RSV B (ARI: 2.0%; ILI: 1.6%). Dei 75 casi di RSV, il 100% (75/75), il 98.7% (74/75), il 28.4% (21/74) e il 33.8% (25/74) degli individui soddisfacevano rispettivamente i criteri ARI dell'ECDC, ILI dell'ECDC, ILI del CDC e ILI dell'OMS. I tassi di rilevamento dell'RSV erano leggermente più alti negli individui di età > 75 anni (5.6%; 24/430) rispetto agli adulti più giovani (65–74 anni: 4.7%, 18/379; 50–64 anni: 5.3%, 33/622). Considerando i singoli agenti patogeni rilevati, i pazienti nel gruppo ARI sono risultati positivi più frequentemente per adenovirus (ARI: 1.1% vs. ILI: 0.3%; OR 3.75, IC 95% 0.85–16.60), enterovirus (ARI: 3.2% vs. ILI: 2.5%; OR 1.32, IC 95% 0.54–3.23), metapneumovirus (ARI: 6.5% vs. ILI: 5.2%; OR 1.25, IC 95% 0.71–2.22) e batteri (ARI: 25.9% vs. ILI: 18.4%; OR 1.52, IC 95% 0.84–2.77). Al contrario, SARS-CoV-2 (ARI:

7.4% vs. ILI: 12.2%; OR 0.57, IC 95% 0.34–0.95), influenza A(H1N1)pdm09 (ARI: 6.1% vs. ILI: 8.0%; OR 0.74, IC 95% 0.46–1.19) e virus parainfluenzali (ARI: 1.9% vs. ILI: 3.0%; OR 0.61, IC 95% 0.30–1.26) sono stati riscontrati più spesso nel gruppo ILI.

Tra gli adulti positivi all'RSV, il malessere (92.0%) è stato il sintomo sistemico più comune, mentre la tosse (97.3%) e il raffreddore (90.7%) sono stati i sintomi respiratori più frequentemente segnalati. La febbre superiore ai 38°C è stata riportata solo dal 31.1% dei soggetti. Rispetto agli individui negativi all'RSV, i soggetti positivi avevano una prevalenza più elevata di diversi sintomi respiratori (respiro sibilante, tosse grassa, dispnea, rantoli, raffreddore, alterazione dell'olfatto e desaturazione), mentre nessun sintomo sistemico è stato predittivo di RSV.

Tutti i criteri ILI disponibili (ECDC, CDC e OMS) hanno mostrato una scarsa performance per l'RSV con valori di AUC (*Area Under the Curve*) < 0.51. La specificità è stata del 100% (64.9%; IC 95% 62.3–67.5%) con la definizione di caso dell'OMS, ma la sua sensibilità è stata comunque del 28.4% (IC 95% 19.4–39.5%).

Se si ipotizza una nuova definizione di caso RSV-specifica basata sulla definizione di ARI (RSV-ARI) considerando il respiro sibilante e/o tosse grassa e/o rantoli e/o dispnea, si osservano risultati migliori, con i corrispondenti parametri di AUC, sensibilità e specificità pari rispettivamente a 0.61 (IC 95% 0.58–0.65), 92.0% (IC 95% 83.6–96.3%) e 30.8% (IC 95% 28.4–33.3%). L'eventuale uso del solo sintomo respiro sibilante aumenterebbe la specificità fino all'86.7%, ma la sensibilità scenderebbe al 30.7%. Se applicata all'influenza, la definizione di caso alternativa RSV-ARI ha avuto una performance peggiore (AUC: 0.52; sensibilità: 74.2%; specificità: 30.1%), mentre i criteri ILI dell'OMS (AUC: 0.71; sensibilità: 71.1%; specificità: 71.0%) e del CDC (AUC: 0.71; sensibilità: 76.8%; specificità: 64.6%) hanno mostrato la migliore performance.

Tutti i partecipanti hanno completato il periodo di follow-up. Delle 75 infezioni da RSV, il 66.7% (50/75) non era completamente guarito entro il giorno 14, infatti la durata media dell'episodio di RSV è stata di 20.1 giorni. Ventitré pazienti (30.7%; IC 95% 20.5–42.4%) hanno sviluppato almeno una complicanza, che ha coinvolto principalmente (73.9%; 17/23) le basse vie respiratorie. Due casi di polmonite, di cui uno con versamento pleurico, hanno richiesto il ricovero ospedaliero (tasso di ospedalizzazione del caso 2.7%; IC 95% 0.3–9.3%) ed hanno interessato due donne di 71 e 96 anni. Il campione della prima è risultato positivo per RSV B e H. influenzae, mentre la seconda era positiva solo per RSV A. La donna di 96 anni ha poi sviluppato un'insufficienza respiratoria acuta ed è deceduta 16 giorni dopo la visita iniziale dal

medico che ha effettuato l'arruolamento (tasso di mortalità del caso 1.3%; IC 95% 0.0–7.2%).
Tutti i ricoveri ed il decesso si sono verificati nel gruppo ARI.

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

5.1 Discussione

Lo studio RESPIRA-50 è stato concepito nel tentativo di confrontare le definizioni di caso disponibili per l'RSV e di raccogliere dati sull'infezione da RSV acquisita in comunità negli adulti di età > 50 anni. Secondo l'OMS [132], l'interpretazione dei dati di sorveglianza globale sull'RSV è ostacolata dall'assenza di una definizione di caso standard. Anche i dati attuali sull'impatto dell'RSV negli adulti presentano varie limitazioni, sono stati spesso raccolti retrospettivamente [124] e pertanto dipendevano fortemente dall'accuratezza e completezza delle fonti di dati primarie. Le probabilità di rilevamento dell'RSV nei gruppi ARI rispetto ai gruppi ILI erano superiori del 26% ed invece, durante il tempo di osservazione, l'effettiva rilevazione di RSV è aumentata fino all'80%. Questa tendenza è stata osservata in modo coerente in entrambe le stagioni e per entrambi i sottotipi di RSV.

Sebbene l'entità dell'effetto dell'infezione sia indubbiamente rilevante per la sanità pubblica, gli intervalli di confidenza al 95% di tutte le stime erano relativamente ampi e includevano il valore nullo. Probabilmente, questa imprecisione è stata determinata da due fattori concomitanti. In primo luogo, c'è stata una grande variabilità nei tassi di arruolamento dei medici di medicina generale: diversi MMG hanno arruolato un numero inaspettatamente basso di pazienti. Un aumento della variabilità della dimensione del cluster può portare ad una perdita di efficienza [133]. Idealmente, potremo ottenere una stima reale del tasso di rilevamento dell'RSV monitorando un campione casuale della popolazione generale. In questo studio, così come nelle attuali reti di sorveglianza sentinella, l'ipotesi di casualità è probabilmente mancata perché il campione di individui sintomatici è stato selezionato dai MMG [134].

La seconda ragione del fallimento nel rifiutare l'ipotesi nulla è una circolazione relativamente bassa di RSV, specialmente nella seconda stagione. A questo proposito, il numero di casi di SARS-CoV-2 è stato circa il doppio (139 vs. 75) rispetto a quello dell'RSV e il tasso di rilevamento del primo virus è risultato significativamente più alto nel gruppo ILI. Nel programma pilota di sorveglianza dell'OMS [132], rispetto alla definizione di ILI (definita come febbre misurata > 38 °C più tosse), l'uso di una definizione di caso ARI estesa (infezione respiratoria con mancanza di respiro o tosse o mal di gola o raffreddore) ha mostrato un aumento del numero di rilevamenti di RSV. In uno studio di Korsten et al. [128] è stato dimostrato che solo 2 su 36 (6%) positivi all'RSV avevano febbre > 38 °C e la sensibilità della definizione ILI dell'OMS per l'RSV era pari solo all'11%. I risultati dello studio RESPIRA-50 sono in linea con

queste osservazioni, sebbene la sensibilità della definizione di caso ILI dell'OMS nel nostro studio fosse più alta (28,4%). D'altra parte, i criteri ILI dell'ECDC (Centro Europeo per la Prevenzione e il Controllo delle Malattie) sono molto meno rigorosi e più sensibili di quelli dell'OMS e consentono quindi di catturare più casi di RSV. Ad esempio, tra le altre manifestazioni cliniche e sintomi sistemici, la definizione di caso ILI dell'ECDC include il malessere, che è altamente non specifico. In questo studio, il malessere è stato il sintomo sistemico più comune riportato dal 92% degli adulti. Questo fatto implica che la definizione di caso ILI dell'ECDC per l'RSV è molto più sensibile dei criteri ILI dell'OMS e si avvicina alla definizione di caso ARI; in altre parole, la definizione di caso ILI dell'ECDC è un insieme della definizione di caso ARI dell'ECDC. Infatti, in questo studio, tutti gli adulti nel gruppo ILI soddisfacevano i criteri ARI dell'ECDC e la maggior parte (92,6%) dei pazienti nel gruppo ARI soddisfaceva anche i criteri ILI dell'ECDC.

Sebbene le definizioni altamente sensibili, come ARI, siano utili per scopi di sorveglianza in quanto possono catturare la maggior parte dei casi sintomatici, la loro bassa specificità può essere svantaggiosa in altre circostanze. Ad esempio, nei futuri studi di coorte o caso-controllo sull'efficacia del vaccino RSV, definizioni di caso scarsamente specifiche porterebbero a un aumento della dimensione campionaria richiesta (soprattutto durante le stagioni caratterizzate da una bassa circolazione di RSV) e di conseguenza a un aumento del carico di lavoro e dei costi. Ci sono anche alcune prove [135] che la vaccinazione contro l'RSV attenui la gravità dei sintomi nelle infezioni successive alla vaccinazione (infezione *breakthrough*). In quest'ultimo caso, l'uso di definizioni di caso più sensibili catturerebbe un maggior numero di casi di RSV vaccinati con sintomi lievi, il che potenzialmente comporterebbe una minore efficacia del vaccino.

Sulla base dei dati clinici emersi dagli episodi di RSV registrati durante il periodo di osservazione, è stata ritenuta valida la definizione di caso RSV-ARI definita come "ARI con respiro sibilante e/o tosse produttiva e/o ronchi e/o dispnea", che ha funzionato meglio delle alternative stabilite e ha mostrato un'accuratezza del 61,4%. Questa proposta è parzialmente allineata con i criteri alternativi RSV-specifici identificati in uno studio prospettico europeo [128]. In questo studio, è stato scoperto che la tosse produttiva (cioè infezione respiratoria con tosse e produzione di espettorato) era un sintomo discriminante tra 36 adulti anziani residenti in comunità positivi all'RSV ed era presente nel 94% dei casi. Sensibilità, specificità e AUC della sola tosse produttiva erano rispettivamente del 94%, 30% e 0,62. Tuttavia, prestazioni simili sono state osservate per l'influenza (89%, 31% e 0,60, rispettivamente). Per differenziare RSV e influenza, gli autori hanno aggiunto un criterio di "assenza di febbre" (cioè tosse

produttiva senza febbre misurata o sensazione di febbre); ciò ha determinato un aumento della specificità (55%) ma anche una sostanziale diminuzione della sensibilità (61%) [128]. Nello studio RESPIRA-50, basato su un numero maggiore di casi di RSV, la prevalenza della tosse produttiva con espettorato è stata inferiore (74,7% vs. 94%) e l'aggiunta di altri sintomi identificatori (respiro sibilante e dispnea) ha migliorato il potere discriminante. Inoltre, l'esclusione della febbre o della sensazione di febbre, presenti nei due terzi dei casi di RSV, sposterebbe la popolazione esaminata dalla definizione di caso verso la definizione di infezioni lievi.

Il rilevamento dell'RSV in questo studio si è basato unicamente sui tamponi nasofaringei, che rappresentano il "gold standard" e il tipo di campione con più alto rendimento per i virus respiratori [136]. Sebbene alcune ricerche [137] suggeriscano che l'aggiunta di campioni di espettorato e saliva aumenti significativamente il rilevamento dell'RSV nei pazienti ospedalizzati rispetto ai soli tamponi nasofaringei, l'utilizzo di questi tipi di campioni alternativi presenta maggiori difficoltà in ambienti medici comunitari rispetto ad un ambiente ospedaliero.

Il secondo risultato principale dello studio RESPIRA-50 conferma che l'RSV è responsabile di un onere misurabile negli adulti più anziani. Essendo uno studio prospettico, esso contribuisce alla letteratura esistente, poiché la maggior parte degli studi disponibili sono retrospettivi o basati su modelli già esistenti.

Il tasso complessivo di complicanze è stato del 30,7%, mentre il 9,3% degli adulti con RSV ha sviluppato polmonite e il tasso di ospedalizzazione per caso è stato del 2,7%. La ricerca disponibile sulle conseguenze dell'RSV acquisito in comunità negli adulti più anziani ha prodotto stime molto variabili. In un piccolo studio prospettico italiano (n = 152, di cui 33 positivi all'RSV) [138], il tasso complessivo di complicanze è stato del 21% e un paziente (3,0%) ha richiesto l'ospedalizzazione. Sebbene gli esiti gravi dell'RSV negli adulti siano innegabili, le stime di complicanze e ospedalizzazione sono in genere più alte negli studi retrospettivi rispetto a quelli prospettici, probabilmente perché le coorti retrospettive sono distorte verso casi più gravi.

In questo studio, sono stati prescritti antibiotici al 57% dei pazienti ambulatoriali positivi all'RSV, un valore molto vicino a una precedente stima italiana del 52% [138]. La letteratura disponibile, tuttavia, è altamente eterogenea e riporta tassi di prescrizione tra il 6% [139] e il 77% [140]. Sebbene la variabilità regionale nella prescrizione di antibiotici sia ben nota [141], le pratiche di prescrizione possono essere influenzate dalla disponibilità di diagnosi microbiologica per i prescrittori.

Il risultato della RT-PCR dei campioni arruolati in questo studio è stato condiviso con tutti i MMG. Tuttavia, c'è stato un intervallo di 1-3 giorni tra la raccolta del tampone e la diagnosi RT-PCR inviata ai MMG causando, per diversi adulti positivi all'RSV, la prescrizione di un antibiotico prima che i risultati del test fossero noti. Una soluzione per ridurre la prescrizione inappropriata di antibiotici potrebbe essere l'uso dei RADT (Test Diagnostici Rapidi), ma in questo studio quest'ultimo è risultato associato a un alto tasso di falsi negativi, funzionando relativamente bene solo per i tamponi con cariche virali elevate. Questo risultato è in linea con precedenti osservazioni [142] che indicano che la maggior parte degli adulti ha una carica di RSV relativamente bassa e di conseguenza i RADT sono di valore limitato. La sensibilità limitata dei RADT può essere aggirata dai kit *RT-PCR multiplex point-of-care* in grado di fornire risultati in 1 ora o meno, ma questi test sono molto più costosi e non ci sono prove convincenti della loro efficacia nel ridurre le prescrizioni di antibiotici [143]. Inoltre, anche i test RT-PCR prodotti dallo stesso produttore possono avere limiti di rilevamento diversi. Pertanto, quando si confrontano (o si combinano) i risultati degli studi di sorveglianza RSV, si dovrebbe prestare attenzione all'accuratezza diagnostica dei test utilizzati in tali studi.

Questo studio presenta, però, alcune importanti limitazioni: le dimensioni diverse dei cluster e la circolazione relativamente bassa dell'RSV hanno ridotto la potenza statistica. In secondo luogo, a causa di un numero relativamente piccolo di cluster di MMG [144], c'è stato un certo squilibrio di covarianza tra i pazienti nei gruppi ARI e ILI. In terzo luogo, la definizione di caso RSV-ARI proposta, derivata da un numero relativamente basso di casi di RSV, non è stata validata esternamente e non è chiaro se funzioni bene in individui di età < 50 anni o in contesti che non utilizzano specificamente i criteri ECDC ARI/ILI per la sorveglianza. Non sono state indagate le conseguenze a lungo termine e il relativo aumento dell'uso delle risorse sanitarie (ad esempio, derivanti dal deterioramento delle condizioni sottostanti), poiché il periodo di follow-up è stato limitato a 30 giorni. Infine, lo studio è stato condotto in un'area geografica limitata e durante stagioni caratterizzate da una circolazione di RSV da bassa a moderata. Rimane quindi poco chiaro se questi risultati siano generalizzabili ad altre realtà e a periodi ad alta incidenza. Tuttavia, la Liguria è un buon modello per studiare l'epidemiologia dei virus respiratori e l'efficacia delle misure preventive, in quanto è attualmente la regione europea "più anziana" con un'età media della popolazione di 52,3 anni [145].

5.2 Conclusioni

In conclusione, lo studio RESPIRA-50 ha mostrato come le definizioni di caso basate su una ARI riescano ad individuare più casi di RSV rispetto ai criteri basati su ILI, e di conseguenza quantificare meglio il vero impatto dell'RSV negli adulti over 50. Tra i criteri ILI storicamente sviluppati per la sorveglianza dell'influenza e basati prevalentemente sulla febbre, la definizione di caso ILI dell'ECDC è risultata associata alla minore sottostima dell'RSV perché la presenza o sensazione di febbre non è l'unico sintomo sistemico qualificante. Pur essendo altamente sensibili, le definizioni di caso ARI hanno una scarsa specificità, che può essere migliorata aggiungendo ulteriori sintomi ed elementi qualificanti.

La definizione di caso RSV-ARI proposta ha migliorato significativamente la specificità senza causare una pesante perdita di sensibilità, ma necessita di un'ulteriore valutazione.

L'indagine svolta sull'epidemiologia dell'RSV acquisito in comunità si aggiunge al corpo di evidenze già presenti in letteratura, confermando un sostanziale impatto clinico e socioeconomico dell'RSV nei soggetti adulti. I dati generati da questo studio potranno essere utili per ulteriori valutazioni in merito a nuove tecnologie sanitarie relative a diverse strategie preventive e terapeutiche per prevenire l'infezione da RSV.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Study on the 1990–2021 trend of global childhood respiratory infection and tuberculosis disease burden and related risk factors. *Frontiers in Public Health*. (2025). *Frontiers*
2. Global burden of lower respiratory infections attributable to secondhand smoke among children under 5 years of age, 2010–2019: a systematic analysis of the Global Burden of Disease Study 2019. *BMC Public Health*. (2023). *BioMed Central*
3. M.T. Madigan, J. M. Martinko, D. A. Stahl, D. P. Clark – BROCK, *Biologia dei microorganism – Vol 3 : Microbiologia Biomedica*. PERSON 2012
4. The microbiota in respiratory tract infections: from association to intervention. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. (2022) — review sul ruolo del microbiota nelle infezioni del tratto respiratorio. *PubMed*
5. The microbiome: an integral player in immune homeostasis and inflammation in the respiratory tract. Olaf Perdijk, Rossana Azzoni, Benjamin J. Marsland. *Physiological Reviews*. (2024). *Riviste di Fisiologia*
6. van Helden PD, Victor TC, Warren RM, van Helden EG. Isolation of DNA from *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods Mol Med*. 2001;54:19-30. doi: 10.1385/1-59259-147-7:019. PMID: 21341066.
7. Chung YS, Lam CY, Tan PH, Tsang HF, Wong SC. Comprehensive Review of COVID-19: Epidemiology, Pathogenesis, Advancement in Diagnostic and Detection Techniques, and Post-Pandemic Treatment Strategies. *Int J Mol Sci*. 2024 Jul 26;25(15):8155. doi: 10.3390/ijms25158155. PMID: 39125722; PMCID: PMC11312261.
8. Oh J, Lee M, Kim M, Kim HJ, Lee SW, Rhee SY, Koyanagi A, Smith L, Kim MS, Lee H, Lee J, Yon DK. Incident allergic diseases in post-COVID-19 condition: multinational cohort studies from South Korea, Japan and the UK. *Nat Commun*. 2024 Apr 2;15(1):2830. doi: 10.1038/s41467-024-47176-w. PMID: 38565542; PMCID: PMC10987608.
9. Microbiota and Immunity during Respiratory Infections: Lung and Gut Affair. Veronica Marrella, Federico Nicchiotti, Barbara Cassani. *International Journal of Molecular Sciences*. (2024). *MDPI*
10. Therapeutic Targeting of the Respiratory Microbiome. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. (2022). *ATS Journals*
11. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet*. (2009) (o anno vicino) — stima di incidenza globale da RSV. *ScienceDirect*
12. Associazione Italiana Ricerca contro il cancro – AIRC. <https://www.airc.it/>
13. The global burden of respiratory disease-impact on child health. [Journal] (autore/i, anno) — trattazione su malattie respiratorie acute e croniche, fattori di rischio ambientali. *PubMed*
14. Pediatric pneumonia across altitudes in Ecuador: a countrywide, epidemiological analysis from 2010-2021. *Italian Journal of Pediatrics*. (2025).

15. Istituto Superiore di Sanità. EpiCentro - L'epidemiologia per la sanità pubblica - <https://www.epicentro.iss.it/>
16. RespiVirNet - Sorveglianza integrata dei virus respiratori. Istituto Superiore di Sanità. <https://respivirnet.iss.it/>
17. Gupta, R., & Sikka, M. (2020). Viral Respiratory Infections. *Primary Care Respiratory Medicine*, 1-13. (Citazione in PMC: PMC7152106)
18. Couch, R. B. (2009). Respiratory infections: do we ever recover? *Proceedings of the American Thoracic Society*, 6(1), 16-20. (PMC2647650)
19. B. L. Tesini, "Influenza", Manuale MSD – Versione per i professionisti, aprile 2022.
20. Vaux, A., et al. (2024). Early-life pulmonary viral infection leads to long-term functional and lower airway structural changes in the lungs. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 326(3), L280-L291. (PMID: 38290164)
21. ISS – EpiCentro, "I virus influenzali e i loro mutamenti", 25/10/2018.
22. Boni, M. F., et al. (2021). Evolution of human respiratory virus epidemics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(34), e2105655118. (PMC8381341)
23. FLU, "The History of Influenza", settembre 2023
24. F. Centorrino, "Il virus dell'influenza", Microbiologia Italia, 03/03/2023.
25. MacLean, A. M., et al. (2021). Evolution of viruses and the emergence of SARS-CoV-2 variants. *ARPI Journal*. (Riferimento ad analisi evolutive di SARS-CoV-2)
26. Ministero della Salute, Italia. <https://www.salute.gov.it>
27. Zhu, H., et al. (2020). Early-Life Respiratory Syncytial Virus Infection, Trained Immunity and Subsequent Pulmonary Diseases. *Viruses*, 12(5), 505. (PMID: 32375305)
28. McLellan, J. S., Human Respiratory Syncytial Virus: An Introduction. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 2016.
29. Zifang Shang, Shuguang Tan, Dongli Ma "Respiratory syncytial virus: from pathogenesis to potential therapeutic strategies" *International Journal of Biological Sciences* 2021; 17(14): 4073-4091. doi: 10.7150/ijbs.64762
30. Kaler, J. et al., Respiratory Syncytial Virus: A Comprehensive Review of Transmission, Pathophysiology, and Manifestation. *Cureus*, 2023.
31. Borucki, E. et al., Introduction to Respiratory Syncytial Virus. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 2025.
32. Jain, M. et al., Respiratory Syncytial Virus. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 2021.
33. Lee, F. et al., Respiratory syncytial virus infections in adults: a narrative review. *The Lancet Respiratory Medicine*, 2024.
34. Calderaro, A. et al., Characteristics of Respiratory Syncytial Virus Infections in Children in the Post-COVID Seasons: A Northern Italy Hospital Experience. *Viruses*, 2024.
35. Mazzitelli, M. et al., Respiratory Syncytial Virus Infection: Treatments and Clinical Management. *Vaccines* (Basel), 2023.

36. D.; Martin, I.; AlFouzan, R.; Moraes, T.J. Prevention and Treatment Strategies for Respiratory Syncytial Virus (RSV). *Pathogens* 2023, 12, 154. <https://doi.org/10.3390/pathogens12020154>
37. Dosbaa A, Guilbaud R, Yusti AF, Ferré VM, Charpentier C, Descamps D, Le Hingrat Q, Coppée R. RSV-GenoScan: An automated pipeline for whole-genome human respiratory syncytial virus (RSV) sequence analysis. *J Virol Methods*. 2024 Jun;327:114938. doi: 10.1016/j.jviromet.2024.114938. Epub 2024 Apr 6. PMID: 38588779.
38. Alexandre Dosbaa, Romane Guilbaud, Anna-Maria Franco Yusti, Valentine Marie Ferré, Charlotte Charpentier, Diane Descamps, Quentin Le Hingrat, Romain Coppée, RSV-GenoScan: An automated pipeline for whole-genome human respiratory syncytial virus (RSV) sequence analysis, *Journal of Virological Methods*, Volume 327, 2024, 114938, ISSN 0166-0934, <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2024.114938>
39. Ke Z, Dillard RS, Chirkova T, Leon F, Stobart CC, Hampton CM, Strauss JD, Rajan D, Rostad CA, Taylor JV, Yi H, Shah R, Jin M, Hartert TV, Peebles RS, Jr., Graham BS, Moore ML, Anderson LJ and Wright ER. The Morphology and Assembly of Respiratory Syncytial Virus Revealed by Cryo-Electron Tomography. *Viruses*. 2018; 10(8).
40. Chatterjee S, Luthra P, Esaulova E, Agapov E, Yen BC, Borek DM, Edwards MR, Mittal A, Jordan DS, Ramanan P, Moore ML, Pappu RV, Holtzman MJ, Artyomov MN, Basler CF, Amarasinghe GK and Leung DW. Structural basis for human respiratory syncytial virus NS1-mediated modulation of host responses. *Nat Microbiol*. 2017; 2:17101.
41. Galloux M, Gabiane G, Sourimant J, Richard CA, England P, Moudjou M, Aumont-Nicaise M, Fix J, Rameix-Welti MA and Eléouët JF. Identification and characterization of the binding site of the respiratory syncytial virus phosphoprotein to RNA-free nucleoprotein. *J Virol*. 2015; 89(7):3484-3496.
42. Gan SW, Tan E, Lin X, Yu D, Wang J, Tan GM, Vararattanavech A, Yeo CY, Soon CH, Soong TW, Pervushin K and Torres J. The small hydrophobic protein of the human respiratory syncytial virus forms pentameric ion channels. *The Journal of biological chemistry*. 2012; 287(29):24671-24689.
43. Wertz GW, Collins PL, Huang Y, Gruber C, Levine S and Ball LA. Nucleotide sequence of the G protein gene of human respiratory syncytial virus reveals an unusual type of viral membrane protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985; 82(12):4075-4079.
44. Bukreyev A, Yang L and Collins PL. The secreted G protein of human respiratory syncytial virus antagonizes antibody-mediated restriction of replication involving macrophages and complement. *J Virol*. 2012; 86(19):10880-10884.
45. Roberts SR, Lichtenstein D, Ball LA and Wertz GW. The membrane-associated and secreted forms of the respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G are synthesized from alternative initiation codons. *J Virol*. 1994; 68(7):4538-4546.
46. Gorman JJ, Ferguson BL, Speelman D and Mills J. Determination of the disulfide bond arrangement of human respiratory syncytial virus attachment (G) protein by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Protein Sci*. 1997; 6(6):1308-1315.
47. Day ND, Branigan PJ, Liu C, Gutshall LL, Luo J, Melero JA, Sarisky RT and Del Vecchio AM. Contribution of cysteine residues in the extracellular domain of the F protein of human respiratory syncytial virus to its function. *Virol J*. 2006; 3:34.

48. , Zifang Shang, Shuguang Tan, Dongli Ma, “Respiratory syncytial virus: from pathogenesis to potential therapeutic strategies” – *IVYSPRING International Journal of Biological Sciences* 2021; 17(14): 4073-4091. doi: 10.7150/ijbs.64762
49. Cressey TN, Noton SL, Nagendra K, Braun MR and Fearn R. Mechanism for de novo initiation at two sites in the respiratory syncytial virus promoter. *Nucleic Acids Res.* 2018; 46(13):6785-6796.
50. Malhotra R, Ward M, Bright H, Priest R, Foster Martyn R, Hurle M, Blair E and Bird M. Isolation and characterisation of potential respiratory syncytial virus receptor(s) on epithelial cells. *Microbes Infect.* 2003; 5(2):123-133.
51. Molteni M, Gemma S and Rossetti C. The Role of Toll-Like Receptor 4 in Infectious and Noninfectious Inflammation. *Mediators Inflamm.* 2016; 2016:6978936
52. Behera AK, Matsuse H, Kumar M, Kong X, Lockey RF and Mohapatra SS. Blocking intercellular adhesion molecule-1 on human epithelial cells decreases respiratory syncytial virus infection. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 280(1):188-195.
53. Lingemann M, McCarty T, Liu X, Buchholz UJ, Surman S, Martin SE, Collins PL and Munir S. The alpha-1 subunit of the Na⁺,K⁺-ATPase (ATP1A1) is required for macropinocytic entry of respiratory syncytial virus (RSV) in human respiratory epithelial cells. *PLoS Pathog.* 2019; 15(8):e1007963.
54. Krzyzaniak MA, Zumstein MT, Gerez JA, Picotti P and Helenius A. Host cell entry of respiratory syncytial virus involves micropinocytosis followed by proteolytic activation of the F protein. *PLoS Pathog.* 2013; 9(4):e1003309.
55. Liu X, Wu S, Li M, et al. Respiratory syncytial virus: from pathogenesis to potential therapeutic strategies. *Int J Biol Sci.* 2021 Sep 27;17(14):4073-4091. (PMCID: PMC8495404)
56. Welliver RC. Detection, pathogenesis, and therapy of respiratory syncytial virus infections. *Clin Microbiol Rev.* 1988 Jan;1(1):27-39. doi: 10.1128/CMR.1.1.27. (PMID: 3060243)
57. Tripp RA. Pathogenesis of respiratory syncytial virus infection. *Viral Immunol.* 2004;17(2):165-81. doi: 10.1089/0882824041310513. (PMID: 15279697)
58. McNamara PS, Smyth RL. The pathogenesis of respiratory syncytial virus disease in childhood. *Br Med Bull.* 2002;61:13-28. doi: 10.1093/bmb/61.1.13. (PMID: 11997296)
59. Kalinowski A, Galen BT, Ueki IF, Sun Y, Mulenos A, Osafo-Addo A, Clark B, Joerns J, Liu W, Nadel JA, Dela Cruz CS and Koff JL. Respiratory syncytial virus activates epidermal growth factor receptor to suppress interferon regulatory factor 1-dependent interferon-lambda and antiviral defense in airway epithelium. *Mucosal Immunol.* 2018; 11(3):958-967.
60. Tripp RA. Pathogenesis of respiratory syncytial virus infection. *Viral Immunol.* 2004;17(2):165-81. doi: 10.1089/0882824041310513. (PMID: 15279697)
61. Carvajal JJ, Avellaneda C, Salazar-Ardiles C, et al. Host Components Contributing to Respiratory Syncytial Virus Pathogenesis. *Front Immunol.* 2019 Sep 12;10:2152. doi: 10.3389/fimmu.2019.02152. (PMID: 31572372)
62. Thornhill EM and Verhoeven D. Respiratory Syncytial Virus's Non-structural Proteins: Masters of Interference. *Frontiers in cellular and infection microbiology.* 2020; 10(225).

63. Goswami R, Majumdar T, Dhar J, Chattopadhyay S, Bandyopadhyay SK, Verbovetskaya V, Sen GC and Barik S. Viral degradasome hijacks mitochondria to suppress innate immunity. *Cell Res.* 2013; 23(8):1025-1042.
64. Munir S, Hillyer P, Le Nouën C, Buchholz UJ, Rabin RL, Collins PL and Bukreyev A. Respiratory Syncytial Virus Interferon Antagonist NS1 Protein Suppresses and Skews the Human T Lymphocyte Response. *PLoS Pathog.* 2011; 7(4):e1001336.
65. Wu YH, Lai AC, Chi PY, Thio CL, Chen WY, Tsai CH, Lee YL, Lukacs NW and Chang YJ. Pulmonary IL-33 orchestrates innate immune cells to mediate respiratory syncytial virus-evoked activity and eosinophilia. *Allergy.* 2020; 75(4):818-830.
66. Jones TL, Rovnaghi C, Bagga B, DeVincenzo JP and Cormier SA. Respiratory Syncytial Virus Disease Is Mediated by Age-Variable IL-33. *PLoS Pathog.* 2015; 11(10):e1005217.
67. Sande CJ, Njunge JM, Mwongeli Ngoi J, Mutunga MN, Chege T, Gicheru ET, Gardiner EM, Gwela A, Green CA, Drysdale SB, Berkley JA, Nokes DJ and Pollard AJ. Airway response to respiratory syncytial virus has incidental antibacterial effects. *Nat Commun.* 2019; 10(1):2218.
68. Tripp RA. Pathogenesis of respiratory syncytial virus infection. *Viral Immunol.* 2004;17(2):165-81. doi: 10.1089/0882824041310513. (PMID: 15279697)
69. Graham BS. Pathogenesis of respiratory syncytial virus vaccine-augmented pathology. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995 Oct;152(4 Pt 2):S63-6. doi: 10.1164/ajrcm/152.4_Pt_2.S63. (PMID: 7551416)
70. Openshaw PJ, Tregoning JS. Respiratory Syncytial Virus Infection: Immune Response, Immunopathogenesis, and Treatment. *J Infect Dis.* 2004 Oct 1;190(5):856-62. (PMCID: PMC88919)
71. van Erp EA, Lakerveld AJ, de Graaf E, Larsen MD, Schepp RM, Hipgrave Ederveen AL, Ahout IM, de Haan CA, Wuhler M, Luytjes W, Ferwerda G, Vidarsson G and van Kasteren PB. Natural killer cell activation by respiratory syncytial virus-specific antibodies is decreased in infants with severe respiratory infections and correlates with Fc-glycosylation. *Clin Transl Immunology.* 2020; 9(2):e1112.
72. de Steenhuijsen Piters WA, Heinonen S, Hasrat R, Bunsow E, Smith B, Suarez-Arrabal MC, Chaussabel D, Cohen DM, Sanders EA, Ramilo O, Bogaert D and Mejias A. Nasopharyngeal Microbiota, Host Transcriptome, and Disease Severity in Children with Respiratory Syncytial Virus Infection. *American journal of respiratory and critical care medicine.* 2016; 194(9):1104-1115.
73. Shi T, Gong H, Liu Y, et al. The Human Immune Response to Respiratory Syncytial Virus Infection. *Clin Microbiol Rev.* 2017 Apr;30(2):481-502. doi: 10.1128/CMR.00090-16. (PMID: 28179378)
74. Hislop, A.A.; Haworth, S.G. Airway size and structure in the normal fetal and infant lung and the effect of premature delivery and artificial ventilation. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1989, 140, 1717–1726. [CrossRef] [PubMed]
75. Aherne, W.; Bird, T.; Court, S.D.; Gardner, P.S.; McQuillin, J. Pathological changes in virus infections of the lower respiratory tract in children. *J. Clin. Pathol.* 1970, 23, 7–18. [CrossRef] [PubMed]

76. Pickles, R.J.; DeVincenzo, J.P. Respiratory syncytial virus (RSV) and its propensity for causing bronchiolitis. *J. Pathol.* 2015, 235, 266–276. [CrossRef] [PubMed]
77. Johnson, J.E.; Gonzales, R.A.; Olson, S.J.; Wright, P.F.; Graham, B.S. The histopathology of fatal untreated human respiratory syncytial virus infection. *Mod. Pathol.* 2007, 20, 108–119. [CrossRef] [PubMed]
78. Ventre, K.; Randolph, A.G. Ribavirin for respiratory syncytial virus infection of the lower respiratory tract in infants and young children. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2007, 1, CD000181. [CrossRef]
79. Hoover, J.; Eades, S.; Lam, W.M. Pediatric Antiviral Stewardship: Defining the Potential Role of Ribavirin in Respiratory Syncytial Virus-Associated Lower Respiratory Illness. *J. Pediatr. Pharmacol. Ther.* 2018, 23, 372–378. [CrossRef]
80. Shults, R.A.; Baron, S.; Decker, J.; Deitchman, S.D.; Connor, J.D. Health care worker exposure to aerosolized ribavirin: Biological and air monitoring. *J. Occup. Environ. Med.* 1996, 38, 257–263. [CrossRef]
81. Burrows, F.S.; Carlos, L.M.; Marriott, D.; Havryk, A.; Plit, M.; Glanville, A.R. Oral Ribavirin Is a Cost-Effective Alternative to Intravenous Ribavirin for Respiratory Syncytial Virus (RSV) Infection after Lung Transplantation (LTx). *J. Heart Lung Transplant.* 2013, 32, S109. [CrossRef]
82. Tejada, S.; Martinez-Reviejo, R.; Karakoc, H.N.; Pena-Lopez, Y.; Manuel, O.; Rello, J. Ribavirin for Treatment of Subjects with Respiratory Syncytial Virus-Related Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Adv. Ther.* 2022, 39, 4037–4051. [CrossRef]
83. Med., B.N.L. Identifier: NCT04225897. A Study in Infants With RSV LRTI to Evaluate RV521 (REVIRAL 1). 2020. Available online: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04225897> (accessed on 29 November 2022).
84. Med., B.N.L. Identifier: NCT04231968. A Study of AK0529 in Chinese Infants Hospitalized With RSV (AirFLO). 2020. Available online: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04231968> (accessed on 8 April 2022).
85. Alansari, K.; Toaimah, F.H.; Almatar, D.H.; El Tatawy, L.A.; Davidson, B.L.; Qusad, M.I.M. Monoclonal Antibody Treatment of RSV Bronchiolitis in Young Infants: A Randomized Trial. *Pediatrics* 2019, 143, e20182308. [CrossRef]
86. Ramilo, O.; Lagos, R.; Sáez-Llorens, X.; Suzich, J.; Wang, C.K.; Jensen, K.M.; Harris, B.S.; Losonsky, G.A.; Griffin, M.P.; Group, M.S. Motavizumab Treatment of Infants Hospitalized With Respiratory Syncytial Virus Infection Does Not Decrease Viral Load or Severity of Illness. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2014, 33, 703–709. [CrossRef]
87. Prince, G.A.; Hemming, V.G.; Horswood, R.L.; Chanock, R.M. Immunoprophylaxis and immunotherapy of respiratory syncytial virus infection in the cotton rat. *Virus Res.* 1985, 3, 193–206. [CrossRef]
88. Domachowske, J.B.; Anderson, E.J.; Goldstein, M. The Future of Respiratory Syncytial Virus Disease Prevention and Treatment.
89. Larkin, E.K.; Hartert, T.V. Genes associated with RSV lower respiratory tract infection and asthma: The application of genetic epidemiological methods to understand causality. *Future Virol.* 2015, 10, 883–897. [CrossRef] [PubMed]

90. Shilovskiy, I.P.; Yumashev, K.V.; Nikolsky, A.A.; Vishnyakova, L.I.; Khaitov, M.R. Molecular and Cellular Mechanisms of Respiratory Syncytial Viral Infection: Using Murine Models to Understand Human Pathology. *Biochemistry* 2021, 86, 290–306. [CrossRef] *Infect. Dis. Ther.* 2021, 10, 47–60. [CrossRef] [PubMed]
91. Linssen, R.S.N.; Ma, J.; Bem, R.A.; Rubin, B.K. Rational use of mucoactive medications to treat pediatric airway disease. *Paediatr. Respir. Rev.* 2020, 36, 8–14. [CrossRef]
92. Gadowski, A.M.; Scribani, M.B. Bronchodilators for bronchiolitis. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2014, 6, CD001266. [CrossRef]
93. Krilov, L.R. Respiratory syncytial virus disease: Update on treatment and prevention. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2011, 9, 27–32. [CrossRef]
94. Merkus, P.J.; de Hoog, M.; van Gent, R.; de Jongste, J.C. DNase treatment for atelectasis in infants with severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Eur. Respir. J.* 2001, 18, 734–737. [CrossRef]
95. Nasr, S.Z.; Strouse, P.J.; Soskolne, E.; Maxvold, N.J.; Garver, K.A.; Rubin, B.K.; Moler, F.W. Efficacy of recombinant human deoxyribonuclease I in the hospital management of respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Chest* 2001, 120, 203–208. [CrossRef]
96. Sathe, N.A.; Krishnaswami, S.; Andrews, J.; Ficzer, C.; McPheeters, M.L. Pharmacologic Agents That Promote Airway Clearance in Hospitalized Subjects: A Systematic Review. *Respir. Care* 2015, 60, 1061–1070. [CrossRef]
97. Rodriguez-Martinez, C.E.; Nino, G.; Castro-Rodriguez, J.A.; Acuna-Cordero, R.; Sossa-Briceno, M.P.; Midulla, F. For which infants with viral bronchiolitis could it be deemed appropriate to use albuterol, at least on a therapeutic trial basis? *Allergol. Immunopathol.* 2021, 49, 153–158. [CrossRef] [PubMed]
98. Bont, L.; Versteegh, J.; Swelsen, W.T.; Heijnen, C.J.; Kavelaars, A.; Brus, F.; Draaisma, J.M.; Pekelharing-Berghuis, M.; van Diemen-Steenvoorde, R.A.; Kimpen, J.L. Natural reinfection with respiratory syncytial virus does not boost virus-specific T-cell immunity. *Pediatr. Res.* 2002, 52, 363–367. [CrossRef]
99. Chanock, R.; Roizman, B.; Myers, R. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolation, properties and characterization. *Am. J. Hyg.* 1957, 66, 281–290. [CrossRef]
100. Kim, H.W.; Canchola, J.G.; Brandt, C.D.; Pyles, G.; Chanock, R.M.; Jensen, K.; Parrott, R.H. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *Am. J. Epidemiol.* 1969, 89, 422–434. [CrossRef]
101. Mazur, N.I.; Terstappen, J.; Baral, R.; Bardaji, A.; Beutels, P.; Buchholz, U.J.; Cohen, C.; Crowe, J.E., Jr.; Cutland, C.L.; Eckert, L.; et al. Respiratory syncytial virus prevention within reach: The vaccine and monoclonal antibody landscape. *Lancet Infect. Dis.* 2022, 23, e2–S21. [CrossRef] [PubMed]
102. Mufson, M.A.; Orvell, C.; Rafnar, B.; Norrby, E. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* 1985, 66 (Pt 10), 2111–2124. [CrossRef]
103. Krarup, A.; Truan, D.; Furmanova-Hollenstein, P.; Bogaert, L.; Bouchier, P.; Bisschop, I.J.M.; Widjoatmodjo, M.N.; Zahn, R.; Schuitemaker, H.; McLellan, J.S.; et al. A highly stable prefusion RSV F vaccine derived from structural analysis of the fusion mechanism. *Nat. Commun.* 2015, 6, 8143. [CrossRef]

104. Beyfortus, INN-nirsevimab, AIFA – Agenzia Italiana del Farmaco. <https://api.aifa.gov.it>
105. CIRI-IT Centro Interuniversitario Ricerca Influenza, UNIGE (Università degli Studi di Genova), DISSAL. “Approvati due vaccini contro RSV – 2023”
106. Synagis, INN-palivizumab, AIFA – Agenzia Italiana del Farmaco. <https://api.aifa.gov.it>
107. Rapporto “Horizon scanning” AIFA 2025, AIFA – Agenzia Italiana del Farmaco. <https://api.aifa.gov.it>
108. Arexvy, INN-Respiratory Syncytial Virus (RSV) vaccine, AIFA – Agenzia Italiana del Farmaco. <https://api.aifa.gov.it>
109. Abrysvo, INN-respiratory syncytial virus vaccine (bivalent), AIFA – Agenzia Italiana del Farmaco. <https://api.aifa.gov.it>
110. mRESVIA, INN-Respiratory Syncytial Virus mRNA vaccine, AIFA – Agenzia Italiana del Farmaco. <https://api.aifa.gov.it>
111. ECDC. Infezioni respiratorie invernali, il rapporto dell'ECDC.
112. ECDC/Aogoi. Infezioni respiratorie. Ecdc: in quasi tutti i Paesi forti aumenti influenza e virus respiratorio sinciziale.
113. CIDRAP - Meta-analisi, "New data show hefty primary care RSV burden in young kids, older adults", 27 ottobre 2025
114. PATH, The Global Respiratory Syncytial Virus Burden (Basato su Shi et al. 2017), 2015
115. Li et al., "Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in children younger than 5 years in 2019: a systematic analysis", 28 maggio 2022
116. Khadadah et al., The disease burden of respiratory syncytial virus in older adults, 10 gennaio 2024, <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10911257/>
117. World Health Organization (WHO), Respiratory syncytial virus (RSV), 25 marzo 2025, [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/respiratory-syncytial-virus-\(rsv\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/respiratory-syncytial-virus-(rsv))
118. University Medical Center Utrecht. Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in children younger than 5 years in 2019: a systematic analysis.
119. ISS/epicentro. RespiVirNet - Sistema di Sorveglianza Integrata (epidemiologica e virologica).
120. ISS/RespiVirNet. Rapporto influnet - RespiVirNet.
121. ISS/epicentro. La sorveglianza integrata dei virus respiratori RespiVirNet in Italia: i risultati della stagione 2023-2024. Boll Epidemiol Naz 2024;5(4):19-27. DOI: 10.53225/BEN_098.
122. PubMed Central. Respiratory Syncytial Virus (RSV) in an Italian Pediatric Cohort: Genomic Analysis and Circulation Pattern in the Season 2022–2023. (pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC12548520/).

123. ISS/epicentro. La sorveglianza integrata dei virus respiratori RespiVirNet in Italia: i risultati della stagione 2023-2024.
124. Rozenbaum MH, Begier E, Kurosky SK, Whelan J, Bem D, Pouwels KB, et al. Incidence of respiratory syncytial virus infection in older adults: limitations of current data. *Infect Dis Ther.* 2023;12(6):1487–504. 4.
125. Kenmoe S, Nair H. The disease burden of respiratory syncytial virus in older adults. *Curr Opin Infect Dis.* 2024;37(2):129–36. 5.
126. Domnich A, Calabrò GE. Epidemiology and burden of respiratory syncytial virus in Italian adults: a systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE.* 2024;19(3):e0297608
127. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). European respiratory virus surveillance summary. Available from: <https://erviss.org/>. Accessed 22 Apr 2025.
128. Korsten K, Adriaenssens N, Coenen S, Butler CC, Verheij TJM, Bont LJ, et al. World Health Organization influenza-like illness underestimates the burden of respiratory syncytial virus infection in community-dwelling older adults. *J Infect Dis.* 2022;226(Suppl 1): S71–8.
129. World Health Organization and the European Centre for Disease Prevention and Control. Operational considerations for respiratory virus surveillance in Europe; 2022.
130. Zlateva KT, Lemey P, Vandamme AM, Van Ranst M. Molecular evolution and circulation patterns of human respiratory syncytial virus subgroup a: positively selected sites in the attachment glycoprotein. *J Virol.* 2004;78(9):4675–83.
131. Zlateva KT, Lemey P, Moës E, Vandamme AM, Van Ranst M. Genetic variability and molecular evolution of the human respiratory syncytial virus subgroup B attachment G protein. *J Virol.* 2005;79(14):9157–67.
132. World Health Organization (WHO). RSV surveillance case definitions. Available from: <https://www.who.int/teams/global-influenza-programme/global-respiratory-syncytial-virus-surveillance/case-definitions>.
133. Lauer SA, Kleinman KP, Reich NG. The effect of cluster size variability on statistical power in cluster-randomized trials. *PLoS ONE.* 2015;10(4):e0119074.
134. Souty C, Turbelin C, Blanchon T, Hanslik T, Le Strat Y, Boëlle PY. Improving disease incidence estimates in primary care surveillance systems. *Popul Health Metr.* 2014;12:19.
135. Curran D, Matthews S, Cabrera ES, Pérez SN, Bрева LP, Rämets M, et al. The respiratory syncytial virus prefusion F protein vaccine attenuates the severity of respiratory syncytial virus-associated disease in breakthrough infections in adults ≥ 60 years of age. *Influenza Other Respir Viruses.* 2024;18(2):e13236.
136. Lee RA, Herigon JC, Benedetti A, Pollock NR, Denkinger CM. Performance of saliva, oropharyngeal swabs, and nasal swabs for SARS-CoV-2 molecular detection: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol.* 2021;59(5):e02881–e2920.
137. Ramirez J, Carrico R, Wilde A, Junkins A, Furmanek S, Chandler T, et al. Diagnosis of respiratory syncytial virus in adults substantially increases when adding sputum, saliva, and serology testing to nasopharyngeal swab RT-PCR. *Infect Dis Ther.* 2023;12(6):1593–603.

138. Bracaloni S, Esposito E, Scarpaci M, Cosci T, Casini B, Chiovelli F, et al. RSV disease burden in older adults: an Italian multiregion pilot study of acute respiratory infections in primary care setting, winter season 2022–2023. *Influenza Other Respir Viruses*. 2024;18(12): e70049.
139. Korsten K, Adriaenssens N, Coenen S, Butler C, Ravanfar B, Rutter H, et al. Burden of respiratory syncytial virus infection in community-dwelling older adults in Europe (RESCEU): an international prospective cohort study. *Eur Respir J*. 2021;57(4):2002688.
140. Belongia EA, King JP, Kieke BA, Pluta J, Al-Hilli A, Meece JK, et al. Clinical features, severity, and incidence of RSV illness during 12 consecutive seasons in a community cohort of adults ≥ 60 years old *Open Forum Infect Dis*. 2018;5(12):ofy316.
141. Mölsted S, Lundborg CS, Karlsson AK, Cars O. Antibiotic prescription rates vary markedly between 13 European countries. *Scand J Infect Dis*. 2002;34(5):366–71.
142. Nuwer R. Better awareness of RSV in older adults is needed to fight a growing burden. *Nature*. 2023;621(7980):S58–9.
143. Domnich A, Massaro E, Icardi G, Orsi A. Multiplex molecular assays for the laboratory-based and point-of-care diagnosis of infections caused by seasonal influenza, COVID-19, and RSV. *Expert Rev Mol Diagn*. 2024;24(11):997–1008.
144. Moerbeek M, van Schie S. How large are the consequences of covariate imbalance in cluster randomized trials: a simulation study with a continuous outcome and a binary covariate at the cluster level. *BMC Med Res Methodol*. 2016;16:79.
145. Eurostat. Population structure indicators by NUTS 2 region. Population structure indicators by NUTS 2 region.