

Rassegna

Review

L'impatto dei recenti progressi delle tecniche molecolari nella diagnosi delle infezioni delle basse vie respiratorie (LRTI)

Impact of recent advances in molecular techniques on diagnosing lower respiratory tract infections (LRTIs)

Alessandro Camporese*

S.O.C. di Microbiologia e Virologia, A.O. S. Maria degli Angeli, Pordenone, Italy

INTRODUZIONE

Le infezioni dell'apparato respiratorio rappresentano un rilevante problema clinico e di sanità pubblica in tutto il mondo [1].

Se le patologie delle vie aeree superiori sono molto frequenti, ma solo raramente vanno incontro a complicanze cliniche che possono rappresentare un rischio per il paziente, le infezioni delle basse vie respiratorie (LRTI, *Low Respiratory Tract Infections*), nelle loro diverse espressioni cliniche ed epidemiologiche, oltre a costituire tra le più frequenti cause di infezione nell'adulto e nel bambino, sono tutt'oggi un rilevante problema sotto il profilo clinico e terapeutico in ambito comunitario e ospedaliero, e sono causa di un importante numero di serie complicanze [2-4].

La popolazione maggiormente a rischio di sviluppare un'infezione fatale delle basse vie respiratorie è rappresentata dai pazienti in età pediatrica, dagli immunocompromessi e dagli anziani [5].

Le specie di microrganismi che possono causare una patologia infettiva delle basse vie aeree sono particolarmente numerose, rendendo particolarmente difficile l'inquadramento eziologico e l'impostazione di una terapia empirica che sia in grado di risultare rapidamente efficace, in attesa di un riscontro microbiologico, quando disponibile [6].

Tra l'altro, a fianco dei patogeni tradizionalmente conosciuti, negli ultimi anni se ne sono aggiunti altri, sia batterici che virali, misconosciuti fino al recente passato, e per i quali spesso non sono disponibili tecniche diagnostiche basate sull'esame colturale e/o sierologico, o la cui rilevazione secondo metodiche standard non consente di confermarne la presenza, se non in termini di tempi molto lunghi, rendendo così inefficace l'approccio clinico e terapeutico mirato, basato sull'evidenza dell'agente eziologico.

Se, dunque, la diagnosi clinica di infezione a carico delle basse vie respiratorie può essere relativamente agevole, la diagnosi eziologica può in realtà rivelarsi molto più difficile, a causa dei consistenti limiti della diagnostica microbiologica tradizionale [2]. Più del 50% dei casi di infezione rimane ancora oggi privo di una precisa diagnosi eziologica, dato che in ambito comunitario essa difficilmente si concretizza, mentre anche in ambiente nosocomiale si riscontra solo nel 25-50% dei casi [6].

In effetti, purtroppo ancora oggi, se nei laboratori di microbiologia si può generalmente considerare acquisito un generale, discreto livello di accuratezza e qualità analitica, non altrettanto si può dire per quanto concerne l'efficienza delle procedure diagnostiche e l'efficacia clinica del risultato: per questi aspetti, infatti, c'è ancora molto da lavorare nel nostro Paese, in quanto spesso le procedure analitiche sono ancora affidate a principi ormai superati in questo particolare contesto clinico (coltura, microscopia, sierologia), mentre gli elementi di efficienza sono spesso ancorati all'epoca di Pasteur, con tempi di risposta che talora, anziché risultare

*Corresponding author

Alessandro Camporese

E-mail: alessandro.camporese@aopn.fvg.it

decisionali per la gestione clinica e terapeutica del paziente, finiscono per configurarsi come un ormai inutile corollario anamnestico [7, 8].

Quando, dopo gli anni '60, i clinici abbracciarono la via della così detta "terapia empirica", che tanti danni ha arrecato negli ultimi decenni in termini di scelte terapeutiche spesso criticabili, oltre ad aver contribuito in modo consistente all'aumento di consumo di farmaci e all'emergere di sempre più complessi meccanismi di resistenza, in buona parte lo fecero per la mancanza di un significativo apporto della diagnosi microbiologica [7].

Non sarà un caso se in Europa fino al 95% del consumo di antibiotici avviene in ambito comunitario, e nel contesto della patologia infettiva delle basse vie aeree, a fronte di una eziologia prevalentemente di tipo virale [1].

■ NUOVI SCENARI DIAGNOSTICI NELLE LRTI

Con la consapevolezza che esiste una sostanziale carenza di una diagnostica microbiologica efficace nell'individuare gli agenti eziologici di LRTI, ed efficiente nei tempi di risposta, contestuale a un consumo e una spesa per antimicrobici ormai considerata insostenibile, nel 2007 si è costituito in Europa un gruppo di lavoro, individuato dall'acronimo GRACE (*Genomics to combat Resistant against Antibiotics in Community acquired LRTI in Europe*).

Il gruppo di lavoro, il cui sito è consultabile alla pagina <https://www.grace-lrti.org/>, si è posto lo scopo, tra gli altri, di individuare un razionale per l'utilizzo della diagnostica molecolare nelle infezioni delle basse vie respiratorie, con una particolare attenzione rivolta verso la diagnosi delle infezioni respiratorie comunitarie (CA-LRTI, *Community Acquired-Low Respiratory Tract Infections*) [9].

Lo scopo è stato quello di arruolare per la prima volta un elevato numero di pazienti, con l'ausilio di un gruppo di centri specialistici distribuiti in diversi paesi europei, per studiare l'eziologia microbica attraverso i microrganismi isolati, applicando diagnostiche analitiche molecolari standard per tutti i partecipanti, cercando così di individuare i metodi migliori per raggiungere l'obiettivo di una maggiore efficacia nella diagnosi di LRTI in comunità, laddove allo stato attuale esiste uno sfruttamento non ottimale delle risorse diagnostiche disponibili. Il gruppo ha arruolato quasi 7.000 pazienti, una quota mai raggiunta da nessun altro studio analogo, e

sta elaborando i risultati clinici, eziologici e analitici prodotti.

Le motivazioni che hanno spinto a sviluppare questo percorso sono l'espressione più tangibile dell'esigenza di giungere al più presto alla definizione di linee guida condivise, che consentano di intervenire in modo mirato sulla terapia delle LRTI, attraverso un utilizzo più esteso delle biotecnologie, che già oggi consentono di rispondere in modo efficace alla richiesta di ottenere in poche ore una risposta che inquadri la patologia dal punto di vista eziologico. Così facendo, sarà possibile intervenire da un punto di vista terapeutico in modo più mirato, e perciò più efficace, non solo sotto il profilo clinico, ma anche economico, in quanto si potrebbero investire sul fronte di una diagnostica più efficiente le risorse oggi destinate a terapie empiriche spesso ridondanti o inadeguate al quadro clinico ed eziologico [10].

Oggi la maggior parte della diagnostica infettivologica, culturale e sierologica, utilizzata in corso di LRTI è infatti spesso inadeguata in termini di sensibilità ed efficienza, con una ridotta *performance* nel rilevare in termini di tempo accettabili la maggior parte dei microrganismi coinvolti da un punto di vista eziologico [11, 12]. Viceversa, avere a disposizione in tempo reale l'eziologia di un'infezione delle basse vie respiratorie, soprattutto quando essa si manifesta in contesti di criticità, come ad esempio in terapia intensiva, in un soggetto immunocompromesso, o in età pediatrica, sarebbe il presupposto essenziale per un miglioramento sostanziale dell'approccio clinico e terapeutico [12].

In caso di evidenza di eziologia virale, anziché batterica, si permetterebbe altresì uno *shift* verso appropriati presidi antivirali, laddove richiesti, nel mentre consentirebbe di isolare rapidamente per coorte i pazienti ad elevato rischio di trasmissione di microrganismi ad elevata diffusibilità; permetterebbe, dunque, di incidere su un migliore approccio terapeutico e su una migliore gestione del paziente, incidendo sui tempi di degenza e sui costi generali [10].

L'estensione dello spettro diagnostico, possibile attraverso lo sfruttamento di nuovi e più efficaci presidi analitici microbiologici, consentirebbe anche di conoscere più compiutamente l'eziologia locale e la sua stagionalità, beneficiandone così anche l'eventuale approccio empirico, quando e se necessario. Nella Figura 1 è riportata, ad esempio, l'eziologia virale nella nostra realtà (riferita al 2011), la cui elaborazione si è resa possibile con l'adozione dal 2009 della dia-

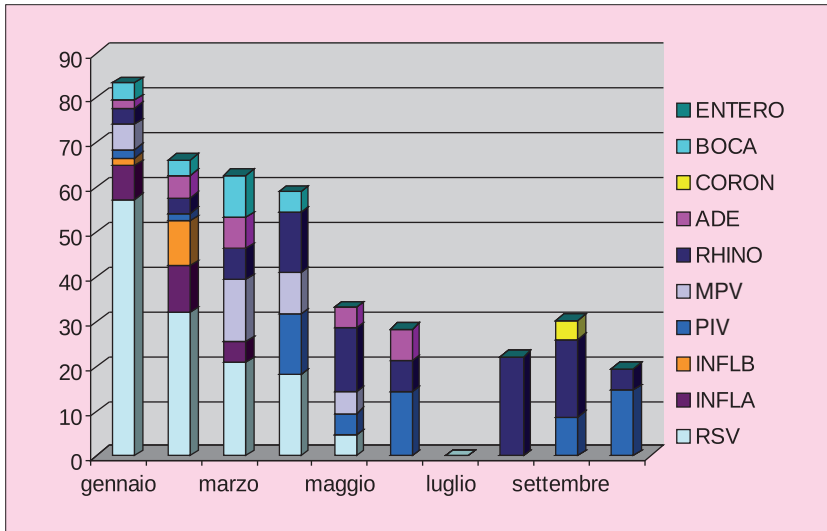


Figura 1 - Epidemiologia, suddivisa per stagionalità, di alcuni tra i principali virus respiratori riscontrati in adulti e bambini nella realtà geografica della Provincia di Pordenone durante il 2011. ENTERO: Enterovirus; BOCA: Bocavirus; CORON: Coronavirus; ADE: Adenovirus; RHINO: Rhinovirus; MPV: Metapneumovirus; PIV: Parainfluenza; INFLB: Influenza B; INFLA: Influenza A; RSV: Virus Respiratorio Sinciziale.

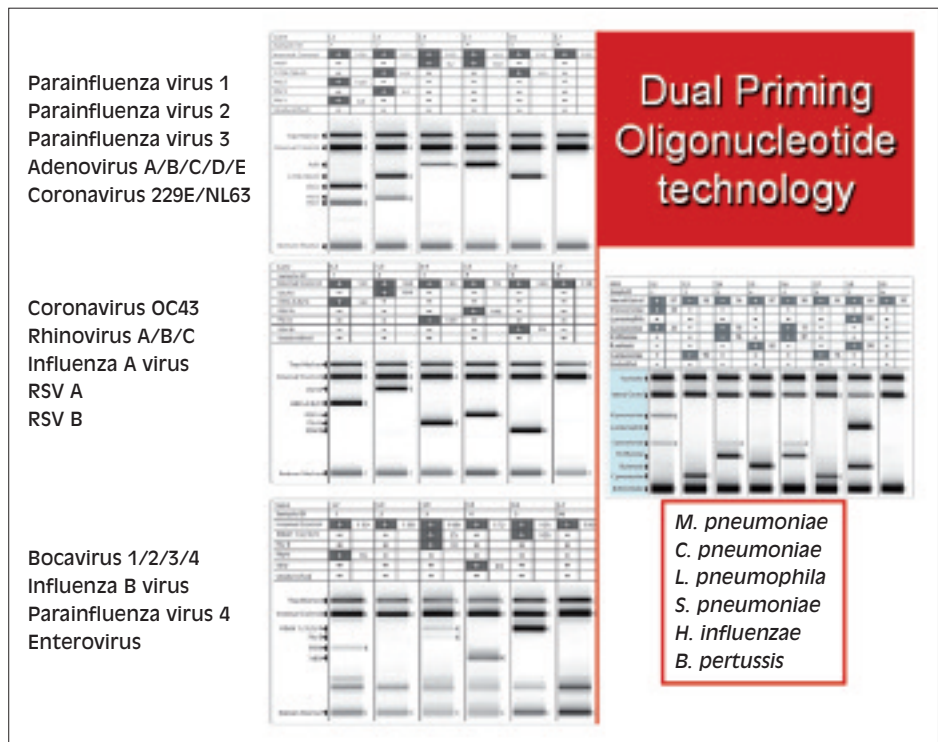
gnostica molecolare per la ricerca di virus respiratori.

Per rispondere ai primi tre obiettivi citati, ovvero una terapia mirata garantita in tempo reale, *shift* in ottica antivirale, se necessario, e isolamento dei pazienti, è dunque imprescindibile disporre di una diagnostica rapida, disponibile al massimo nell'arco di una giornata.

Questo requisito è oggi già disponibile, in

quanto se i metodi di prima generazione non sono in grado di offrire risposte con rapidità, oggi i laboratori di microbiologia molecolare dispongono di tecnologie automatizzate - dalla fase di estrazione degli acidi nucleici alla fase di rilevazione - e di *kit* diagnostici in grado di ottenere in poche ore, in un'unica seduta analitica, o al massimo in due *step* successivi, uno *screening* completo di tutti i principali patogeni

Figura 2 - Esempio di screening molecolare multiplex completo di tutti i principali patogeni respiratori, sia batterici che virali.



respiratori, sia batterici che virali (Figura 2) a un costo assolutamente competitivo, se rapportato all'*outcome* clinico.

■ LRTI: PROSPETTIVE PER UN NUOVO APPROCCIO DIAGNOSTICO E GESTIONALE

Chiaramente questo nuovo modo di fare diagnosi comporta una radicale revisione dell'organizzazione dei laboratori, e della cultura stessa del microbiologo, che parte da una profonda rivisitazione dell'appropriatezza dei profili analitici e dall'eliminazione di test inutili e/o ridondanti, quali ad esempio quelli sierologici, che in questo contesto diventano assolutamente inappropriati, per non parlare dei test colturali, che nel campo virologico non possono che lasciare spazio totalmente alla diagnostica molecolare, mentre da un punto di vista batteriologico l'esame colturale mantiene ancora un ruolo solo in relazione alla necessità di fruire dei profili di sensibilità di eventuali patogeni isolati.

Se da un punto di vista strettamente analitico, economico e organizzativo la diagnostica molecolare comporta una completa revisione gestionale dei laboratori di microbiologia, per garantire la continuità analitica è necessario intervenire anche sull'aspetto gestionale delle risorse umane, con una totale revisione dei profili formativi, e un ampio spazio dedicato all'acquisizione da parte di tutto il personale dei nuovi metodi analitici molecolari a disposizione.

Con queste premesse, è chiaro che il pieno sfruttamento delle nuove tecnologie, che in prospettiva promettono un ulteriore salto di qualità in termini di sensibilità, economia e rapidità di esecuzione, potrà avvenire solo quando sarà possibile garantire un accesso h24 ai test, per rispondere in questo e in altri ambiti in termini di urgenza/emergenza, configurando così la necessità di investire su laboratori di microbiologia a risposta rapida [7, 8].

Già oggi sono disponibili test che si configurano come veri e propri *point of care* microbiologici, anche nell'ambito della diagnostica respiratoria, che consentono in poco più di un'ora di identificare specifici *target* microbici, consentendo così di intervenire rapidamente sul trattamento più idoneo e sull'eventuale isolamento del paziente, come nel caso dell'influenza A, H1N1.

Inoltre, dato che la maggior parte della diagnostica respiratoria, in particolare quella volta a ricercare agenti virali, può essere eseguita su

campioni che non richiedono una pratica invasiva, quale ad esempio il tampone naso-faringeo, si apre la strada a un utilizzo assolutamente semplice e pienamente sfruttabile della diagnostica molecolare in qualsiasi contesto clinico, non necessariamente ad elevata specializzazione [12, 13].

■ LINEE GUIDA DI DIAGNOSTICA MOLECOLARE NELLE LRTI

In Italia non si dispone di linee guida di diagnostica microbiologica delle LRTI, se si escludono esempi ormai superati, in quanto non aggiornati in merito all'utilizzo ragionato dei test molecolari [14].

È, però, possibile attingere ad altre recenti fonti europee, ad esempio le recenti linee guida dell'*European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, e ad altri autorevoli documenti, il più esaustivo dei quali è forse quello edito dalla *Health Protection Agency* (HPA), reperibile *online*, che offre schematici orientamenti per quanto concerne le LRTI nel paziente immunocompetente e immunocompromesso [15, 16].

In quest'ultimo documento, frutto della continua revisione da parte di autorevoli esponenti della microbiologia europea, stante la rapida evoluzione della diagnostica molecolare in questo ambito clinico, è possibile rilevare già tutta una serie di possibili ulteriori revisioni, che ci sentiamo di suggerire in questo ambito, presentando due specifiche *flow-charts*, rivisitate alla luce dei più recenti test disponibili (Figure 3 e 4). La struttura delle linee guida dell'HPA, alle quali si rimanda, prevede, oltre a una linea di indirizzo per la diagnosi di polmonite grave nel paziente immunocompromesso, anche un approccio diagnostico diversificato al paziente immunocompetente, distinguendo tra la gestione analitica in caso di sospetto di polmonite di grado clinico lieve, a sua volta ospedalizzata o meno per comorbidità, e la gestione della polmonite grave.

Mentre nel paziente immunocompetente, in caso di polmonite di grado lieve, ospedalizzata o meno, giustamente non si ritiene di investire su diagnostiche che vadano oltre l'emocoltura e l'esame microscopico e colturale dell'espettorato, nel caso di polmonite grave viene proposta una serie di interventi per migliorare l'efficacia terapeutica mediante l'utilizzo di metodi molecolari. L'approccio è, poi, più votato a un più ampio utilizzo del laboratorio, anche molecola-

re, nel caso di polmonite di vario grado clinico insorta in un paziente immunocompromesso.

Alla luce delle evoluzioni diagnostiche intervenute di recente, abbiamo ritenuto di rivedere i diversi approcci proposti dall'HPA, che ci sono sembrati comunque una traccia assolutamente appropriata per definire dei profili analitici votati alla diagnosi di laboratorio delle LRTI, dando spazio però a una maggiore valorizzazione delle indagini molecolari.

La Figura 3 propone una schematica revisione critica di quanto proposto da HPA per quanto concerne la diagnosi di polmonite grave nel paziente immunocompetente.

Come è evidente, la *flow-chart* proposta prevede l'utilizzo dei metodi tradizionali (esame microscopico e/o colturale) ormai solo in pochi contesti. Tali metodi comprendono l'emocoltura, assolutamente d'obbligo in questa tipologia di pazienti, insieme all'analisi microscopica e colturale di campioni respiratori più o meno rappresentativi della situazione clinica in atto.

La nostra proposta, considerati i tempi richiesti per ottenere una risposta dall'esame colturale, è un approccio terapeutico al paziente critico affetto da polmonite grave che si avvalga del risultato ottenibile mediante l'utilizzo di metodi molecolari che, viceversa, in poche ore permettono di definire con la massima sensibilità l'eziologia dell'infezione.

Al tempo stesso, è così possibile l'esclusione di altri patogeni, con un elevatissimo valore predittivo negativo, o la rilevazione dell'agente eziologico, e l'eventuale concomitanza di più agenti eziologici, anche qualora fosse già stata intrapresa una terapia antibiotica, come spesso accade in pazienti che provengono dalla comunità, o che vengono trasferiti da altri reparti o da RSA (Residenza Sanitaria Assistenziale) e case di riposo.

Vale la pena rilevare, come riassunto nelle Figure 3 e 4, che le tecniche molecolari *multiplex* permettono anche di lavorare su diverse tipologie di materiali biologici, rilevando un ampio

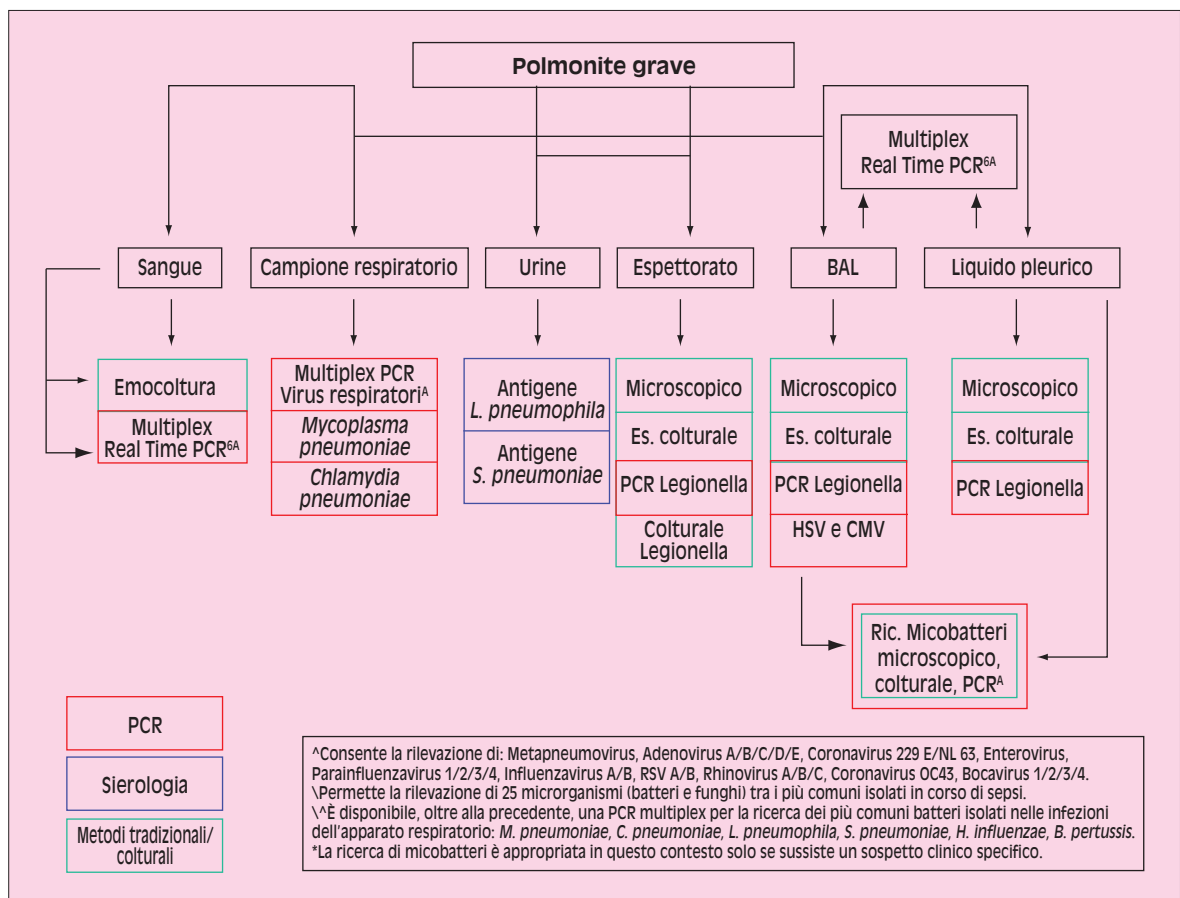


Figura 3 - Proposta di utilizzo delle diverse diagnostiche disponibili nella polmonite grave del paziente immunocompetente.

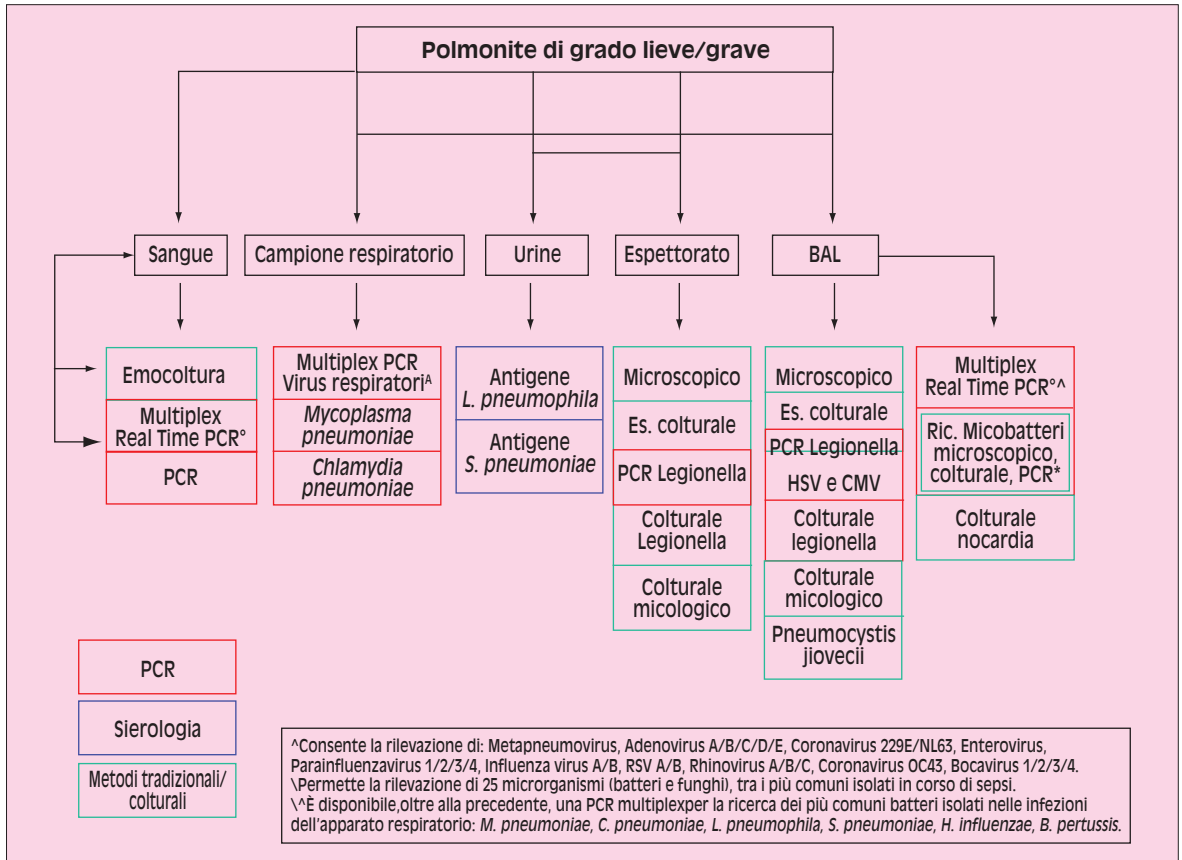


Figura 4 - Proposta di utilizzo delle diverse diagnostiche disponibili nella polmonite di grado lieve e grave del paziente immunocompromesso.

spettro di virus e di batteri responsabili delle malattie respiratorie più comuni. Inoltre, alcune tecniche tradizionalmente utilizzate su sangue intero, ad esempio *Septifast* (Roche Diagnostics), consentono di ottenere ottimi risultati anche su liquido pleurico e su BAL, ampliando così ulteriormente lo spettro di rilevazione a un numero elevato di batteri e funghi, compreso *Aspergillus fumigatus*. In questo modo è possibile in tempi ridottissimi prevedere di indirizzare la terapia antimicrobica in modo più mirato, in attesa che l'esame colturale, se positivo, consenta di ottenere un test di sensibilità mediante il quale confermare o meno la scelta terapeutica instaurata.

La diagnostica molecolare consente, inoltre, di individuare in poche ore un notevole numero di virus con elevato tropismo per l'apparato respiratorio, come elencato nelle Figure 3 e 4, che se identificati in poche ore possono modificare l'approccio terapeutico in modo sostanziale, rispetto al sospetto di infezione batterica.

Infine, l'approccio molecolare permette di rile-

vare più spesso che nel passato, e in poche ore, la presenza di coinfezioni che, in mancanza di una diagnostica sensibile, rischiano talora di rimanere misconosciute, aggravando così la situazione clinica del paziente e influenzando negativamente sull'*outcome* terapeutico. È noto, infatti, che la presenza di microrganismi altrimenti considerati colonizzanti nell'ospite immunocompetente, quale ad esempio *Pneumocystis jirovecii*, nel paziente già affetto da patologie concomitanti dell'apparato respiratorio, quali bronchite cronica o enfisema polmonare, possono costituire un importante fattore di rischio per l'aggravamento di un evento infettivo a carico delle basse vie respiratorie [17].

Tali indagini, non inserite nello schema della Figura 3, possono però rivelarsi importanti in questi particolari contesti clinici, quando non si riscontri un miglioramento clinico evidente dopo un trattamento rivolto ad altri patogeni respiratori.

Per quanto concerne, invece, l'utilizzo dei metodi sierologici/antigenici, essi si concentrano

ormai prevalentemente alla ricerca degli antigeni urinari di *Legionella pneumophila* e *Streptococcus pneumoniae*, quando clinicamente indicati.

Nella Figura 4 viene proposta una revisione di quanto previsto da HPA per quanto concerne la diagnosi di polmonite grave nel paziente immunocompromesso.

Come si evince facilmente, le differenze fondamentali rispetto all'approccio nel paziente immunocompetente consistono nella ricerca maggiormente orientata all'individuazione di virus, batteri e protozoi che caratterizzano il diverso inquadramento eziologico delle LRTI che insorgono nel paziente immunocompromesso. In questo contesto clinico e immunologico, se si intende garantirsi una diagnostica davvero efficiente ed efficace, non si può più prescindere dai metodi molecolari, che permettono di rilevare microrganismi altrimenti non diagnosticabili con la medesima efficacia e sensibilità.

■ CONCLUSIONI

Le tecnologie analitiche già oggi disponibili, e quelle che stanno prepotentemente entrando a far parte della nostra quotidianità, stanno radicalmente cambiando gli assetti organizzativi e gestionali dei laboratori di microbiologia e virologia.

Ovviamente, la disponibilità di nuovi metodi, per lo più molecolari, necessitano di essere allocati in una diversa visione globale della *mission* del microbiologo, sempre più spesso chiamato a fornire risultati nel minore tempo possibile, per ridurre l'utilizzo di terapie empiriche talora inappropriate, a favore di un più mirato indirizzo terapeutico, possibile quanto auspicabile, quando si dispone dell'evidenza degli agenti

eziologici di malattia in termini di tempo clinicamente utili.

Il presente lavoro ha inteso proporre una linea di indirizzo nella gestione diagnostica delle LRTI nel paziente adulto immunocompetente e immunocompromesso, partendo dalla proposta di altri autorevoli documenti reperibili in letteratura, ma maggiormente mirata a una valorizzazione della diagnostica molecolare, che in alcuni specifici ambiti, qual è appunto quello delle malattie infettive dell'apparato respiratorio, ha la capacità davvero di "fare la differenza" in termini di efficienza ed efficacia, rispetto ai metodi tradizionali colturali, che peraltro non possono al momento essere sostituiti *in toto* dalle più recenti tecnologie analitiche.

Per far sì che le recenti innovazioni biotecnologiche entrino a far parte del bagaglio culturale del microbiologo e comincino davvero a entrare nella logica diagnostica quotidiana dei laboratori di microbiologia e virologia sarà necessario un grosso sforzo per lavorare a favore dell'innovazione, anche attraverso una profonda revisione dei flussi analitici, dell'organizzazione gestionale e della formazione del personale, in modo da garantire la continuità analitica, contestualmente alla qualità del risultato. Sarà, inoltre, necessario un grande lavoro di *équipe*, mediato da specifici *audit* con i colleghi clinici, per individuare le aree dove è maggiormente sentita, ed è più urgente, l'esigenza di un nuovo modo di gestire la diagnostica microbiologica, in modo di non sprecare le già carenti risorse economiche, mirando ad obiettivi di efficacia clinica altrimenti difficilmente raggiungibili con i metodi di indagine tradizionali.

Keywords: molecular methods, lower respiratory tract infections, antibiotic therapy.

RIASSUNTO

Ancora oggi sussistono notevoli difficoltà nell'ottenere una puntuale diagnosi eziologica delle infezioni delle basse vie respiratorie (LRTI).

La letteratura riferisce che in più del 50% dei casi spesso non è possibile giungere all'individuazione dell'agente eziologico di infezione, con la conseguenza di indurre talora un approccio terapeutico inutile o inappropriato.

Anche se esiste tutta una serie di possibili procedure e tecniche analitiche, che consentono di rilevare alcuni comuni agenti eziologici di LRTI, la

diagnostica colturale tradizionale rimane afflitta da una limitata sensibilità, non è disponibile in alcuni contesti, e consente l'individuazione di un numero limitato di possibili agenti eziologici di LRTI.

La diagnostica molecolare, più sensibile e specifica, sta rivoluzionando l'inquadramento diagnostico delle LRTI, consentendo anche una maggiore rapidità di risposta, e un notevole livello di automazione che la rendono particolarmente efficiente ed efficace in diversi contesti clinici.

SUMMARY

At present there is still a great deficit in the routine aetiological diagnosis of lower respiratory tract infections (LRTIs): in most studies more than 50% of cases have no aetiological diagnosis, resulting in prescribing unnecessary or inappropriate antibiotics. A wide variety of diagnostic procedures and techniques are applied to detect the aetiological pathogens of LRTIs. Traditional diag-

nostic culture methods lack sensitivity, are not feasible in many contexts, and focus only on a few of the large number of aetiological agents. Molecular methods are revolutionizing the diagnostic procedures for managing patients with LRTIs, resulting from a combination of improved sensitivity and specificity, a potential for automation and the production of very rapid results.

■ BIBLIOGRAFIA

- [1] Goossens H., Little P. Community acquired pneumonia in primary care. *B.M.J.* 332, 1045-1046, 2006.
- [2] Murdoch D.R. Molecular genetic methods in the diagnosis of lower respiratory tract infections. *AP-MIS* 112, 713-727, 2004.
- [3] Artom A., Artom P., Rattenni S., Castello C., Lo Pinto G., Gruppo di Studio MIPS. MIPS: Multicenter Italian Pneumonia Study. Results of an observational, prospective and multicenter study on the clinical approach to community-acquired pneumonia. *Infez. Med.* 3, 181-185, 2004.
- [4] Libanore M., Bicocchi R., Pantaleoni M., Antonioli M.P., Napoli N., Ghinelli F. Community-acquired pneumonia: appropriateness of admissions, risk factors and therapy. *Infez. Med.* 1, 34-43, 2004.
- [5] Cordani S., Manna A., Vignali M., Tascini C. Bronchoalveolar lavage as a diagnostic tool in patients with haematological malignancies and pneumonia. *Infez. Med.* 4, 209-213, 2008.
- [6] Loens K., Van Heirstraeten L., Malhotra-Kumar S., Goossens H., Ieven M. Optimal sampling sites and methods for detection of pathogens possibly causing community-acquired lower respiratory tract infections. *J. Clin. Microbiol.* 47, 1, 21-31, 2009.
- [7] Bissonette L., Bergeron M.G. Diagnosing infections-current and anticipated technologies for point of care diagnostics and home-based testing. *Clin. Microbiol. Infect.* 16, 1044-1053, 2010.
- [8] Camporese A. Nuove frontiere analitiche in microbiologia e virologia. *Trends Med.* 11, 1, 27-32, 2011.
- [9] GRACE (*Genomics to combat Resistant against Antibiotics in Community acquired LRTI in Europe*). Disponibile in rete all'indirizzo <https://www.grace-lrti.org/>. Ultimo accesso 23 Dicembre 2011.
- [10] Giusti M., Banfi F., Perrone F., Pitrelli A., Pippo L., Giuliani L. Community-acquired pneumonia: a budget impact model. *Infez. Med.* 3, 143-153, 2010.
- [11] Roh K.H., Kim J., Nam M.H., et al. Comparison of the seplex reverse transcription PCR assay with the R-mix viral culture and immunofluorescence techniques for detection of eight respiratory viruses. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 38, 1, 41-46, 2008.
- [12] Ieven G. Currently used nucleic acid amplification tests for the detection of viruses and atypicals in acute respiratory infections. *J. Clin. Virol.* 40, 259-276, 2007.
- [13] Pneumonia Guidelines Committee of the British Thoracic Society Standards of Care Committee. British Thoracic Society guidelines for the management of community acquired pneumonia in adults: update 2009. *Thorax.* 64 (Suppl. III), iii1-iii55, 2009.
- [14] Farina C., Andreoni S., Basaglia G., et al. Le polmoniti: proposta di un percorso condiviso per la diagnosi microbiologica. *Microbiologia Medica.* 24, 4, 175-210, 2009.
- [15] Woodhead M., Blasi F., Ewig S., et al. Guidelines for the management of adult lower respiratory tract infections. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, Suppl. 6, E1-E59, 2011.
- [16] Health Protection Agency (HPA), Standards Unit, Department for Evaluations, Standards and Training Centre for Infections. Pneumonia. Disponibile in rete all'indirizzo <http://www.hpa-standardmethods.org.uk/documents/ssop/pdf/S2.pdf>. Ultimo accesso 23 Dicembre 2011.
- [17] Calderon E.J., Rivero L., Respaldiza N., et al. Systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease who are colonized with *Pneumocystis jiroveci*. *Clin. Infect. Dis.* 45, e17-e19, 2007.