

FACTORES RELACIONADOS CON LA INFECCIÓN POR *PNEUMOCYSTIS JIROVECCII* EN PACIENTES CON ENFERMEDAD PULMONAR INTERSTICIAL DIFUSA (EPID)

J. Martín Juan¹, L. Gómez Izquierdo², L. Jara¹, E. Rodríguez Becerra¹, C. de la Horra³, M.A. Montes-Cano³, N. Respaldiza³, E. Calderón⁴

Unidad Médico Quirúrgica de Enfermedades Respiratorias¹, S. Anatomía Patológica², Unidad de Investigación³, S. Medicina Interna⁴, Hospital Universitario Virgen del Rocío. Sevilla

RESUMEN

Objetivo: Hemos realizado un estudio prospectivo para determinar la prevalencia de colonización de *Pn. jirovecii* (*PnJ*) en muestras de LBA en pacientes con EPID y los factores que pueden condicionar esta situación.

Material y métodos: Se incluyen 240 pacientes con EPID con una media de edad de 56 años. Se estudió el gen mtLSU rRNA de *PnJ* mediante PCR anidada. La PCR resultó positiva en el 32% (78 pacientes).

Resultados: Sólo el tabaquismo mostró una asociación significativa con la evidencia de colonización. Hematológicamente, la leucocitosis y eosinofilia son parámetros relacionados con ésta. Radiológicamente, en el TACAR no hay ningún hallazgo distintivo y tampoco hay diferencia entre ambos subgrupos (PCR+ vs PCR-) en la distribución de las patologías más frecuentes en nuestro medio: fibrosis pulmonar idiopática, sarcoidosis, bronquiolitis obliterante con neumonía organizativa y conectivopatías. En el estudio de los parámetros del LBA, tampoco se observan diferencias significativas. En el seguimiento, no se han evidenciado complicaciones infecciosas atribuibles a este patógeno.

Conclusiones: *PnJ* coloniza un tercio de la población con EPID sin que se haya definido con claridad ningún factor determinante. En el seguimiento de estos pacientes no se han evidenciado complicaciones infecciosas significativas. Falta por determinar la posible implicación de *PnJ* en la aceleración del proceso inflamatorio o deterioro funcional en estos pacientes.

Palabras clave: Enfermedad Pulmonar Intersticial Difusa, *Pneumocystis jirovecii*, Lavado broncoalveolar.

FACTORS RELATED TO THE INFECTION BY PNEUMOCYSTIS JIROVECCII IN PATIENTS WITH DIFFUSE INTERSTITIAL PULMONARY DISEASE (DIPD)

ABSTRACT

Objective: A prospective study was made to determine the prevalence of colonization with *Pn. jirovecii* (*PnJ*) in bronchoalveolar (BAL) samples of patients with DIPD, and the factors that can condition this situation.

Material and methods: 240 patients with DIPD were included in the study, with an average age of 56 years. The mtLSU rRNA gene of *PnJ* was studied by means of nested PCR. The PCR was positive in 32% (78 patients).

Results: Only tobacco use showed a significant association with the evidence of colonization. Leucocytosis and eosinophilia are parameters related to this phenomenon also. Radiologically, there were no distinctive findings in high-resolution computed tomography (HRCT) nor difference between both sub-groups (PCR+ versus PCR-) in the distribution of the most frequent pathologies in our area: idiopathic pulmonary fibrosis, sarcoidosis, bronchiolitis obliterans with organizing pneumonia and connective tissue diseases. Also, no significant differences were observed in the study of the BAL parameters. Infectious complications attributable to this pathogen have not been demonstrated in the follow-up.

Conclusions: *PnJ* colonises a third of the population with DIPD without any determining factor having been clearly defined so far. Significant infectious complications have not been demonstrated in the follow-up of these patients. The possible implication of *PnJ* in the acceleration of the inflammatory process or functional deterioration in these patients has not been demonstrated.

Key words: Diffuse Interstitial Pulmonary Disease; *Pneumocystis jirovecii*; Bronchoalveolar lavage.

INTRODUCCIÓN

Son múltiples las entidades englobadas dentro del conjunto de las enfermedades pulmonares intersticiales (EPID). Salvo un subgrupo de éstas en las cuales es conocido el agente/s (fundamentalmente neumoconiosis

y neumonitis por hipersensibilidad), en el resto de ellas la causa es desconocida.

El estudio mediante lavado broncoalveolar (LBA) ha permitido obtener una amplia información sobre la función de los distintos tipos de células inmunes e inflama-

torias en el tracto respiratorio inferior y los mecanismos inmunopatogénicos generales implicados en buena parte de las patologías más frecuentes en nuestro medio: la neumonía intersticial usual (NIU), expresión histológica de la fibrosis pulmonar idiopática (FPI), sarcoidosis, neumonitis por hipersensibilidad, bronquiolitis obliterante con neumonía organizativa (BONO) y la patología intersticial asociada a enfermedades del colágeno (NI-EC)

Por ser la más frecuente, la FPI es la patología que más interés ha despertado en los últimos años. La etiología es desconocida y parece recorrer, al igual que otras EPID como NI-EC, por una fase inicial de inflamación con un predominio de respuesta inmune Th2, hasta el desarrollo de fibrosis pulmonar. En la etiopatogenia, se han planteado causas genéticas, inmunológicas, infecciones víricas y otras relacionadas con la inhalación. Tampoco se conoce la causa/s de la persistencia de las lesiones y la aceleración de la evolución en determinados casos que frecuentemente cursan con una alta morbimortalidad. En una patología tradicionalmente "hermanada" con la FPI como la NI-EC se ha comprobado la presencia frecuente de *Pneumocystis jirovecii* (*PnJ*) tanto en un contexto clínico neumónico como en pacientes estables con patología intersticial y no siempre asociada con el tratamiento con corticoides y/o inmunosupresores. No están claros los factores clínicos relacionados con esta infección en esta patología.

Este hongo patógeno se asoció inicialmente con neumonía en pacientes profundamente inmunodeprimidos (infección por el VIH, trasplante de órganos o tras tratamiento quimioterápico o inmunosupresor)¹. Sin embargo, datos recientes confirman nuestros hallazgos en cuanto a frecuencia de aislamientos en pacientes inmunocompetentes²⁻⁴ e incluso la alta frecuencia de portadores asintomáticos entre profesionales de la sanidad en contacto estrecho con pacientes con neumonía por *PnJ*⁵. Gracias a la posible tipificación de distintos genotipos mediante una técnica tan sensible como la PCR, se han descrito en los últimos años distintos aspectos epidemiológicos previamente no conocidos, como por ejemplo, el reservorio en la población general inmunocompetente, los posibles mecanismos de transmisión y la significación clínica de la colonización en ausencia de síntomas propios de la infección o enfermedad⁶⁻¹⁴.

Con respecto a su patogenicidad en pacientes con EPID, existe escasa información que avale el papel de *PnJ* como agente implicado en el inicio, desarrollo, progresión o complicación de su evolución, dada la dificultad metodológica para demostrar la presencia de este patógeno en el contexto de colonización, en muestras de biopsia pulmonar o necropsia, incluso empleando técnicas muy sensibles como la amplificación de DNA¹⁴. Sin embargo, en modelos animales experimentales de neumonía por *PnJ*^{15,16}, utilizando mínimas cantidades de microorganismos, este patógeno produce cambios degenerativos en neumocitos tipo I, hipertrofia de neumocitos tipo II, daño alveolar difuso, activación de macrófagos alveolares, desbalance de subpoblaciones linfocitarias a

nivel alveolar, elevación de citoquinas proinflamatorias y cambios en el surfactante pulmonar. Esto indica que el mecanismo de daño alveolar e inicio de la cascada inflamatoria, puede ser similar al de lesión/reparación observado en determinados pacientes con patología intersticial.

Los estudios preliminares realizados por nuestro grupo¹⁷ apuntan hacia la posibilidad de una infección subclínica en un porcentaje importante de pacientes con EPID. Al igual que en otros estudios, la técnica de PCR muestra un porcentaje significativo de infecciones latentes no detectadas por las técnicas de tinción habituales. Sin embargo, faltan por estudiar factores relacionados con la infección como es la propia situación de inmunosupresión (situación hematológica, uso de fármacos o alteración severa en el balance de subpoblaciones en el medio alveolar), grado de destrucción y fibrosis (cuantificada por TACAR) y la diferencia en la presentación clínica, evolución y respuesta al tratamiento entre los pacientes en los que se evidencia colonización y aquellos en los que no se demuestra su presencia.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La infección subclínica por *Pneumocystis*, a través de los cambios a nivel alveolar y la respuesta inmune que desencadena, puede inducir el desarrollo y/o favorecer la progresión de algunas formas de EPID. Por otro lado, el análisis de la frecuencia de infección subclínica y su papel en la fisiopatología de estos procesos puede modificar el manejo clínico y el abordaje terapéutico en estas patologías.

OBJETIVOS

Determinar mediante PCR, la prevalencia de infección subclínica/ colonización por *PnJ* en una población de pacientes que acuden para estudio de EPID y estudiar los **factores clínicos** (edad, hábitos tóxicos, uso de fármacos), **biológicos** (situación hematológica), **grado de severidad en la afectación radiológica** en TACAR, **enfermedad de base** (el propio substrato patológico) y **factores inmunológicos locales** (alteraciones en el balance de subpoblaciones en el LBA) asociados con esta situación.

MATERIAL Y METODOS

Han sido incluidos en estudio de forma prospectiva 240 pacientes que acudieron a la Unidad de Endoscopia Respiratoria por sospecha clínica-radiológica-funcional de EPID, procedentes en su mayoría de la Unidad de Neumopatía Intersticial (Unidad Médico Quirúrgica de Enfermedades Respiratorias), del Servicio de Medicina Interna del HG Virgen del Rocío (Sevilla) y, en menor cuantía, de los Hospitales Juan Ramón Jiménez (Huelva) y del H.U de Puerto Real (Cádiz).

Se han obtenido de la historia clínica los siguientes datos: datos demográficos, datos clínicos (tiempo de evolución de los síntomas, uso de fármacos, exposición

ambiental), patrón radiológico en el TACAR (valoración de la presencia o no de vidrio deslustrado, grado de fibrosis y presencia de panal), datos biológicos habituales, estudio funcional respiratorio completo, diagnóstico clínico inicial y diagnóstico tras confirmación histológica. Las técnicas empleadas en el diagnóstico fueron: en 240 se realizó LBA (100%), en 163 se realizó biopsia transbronquial (68%), en 15 se realizó videotoracoscopias (6%) y en 4 mediastinoscopias (2%). En 2 casos desafortunadamente se llegó al diagnóstico tras necropsia.

Los diagnósticos más frecuentemente obtenidos fueron: FPI (NIU), sarcoidosis, enfermedades del colágeno con afectación pulmonar, BONO, neumonitis por hipersensibilidad y síndromes de hemorragia alveolar difusa.

Las muestras de LBA fueron procesadas de forma inmediata en el Laboratorio de la Unidad de Endoscopia Respiratoria. Se realizó sistemáticamente cultivo de aerobios, tinción de Ziehl y cultivo de Lowenstein, estudio de parásitos y de hongos. En las que cumplieron criterios de calidad y representatividad del tracto respiratorio inferior¹⁸, se determinó concentración y distribución celular y estudio de subpoblaciones linfocitarias mediante técnica de inmunocitoquímica para identificar la población de linfocitos T (CD3+, CD4+, CD8+) y población nK (CD56+) en los casos en los que se evidenció una clara respuesta inmune mediada por linfocitos. Las muestras que no cumplieron criterios de representatividad (predominio de mucina y neutrófilos y/o de células epiteliales bronquiales) fueron excluidas para estudio celular o inmune. Las muestras criopreservadas fueron estudiadas de forma diferida en el Laboratorio de la Unidad de Investigación para estudio de *Pn. jirovecii* a partir del ADN genómico. El gen mtLSU rRNA de la región mitocondrial fue ampliado mediante PCR anidada.

Crterios diagnósticos

En todos los pacientes se dispuso de un diagnóstico clínico y/o histológico. Para realizar el diagnóstico se utilizó toda la información disponible, y todos los estudios (radiológicos, de biopsia y del fluido de LBA) se realizaron por especialistas expertos.

1.- El *diagnóstico de sarcoidosis* fue confirmado histológicamente. En un porcentaje de pacientes, sin confirmación por biopsia, se estableció el diagnóstico de alta probabilidad de sarcoidosis cuando existía un cuadro clínico-radiológico compatible con un cociente CD4/CD8 de 3,5 o superior en el LBA¹⁹⁻²³.

2.- El *diagnóstico de FPI* se realizó mediante biopsia pulmonar, y en aquellos casos en los que no se obtuvo el diagnóstico, se aplicaron los criterios diagnósticos mayores y menores ya establecidos por consenso²⁴. Las alteraciones en el fluido de LBA en esta patología suelen consistir en una neutrofilia asociada o no a eosinofilia. La utilidad de este hallazgo en el diagnóstico se basa en que este patrón es tan constante en la FPI, que en su ausencia hay que plantearse otras opciones diagnósticas.

3.- El *diagnóstico de NOC*, cuando no se pudo realizar biopsia pulmonar confirmatoria, se estableció según los criterios de Poletti^{25,26}: >25% de linfocitos (con un índice CD4/CD8 <0.9) combinado con al menos dos de los siguientes criterios, macrófagos espumosos >20%, >5% de neutrófilos y/o >2% y <25% de eosinófilos (neutrofilia y/o eosinofilia moderadas).

4.- Los criterios *diagnósticos* de las *EPID asociadas a enfermedades del colágeno* son los mismos que los de las EPID idiopáticas sin collagenosis asociada¹⁹.

5.- Para el *diagnóstico de neumonitis por hipersensibilidad* se exigieron criterios mayores y menores ya estandarizados¹⁹. Los criterios mayores exigen la presencia de síntomas, evidencia de exposición, linfocitosis CD3+CD8+, histología compatible y prueba de provocación bronquial positiva.

6.- El diagnóstico de *síndrome de hemorragia alveolar difusa (SHAD)* se basó en datos clínicos, radiológicos y se confirmó citológicamente con el hallazgo en el LBA de un porcentaje importante de macrófagos alveolares cargados con hemosiderina.

7.- El diagnóstico final se estableció de dos formas: ***diagnóstico clínico sin confirmación histológica*** basado en los datos clínico-biológicos, estudio funcional, TACAR y los parámetros del LBA y ***diagnóstico con confirmación cito-histológica***.

8.- La *situación de portador* de este patógeno fue definida como un paciente sin neumonía por *PnJ* con una muestra de LBA que contiene DNA de *PnJ*, detectable mediante PCR anidada en dos análisis independientes.

Estudio estadístico

Los datos epidemiológicos, clínicos, radiológicos, funcionales y biológicos son recogidos en una base de datos diseñada para tal fin en programa Microsoft ACCESS. Los valores en las tablas se expresan, según cada una de ellas, como media e intervalos para expresar el grado de dispersión de los datos o como media ± ESM (error standard de la media). La comparación entre grupos de pacientes se realizó mediante U de Mann-Whitney o Chi cuadrado según que las variables fueran cuantitativas o cualitativas.

RESULTADOS

Se incluyeron secuencialmente en estudio 240 pacientes con EPID. La edad media fue de 56 años con valores extremos entre 13 y 85 años. Se observó un discreto predominio de hombres sobre mujeres.

1. Métodos diagnósticos empleados

La técnica empleada en todos ellos fue el LBA. La muestra obtenida fue dividida para estudio citopatológico, microbiológico y para estudio de perfil celular e inmune y de PCR frente a *Pn. jirovecii*. La BTB se empleó en el 68% y se obtuvo confirmación por técnicas de VT o MED en tan sólo el 6% y 2% respectivamente (Tabla 1). En 2 pacientes se llegó al diagnóstico por necropsia.

TABLA 1.
POBLACIÓN INCLUIDA Y MÉTODO
DIAGNÓSTICOS EMPLEADOS

Pacientes (n)	240
Edad (media e intervab)	56 (13-85)
Sexo (mujer/hombre)	102 / 138
Métodos diagnósticos	
Lavado broncoalveolar	240 (100%)
Biopsia transbronquial	163 (68%)
Videotoroscopia	15 (6%)
Mediastinoscopia	4 (2%)
Necropsia	2 (<1%)

2. Resultados del estudio mediante PCR a *Pn. jirovecii*

La PCR resultó positiva en el 32% de los pacientes estudiados (78/240). Sin embargo, el estudio microbiológico habitual evidenció quistes de *PnJ* en tan sólo 17 de los 78 pacientes (21%). Hubo 2 falsos negativos comprobados.

No se comprobó diferencia en la edad. Si se observó una tendencia al predominio en varones y una asociación significativa con el hábito tabáquico en este subgrupo con resultado positivo en la PCR.

3. Diferencias entre pacientes (PCR+ vs PCR-) en el estudio hematológico

No se comprobó en el subgrupo con PCR+ ni leucopenia, neutropenia o linfopenia que justificaran un estado de relativa inmunosupresión. Más aún, se observó una clara tendencia a la leucocitosis y una expansión de eosinófilos en sangre (Tabla 2)

4. Influencia de los tratamientos previos con corticoides y/o inmunosupresores

Se observó un mayor porcentaje de pacientes con PCR+ comparativamente con los que tenían PCR- en la frecuencia de tratamientos previos (19% vs 15%) aunque sin significación estadística (Tabla 2).

5. Diferencias en la expresión radiológica (TACAR)

Como se muestra en la Tabla 2, no hay diferencias entre ambos subgrupos en la expresión radiológica, ni en los signos relacionados con actividad inflamatoria (adenopatías mediastínicas, vidrio deslustrado, condensaciones parcheadas o micromódulos) ni en los relacionados con fibrosis avanzada (engrosamiento de septos interlobulillares, bronquiectasias por tracción o panal).

6. Estudio de la patología subyacente (Tabla 3)

La confirmación histológica se obtuvo tan sólo en 67 de 240 pacientes (28%), oscilando entre el 24% en el

TABLA 2.
DIFERENCIAS ENTRE PACIENTES SEGÚN RESULTADOS DE LA PCR A *PN. JIROVECII*

	PCR+	vs	PCR -	p
Pacientes (n)	78		162	
Edad (media, intervalo)	56 (25-85)		56 (13-84)	
Sexo (mujer/ hombre)	27/51 (35% vs 65%)		75/87 (46% vs 54%)	
Hábito tabáquico	56%		42%	<0.05
Datos hematológicos (media y rango)				
Leucocitos	10103 (5150-18300)		6811 (2600 -13900)	<0.05
Neutrófilos	7776 (2720-15900)		4247 (1490 - 12400)	ns
Linfocitos	2064 (300-5500)		1882 (700 - 4700)	ns
Eosinófilos	490 (29-5000)		262 (30 -1200)	<0.05
Tratamiento/s previo/s (corticoides y/o inmunosupresores)	15 (19%)		24 (15%)	ns
TACAR				
Adenopatías	19 (24%)		43 (26%)	ns
Vidrio deslustrado	14 (18%)		42 (26%)	ns
Parches	13 (16%)		23 (14%)	ns
Micronódulos	9 (11%)		30 (18%)	ns
Engrosamiento.septos	14 (18%)		37 (23%)	ns
Bronquiectasias por tracción	4 (5%)		14 (8%)	ns
Panal	18 (23%)		39 (24%)	ns
Condensación	1 (1%)		9 (5%)	ns

TABLA 3.
EPID DIAGNOSTICADAS Y RESULTADOS DEL ESTUDIO DE PCR A *PN. JIROVECII*

Patologías	n	PCR+	vs	PCR-	Aislamiento <i>Pn. jirovecii</i> (Tinción/IFD)
NIU	69	22 (32%)		47 (68%)	4 (6%)
Enfermedades del colágeno	38	13 (34%)		25 (66%)	2 (5%)
Sarcoidosis	35	10 (28%)		25 (72%)	2 (5%)
BONO	31	9 (29%)		22 (71%)	1 (3%)
Síndrome hemorragia alveolar difusa	20	8 (40%)		12 (60%)	2 (10%)
Neumonía intersticial inespecífica	5	1 (20%)		4 (80%)	-
Neumonía intersticial descamativa	3	1 (33%)		2 (66%)	1
Neumonía intersticial aguda (necropsia)	2	2		-	-
Histiocitosis X	2	1		1	-
Neumonitis hipersensibilidad	2			2	-
Bronquiolitis	2			2	-
Bronquiolitis respiratoria	1	1			1
Proteinosis alveolar	1	1		-	-
Neumonía lipoidea	1			1	-
Neumonía intersticial linfoide	1			1	-
Vasculitis	2			2	1
Calcificación metastásica	1			1	-
EPID no diagnosticadas	24	9 (37%)		15 (59%)	3
Total	240	78 (32%)		162 (68%)	17

Confirmación histológica: en NIU (neumonía intersticial usual): 19 / 69 ; en **sarcoidosis**: 23 /35 ; en **BONO** (bronquiolitis obliterante con neumonía organizativa): 2 /31 . En estas patologías ,en los casos sin confirmación histológica, el diagnóstico se basó en la clínica, serología, TACAR y parámetros cito-inmunológicos del LBA. En **enfermedades del colágeno**, el diagnóstico de EPID asociada se realizó en base a la clínica, pruebas de función respiratoria, TACAR y parámetros cito-inmunológicos en el LBA.

subgrupo con PCR+ frente a *PnJ* y el 31% en pacientes con PCR-. Por este motivo hemos utilizado, además del diagnóstico histológico, criterios clínicos, radiológicos (TACAR), datos de serología y parámetros cito-inmunológicos en el LBA (referidos en el apartado de METODOS). La PCR resultó positiva entre el 32% y el 40 % en las patologías más frecuentes en nuestro medio: NIU, enfermedades del colágeno, sarcoidosis, BONO y síndromes de hemorragia alveolar.

Resultó llamativa la presencia de restos de este patógeno en los dos casos con neumonía intersticial de curso agudo (NIA) diagnosticados mediante necropsia. Previamente al éxitus se demostró una PCR+ a *Pn. jirovecii* en el fluido de LBA, sin embargo no se encontró este patógeno en el tejido. De estos dos casos, uno de los pacientes tenía 74 años y estaba diagnosticado de artritis reumatoide. Desarrolló una neumonía bilateral y se aisló *Aspergillus fumigatus* en la necropsia (aspergilosis invasiva). El otro paciente tenía 48 años y presentó un cuadro de tos, disnea , síndrome constitucional de dos meses de evolución e insuficiencia respiratoria progresiva sin respuesta al tratamiento. La necropsia mostró una NIA con daño alveolar difuso sin demostración de patógeno.

7. Diferencias entre patologías en los parámetros del LBA según resultado de la PCR a *Pn.jirovecii*

Sin tener en cuenta las patologías subyacentes, las poblaciones de pacientes con PCR+ y PCR- no mostraron diferencias significativas en los parámetros del LBA, aunque se observó una discreta diferencia en el balance CD4/CD8 que no resultó significativa (Tabla 4). Hemos estudiado en cada patología las posibles diferencias en los parámetros inmunológicos del LBA entre los casos con PCR+ a *PnJ* y PCR- (Tabla 5). Las alteraciones observadas, sobre todo en el grupo de pacientes con NIU y sarcoidosis, consisten en un descenso en el porcentaje de linfocitos CD4+ y un discreto incremento en la población de linfocitos CD8+ con el consiguiente descenso del índice CD4/CD8 aunque no alcanzan significación estadística, probablemente en parte por la diferencia en el número de pacientes entre ambos subgrupos.

8. Seguimiento de los pacientes

Se ha seguido a los pacientes durante un periodo de tiempo largo (media de 2.5 años) sin que se haya evidenciado ningún episodio neumónico atribuible a *PnJ*. Tan

TABLA 4.
DIFERENCIAS EN LOS PARÁMETROS DEL LBA SEGÚN LOS RESULTADOS DE LA PCR A *PN. JIROVECI*

Parámetros en el LBA	PCR+	vs	PCR -	p
Distribución celular				
Macrófagos alveolares (%)	54 (4-100)		53 (6-100)	ns
Linfocitos (%)	25 (4-62)		36 (1-92)	ns
Neutrófilos (%)	11 (1-70)		8 (1-65)	ns
Eosinófilos (%)	7 (1-71)		3 (1-62)	ns
Subpoblaciones linfocitarias				
CD3+ (%)	84.0 ± 2.1		89.0 ± 2.4	ns
CD4+ (%)	45.1 ± 4.8		50.0 ± 3.7	ns
CD8+ (%)	37.2 ± 4.7		37.2 ± 3.2	ns
CD56+ (%)	5 ± 1.5		3 ± 1.2	ns
Índice CD4/CD8	2.09 ± 0.4		2.32 ± 0.37	ns

Datos expresados como media y rango de valores extremos (distribución celular) y como media ± ESM (subpoblaciones linfocitarias)

TABLA 5.
DIFERENCIAS EN LOS PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS EN EL FLUIDO DE LBA EN LAS EPID MÁS FRECUENTES EN NUESTRO MEDIO SEGÚN RESULTADOS DE LA PCR A *PN JIROVECI*

	NIU		Sarcoidosis		Enf. colágeno		BONO		p
	PCR+	vs PCR-	PCR+	vs PCR-	PCR+	vs PCR-	PCR+	vs PCR-	
Linf. CD3+ (%)	93.0 ± 2	88.8 ± 2.5	89.3 ± 2.9	94 ± 0.6	90.0 ± 0.0	91 ± 1.4	85 ± 3.4	86 ± 4.1	ns
Linf. CD4+ (%)	40.5 ± 11	52.4 ± 4.6	61.0 ± 7.6	70 ± 3.6	29.0 ± 6.4	7.3 ± 10	39 ± 9	27 ± 6.1	ns
Linf. CD8+ (%)	46.2 ± 14	34.4 ± 6.4	26.7 ± 6.2	24 ± 2.6	33.0 ± 12.7	45.2 ± 8	47 ± 6.9	55 ± 6.7	ns
Linf. CD56+ (%)	8.1 ± 5.2	4.7 ± 1.7	2.3 ± 0.8	2.7 ± 1.0	3.0 ± 2.3	1.3 ± 0.2	3 ± 1.3	1 ± 0.2	ns
Índice CD4/CD8	1.66	vs 2.02	3.48	vs 3.91	1.49	vs 1.34	0.99	vs 0.65	ns

Datos expresados como media ± ESM.

sólo los dos pacientes citados previamente presentaron una evolución clínica rápidamente progresiva con desarrollo de insuficiencia respiratoria global y éxitus. En la necropsia se identificó tan sólo *Aspergillus fumigatus* y no se observó *PnJ* aunque la PCR previa resultó positiva. No se han obtenido aún conclusiones sobre la posible implicación de la colonización por *PnJ* en el deterioro funcional en estos pacientes ya que el tiempo de seguimiento es aún corto.

DISCUSIÓN

Una de las primeras conclusiones obtenidas del estudio ha sido la validación de la técnica de PCR frente a *PnJ* (previamente *Pn. carinii*), tanto en el diagnóstico clínico como en el estudio epidemiológico para la identificación de portadores colonizados ya que esta técnica tiene mucha mayor sensibilidad que las técnicas habituales de tinción. Este requisito es necesario cuando se trata

de demostrar la presencia de este hongo patógeno en pequeña cuantía como habitualmente ocurre en pacientes no inmunodeprimidos. Tan sólo en casos aislados (2 pacientes) hemos comprobado un falso negativo de la técnica coincidiendo con un aislamiento bacteriano. Es posible que en esta situación sea dificultosa la identificación de restos del material genético de *PnJ* o que exista una degradación del DNA en el procesamiento.

Según los datos obtenidos, es difícil prever el riesgo de colonización por *PnJ* en un paciente concreto basándonos en datos clínicos como la edad, patología subyacente o situación de inmunosupresión relativa inducida por fármacos o neutropenia/linfopenia. Tan sólo el tabaquismo parece asociarse de forma significativa con la evidencia de colonización. Este dato es importante, ya que en diversos estudios, incluido un estudio previo de nuestro grupo, se ha encontrado una relación entre tabaquismo y colonización por *PnJ*¹⁷. Además, en un estudio reciente⁴ realizado en una patología relacionada con el

tabaquismo como la EPOC, la frecuencia de colonización por *PnJ* se asoció con el grado de severidad de la obstrucción, oscilando entre un 36% en pacientes en estadio IV de la GOLD y el 5% en fumadores con función respiratoria normal. En esta misma patología y otras enfermedades pulmonares crónicas se han descrito frecuencia de colonización oscilante entre el 7% y 41%^{7,8}.

Desde el punto de vista analítico, los colonizados muestran, como grupo, mayor media en la cifra de leucocitos y de eosinófilos en sangre. Sin embargo, en contra de lo descrito en estudios previos, no hemos podido comprobar que exista relación con la situación de linfopenia.

La expresión radiológica, fundamentalmente los hallazgos del TACAR, tampoco parece relacionarse con una mayor frecuencia de colonización. Aunque inicialmente encontramos una mayor frecuencia en pacientes con evidencia de fibrosis en el contexto de FPI, también la hemos comprobado en distintos contextos radiológicos, lo que indica que el patrón radiológico, como expresión de las alteraciones parenquimatosas subyacentes asociadas con el remodelado estructural, tampoco se relaciona con la evidencia de colonización.

El estudio de la influencia del tipo de patología intersticial en esta situación es complejo ya que la obtención de conclusiones siempre está condicionada por la escasa frecuencia con la que se realizan técnicas de confirmación diagnóstica. En nuestra serie, tan sólo en el 28% se confirmó el diagnóstico, en su mayoría mediante BTB y mucho más infrecuentemente mediante videotoracoscopia o mediastinoscopia. Por este motivo hemos utilizado, además del diagnóstico histológico, criterios clínicos, radiológicos, datos de serología y parámetros cito-inmunológicos en el LBA (referidos en el apartado de METODOS) ampliando así el número de pacientes incluidos en cada patología.

Otra limitación en este grupo de pacientes no inmunodeprimidos es que el estudio de identificación de *PnJ* no se realiza de forma rutinaria en el tejido pulmonar y mucho menos aún mediante PCR del propio lisado del tejido. Los primeros estudios realizados en pulmones *postmortem* mediante amplificación del DNA no lograron evidenciar presencia de DNA de *Pneumocystis* en pacientes en los que previamente se había demostrado en muestras respiratorias¹⁴. Este es un problema metodológico muy importante para poder comprender el significado de la colonización sin presencia del patógeno en tejido. Aunque esta línea de estudio no estaba contemplada en nuestros objetivos iniciales, creemos que será necesario incluirla en posteriores estudios para determinar si hay o no relación entre colonización y alteraciones histológicas.

Según nuestros resultados, no hemos comprobado mayor frecuencia de un tipo de enfermedad en ambos subgrupos. Se ha evidenciado colonización por *PnJ* en patologías tan diferentes desde el punto de vista etiopatogénico y evolutivo como FPI, colagenosis con afectación pulmonar, sarcoidosis, BONO, síndromes de hemorragia alveolar difusa y otras patologías intersticiales

muy infrecuentes. También pudo comprobarse en dos casos con neumonía intersticial aguda. Por otra parte, se ha observado tanto en pacientes con FPI muy evolucionadas como en pacientes con sarcoidosis en estadios radiológicos iniciales con predominio de adenopatías mediastínicas. El papel de la colonización por *PnJ* en estas patologías puede ser muy diferente. Podría actuar en unos casos como potencial inductor de patología por distintas vías y en otros casos como modulador de la evolución.

De entre las EPID, la población con artritis reumatoide y otras enfermedades del colágeno resulta particularmente interesante ya que los pacientes realizan con frecuencia tratamiento crónico con corticoides o inmunosupresores. En un estudio²⁷ se valoraron los factores de riesgo para el desarrollo de neumonía por *PnJ* en una población de 75 pacientes (59 con LES y 16 con polimiositis/dermatomiositis, DM/PM) que seguían tratamiento con corticoides orales y que ingresaron con síntomas respiratorios, fiebre y alteraciones radiológicas compatibles con infección por este patógeno. Se comprobó la etiología por estudio de esputo o LBA en el 9% de los casos, siendo más incidente en el grupo con DM/PM. La linfopenia en sangre periférica y la evidencia de fibrosis intersticial fueron los factores de riesgo más relacionados con la infección. En otro estudio²⁸, se valoraron también los factores relacionados con la infección por *PnJ* en una población diagnosticada con distintas enfermedades del colágeno. Para ello se estudiaron retrospectivamente 34 casos de neumonía por *PnJ*. Al tiempo de la neumonía el 94% recibían tratamiento con corticoides asociados en 24 casos a tratamiento inmunosupresor (sobre todo ciclofosfamida y metotrexate). La mayor parte de los pacientes estaban linfopénicos. Los dos estudios coinciden en la importancia del tratamiento corticoideo o con inmunosupresores en el desarrollo de neumonía por *PnJ*; sin embargo, debe tenerse en cuenta que en ambos se incluyen poblaciones de pacientes con diagnóstico clínico- radiológico de neumonía.

En nuestro estudio, todos los pacientes con enfermedades del colágeno presentaban síntomas y radiología compatibles con una EPID asociada a la enfermedad de base, sin síntomas ni signos de infección. El valor clínico del aislamiento de *PnJ* mediante PCR en esta situación es controvertido ya que en el seguimiento clínico (con una media de 2.5 años) no se ha comprobado ningún evento infeccioso atribuible a este hongo oportunista. Aún así, podría plantearse la posibilidad de establecer una quimioprofilaxis en este subgrupo de pacientes en los que se evidencia colonización por *PnJ*, sobre todo en los que presentan linfopenia y van a ser sometidos a tratamiento durante tiempo prolongado con corticoides y/o inmunosupresores.

La evidencia de colonización por *PnJ* en el grupo de pacientes con síndrome de hemorragia alveolar difusa también resulta intrigante. Es difícil valorar este hallazgo en este contexto clínico ya que es un grupo heterogéneo de pacientes en el que se incluyen casos con base inmune demostrada (anticuperos anti MBG) pero en

otros no. Es posible que en algunos casos, la colonización por *PnJ* cause una alteración en las estructuras alveolares y se establezca una autorespuesta inmune general frente a estas estructuras alteradas. De cualquier forma, para confirmar esta hipótesis, debería realizarse un estudio de respuesta inmune celular /humoral específica frente a este patógeno.

La propia inmunología pulmonar local puede condicionar y/o mantener la situación de colonización en las distintas patologías. Por este motivo, nos planteamos valorar este aspecto aún sabiendo la enorme complejidad de este estudio, ya que, como se ha comentado previamente, éste debería incluir aspectos de la inmunidad celular y humoral específica a nivel local y además, estudio de citoquinas proinflamatorias que definan una respuesta específica a nivel pulmonar frente a este patógeno. En nuestro trabajo nos hemos limitado al estudio habitual en el fluido de LBA de los parámetros celulares e inmunes (estudio de distribución celular y subpoblaciones linfocitarias). Las diferencias observadas entre patologías (p.e entre sarcoidosis, enfermedades del colágeno y BONO) coinciden con los descritos en la literatura y es precisamente esta diferencia en el perfil de respuesta inmunoinflamatoria en el LBA lo que define su utilidad diagnóstica¹⁸⁻²⁶. Sin embargo no hemos evidenciado diferencias claras y significativas entre los pacientes colonizados y los que no lo están. El único hallazgo que por el momento parece mostrar una relación con la situación de colonización dentro de cada patología, es un desbalance de subpoblaciones linfocitarias, con un índice CD4/CD8 discretamente menor en el grupo con PCR+ en NIU y sarcoidosis, aunque sin significación estadística. Este hallazgo va de acuerdo con los hallazgos encontrados en estudios de neumonía experimental por *PnJ*^{15,16} en los que se demuestra que, además de la alteraciones en neumocitos tipo II con daño alveolar difuso, se observa precozmente una activación de macrófagos alveolares y desbalance de subpoblaciones linfocitarias con un claro predominio de la población CD8+ e inicio de la cascada inflamatoria con liberación de citoquinas proinflamatorias. Otro aspecto importante de la interacción

entre *PnJ* y estructuras alveolares, es la alteración en la composición del surfactante y la consiguiente repercusión funcional. Este hecho aún no está bien definido en los escasos estudios realizados y por tanto podría plantearse como línea de trabajo en posteriores investigaciones.

Desde el punto de vista epidemiológico, la presencia de *PnJ* en tipos tan diversos de patologías con etiopatogenia tan diferente podría considerarse una extensión de la distribución observada en la población general, en la cual se ha detectado hasta en un 20% de los individuos sanos estudiados¹³. Es posible que en determinadas patologías *PnJ* induzca el desarrollo de patología mientras que en otros casos sea aclarado del pulmón sin que origine daño pulmonar alguno. Además, *Pneumocystis* es capaz de replicarse en el pulmón del huésped inmunocompetente, lo que indica que éste puede constituir un reservorio activo con capacidad de transmitir este patógeno a otros grupos de pacientes¹². En ambas situaciones de portador, *PnJ* puede vehiculizarse y transmitirse a otros pacientes, situación que debe tenerse en cuenta a efectos epidemiológicos. Por otro lado, como ha sido comentado previamente, es probable que la colonización por *PnJ* en estos pacientes y en otros con EPID no se limite a un posible papel en las agudizaciones infecciosas sino que puede estar implicado en la aceleración del proceso inflamatorio y fibrótico y en el rápido deterioro funcional que se observa en algunos casos.

En definitiva, *Pn. jirovecii* coloniza un tercio de la población con EPID sin que se haya definido con claridad ningún factor/es determinante/s. En el seguimiento no se han evidenciado complicaciones infecciosas significativas. Sin embargo, falta por encontrar, en la población colonizada, datos que demuestren una respuesta inmune específica frente a este patógeno y determinar si *Pneumocystis* está implicado en la aceleración del proceso inflamatorio/fibrótico y en el deterioro funcional observado en un porcentaje importante de estos pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

- Levine SJ. *Pneumocystis carinii*. Clin Chest Med 1986; 17: 665-695.
- Calderón EJ, Wichman I, Varela JM, Respaldiza N, Regordan C, Fernández Alonso J, et al. Presence of glomerular basement membrane (GBM) antibodies in HIV- patients with *Pneumocystis carinii* pneumonia. Clin Exp Immunol 1997; 107: 448-450.
- Nevez G, Raccurt C, Vincent P, Jounieaux V, Dei-Cas E. Pulmonary colonization with *Pneumocystis carinii* in human Immunodeficiency virus -negative patients: assessing risk with blood CD4+ cell counts. Clin Infect Dis 1999; 29:1331-1332.
- Morris A, Scirba FC, Lebedeva IP, Githaiga A, Elliott WM, Hogg JC, et al. Association of chronic obstructive pulmonary disease severity and *Pneumocystis carinii* colonization. Am J Crit Care Med 2004; 170: 408-413.
- Miller RF, Ambrose HE, Wakefield AE. *Pneumocystis carinii* f. Sp.hominis DNA in immunocompetent health care workers in contact with patients with *P.carinii* pneumonia. J. Clin Microbiol 2001; 39: 3877-3882.
- Wakefield AE, Pixley FJ, Banerji S, Sinclair K, Miller RF, Moxon ER, et al. Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. Lancet 1990; 336: 451-453.
- Sing A, Trebesius K, Roggenkamp A, Rüsmann H, Tybus K, Ptaff F, et al. Evaluation of diagnostic value and epidemiological implications of PCR for *Pneumocystis carinii* in different immunosuppressed and immunocompetent patient groups. J Clin Microbiol 2000; 38: 1461-1467.
- Probst M, Ries H, Schmidt-Wieland T, Serr A. Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in patients with chronic lung diseases. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000; 19(8): 644-645.
- Montes-Cano MA, de la Horra C, Martín Juan J, Varela JM, Torronteras R, Respaldiza N, et al. *Pn jirovecii* genotypes in Spanish population. Clin Infect Dis 2004, Jul 1; 39(1) 123-128.
- Calderón E, de la Horra C, Montes Cano MA, Respaldiza N, Martín Juan J, Varela JM. Resistencia genotípica a sulfamidas en pacientes con neumonía por *Pn. jirovecii*. Med Clin (Barc) 2004; 122(16): 617-619.

11. Calderón E, de la Horra C, Medrano FJ, López-Suárez A, Montes-Cano MA, Respaldiza N, et al. Pn. jirovecii isolates with dihydropteroate synthase mutations in patients with chronic bronchitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23(7) :545-549.
12. Chabé M, Dei-Cas E, Creusy C, Fleurisse L, Respaldiza N, Camus D, et al. Immunocompetent hosts as a reservoir of *Pneumocystis* organisms; histological and RT-PCR data demonstrate active replication. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23: 89-97.
13. Medrano FJ, Montes-Cano M, Conde M, de la Horra C, Respaldiza N, Gasch A, et al. Pn. jirovecii in general population. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 245-250.
14. Peters SE, Wakefield AE, Sinclair K, Millard PR, Hopkin JM. A research for *Pneumocystis carinii* in postmortem lungs by DNA amplification. *J Pathol* 1992; 166: 195-198.
15. Board KF, Patil S, Lebedeva I, Capuano S, Trichel AM, Murphey-Corb M, et al. Experimental *Pneumocystis carinii* pneumonia in simian immunodeficiency virus-infected Rhesus macaques. *J Infect Dis* 2003; 187: 576-588.
16. Croix DA, Board KF, Capuano S, Murphey-Corb M, Haidaris CG, Flynn JL, et al. Alterations in T lymphocyte profiles of bronchoalveolar lavage fluid from SIV- and *Pneumocystis carinii*-coinfected rhesus macaques. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002; 18 (5) : 391-401.
17. Vidal S, de la Horra C, Martín Juan J, Montes-Cano MA, Rodríguez E, Respaldiza N, et al. Pn. jirovecii colonisation in patients with interstitial lung disease. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12:231-235.
18. Martín Juan J, Valenzuela Mateos F, Soto Campos G, Segado Soriano A, Rodríguez Panadero F, Castillo Gomez J. Estudio de calidad y selección de muestras de lavado broncoalveolar en neumatías difusas. *Arch Bronconeumol* 1996; 32:332-340.
19. Xaubet A, Ancochea J, Blanquer R, Montero C, Morell F, Rodríguez Becerra E, et al. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades pulmonares intersticiales difusas. *Arch Bronconeumol* 2003; 39:580-600.
20. Hiraga Y, Hosoda Y. Acceptability of epidemiological diagnostic criteria for sarcoidosis without histological confirmation. In: Mikami R, Hosoda Y, Eds. *Sarcoidosis* University of Tokyo Press. Tokyo. 1981:373-377.
21. Statement on sarcoidosis. Joint Statement of the American Thoracic Society (ATS), the European Respiratory Society (ERS) and the World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders (WASOG) adopted by the ATS Board of Directors and by the ERS Executive Committee, February 1999. *Am J Respir Crit Care Med*.1999 ;160(2):736-755.
22. Costabel U, Zaiss AW, Guzman J. Sensitivity and specificity of BAL findings in sarcoidosis. *Sarcoidosis* 1992; 9 (Suppl. 1): 211-214.
23. Winterbauer RH, Lammert J, Selland M, Wu R, Corley D, Springmeyer SC. Bronchoalveolar lavage cell populations in the diagnosis of sarcoidosis. *Chest*. 1993; 104(2):352-361.
24. American Thoracic Society/European Respiratory Society. International multidisciplinary consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:277-304.
25. Poletti V, Cazzato S, Minicuci N, Zompatori M, Burzi M, Schiattone ML, et al. The diagnostic value of bronchoalveolar lavage and transbronchial lung biopsy in cryptogenic organizing pneumonia. *Eur Respir J* 1996;9(12):2513-2516.
26. Costabel U, Teschler H, Guzman J, et al. Bronchiolitis obliterans organizing pneumoniae (BOOP): the cytological and immunocytological profile of bronchoalveolar lavage. *Eur Respir J* 1992; 5: 791-797.
27. Kadoya A, Okada J, Iikuni Y, Kondo H. Risk factors for *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with polymyositis/dermatomyositis or systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1996; 23 : 1186-1188.
28. Godeau B, Coutant-Perronne V, Le Thi Huong D, Guillevin L, Magadur G, De Bandt M, et al. *Pneumocystis* pneumonia in the course of connective tissue disease : report of 34 cases. *J Rheumatol* 1994 : 21 : 246-251.