



TRABAJO DE FIN DE GRADO



Estudio de prevalencia de Pneumocystis Jirovecii en una cohorte de pacientes con insuficiencia cardiaca.

Prevalence study of Pneumocystis Jirovecii in a cohort of patients with heart failure.

Autora

María Izarbe Merino Casallo

Director

Miguel Ángel Torralba Cabeza

Facultad de Medicina. Universidad de Zaragoza.
2016

ÍNDICE

1. Resumen/Abstract	1
2. Introducción	2
2.1 Insuficiencia cardiaca	2-11
2.2 Pneumocystis Jirovecii	11-17
2.3 Micobiota oral	17-19
3. Hipótesis de trabajo	20
4. Material y métodos	21
4.1 Objetivos	21
4.2 Metodología	21-26
5. Resultados	27
6. Discusión.....	39
7. Conclusiones	44
8. Bibliografía	45
9. Anexos	51

Resumen

Pneumocystis Jirovecii es un hongo atípico responsable de la neumonía en individuos inmunodeprimidos (principalmente VIH+). La colonización por *Pneumocystis* –descrita como la presencia de ADN del patógeno en ausencia de signos y síntomas de neumonía- ha sido demostrada en sujetos con enfermedades crónicas pulmonares, especialmente en el EPOC. Este estudio investiga acerca de la relación entre la colonización por *P. Jirovecii* y la insuficiencia cardiaca, para lo cual se llevó a cabo un estudio transversal en una cohorte de pacientes con insuficiencia cardiaca. Se obtuvieron 72 muestras de lavado orofaríngeo que se analizaron utilizando la técnica de PCR. El estudio reveló que solo uno de los pacientes estaba colonizado por el microorganismo, por lo que se concluyó que *Pneumocystis Jirovecii* no juega un papel en la fisiopatología de la insuficiencia cardiaca.

Abstract

Pneumocystis Jirovecii is an atypical fungus responsible for pneumonia in immunocompromised patients (particularly those with HIV infection). *Pneumocystis* colonization –described as the detection of DNA without signs or symptoms of pneumonia- has been observed in individuals with chronic pulmonary diseases, specially in COPD. The objective of this study was to determine if this pathogen is associated with heart failure. A cross-sectional study was conducted in a cohort of patients with heart failure. 72 oropharyngeal washes were obtained and then analysed using the PCR technique. The study revealed that only one of the subjects was colonized by the pathogen, which suggests that *Pneumocystis Jirovecii* does not play a role in the physiopathology of heart failure.

Palabras clave: *pneumocystis jirovecii*, colonización, insuficiencia cardiaca, microbiota oral.

INTRODUCCIÓN

INSUFICIENCIA CARDIACA

La insuficiencia cardiaca (IC) se puede definir como una anomalía de la estructura o función cardiacas que hace que el corazón no sea capaz de suministrar oxígeno a una frecuencia acorde con las necesidades de los tejidos del organismo (o lo hace sólo a costa de presiones de llenado aumentadas)¹.

La identificación de la causa subyacente resulta esencial tanto para establecer el diagnóstico de insuficiencia cardiaca como para determinar el tratamiento específico².

Epidemiología y etiología

La prevalencia de la insuficiencia cardiaca en los países desarrollados se sitúa aproximadamente entre el 1-2%, con una incidencia de 5-10 casos por cada 1000 personas al año². Este porcentaje aumenta con la edad, de forma que más del 10% de los pacientes de 70 años o más sufren de esta patología¹. En los grupos más jóvenes, la prevalencia es mayor en los varones debido a que la enfermedad coronaria (una de las causas más frecuentes de IC) aparece a edades más tempranas². En las personas de edad avanzada la prevalencia es similar en ambos sexos².

La prevalencia total de la IC está en aumento debido al envejecimiento de la población, una mayor supervivencia de los pacientes que sufren eventos coronarios y la eficacia de la prevención, que provoca un retraso en la aparición de eventos coronarios en pacientes de alto riesgo y en los que han sobrevivido a un primer evento².

Las causas de deterioro funcional más comunes son el daño o la pérdida de músculo cardiaco, isquemia aguda o crónica, aumento de la resistencia vascular con hipertensión o el desarrollo de taquiarritmias (como fibrilación auricular). Sin lugar a dudas, la enfermedad coronaria causa la IC en cerca del 70% de los pacientes. La enfermedad valvular es origen en el 10% de los casos y las miocardiopatías, de otro 10%².

Insuficiencia cardiaca sistólica frente a insuficiencia cardiaca diastólica

La terminología principal utilizada para describir la IC se basa en determinar la fracción de eyección (FE), que se define como el volumen sistólico dividido por el volumen diastólico final¹. Es importante tener en cuenta que la FE no es un índice de contractilidad, ya que depende de los volúmenes, precarga, postcarga, frecuencia cardiaca y función valvular, y tampoco es equivalente a volumen sistólico.¹

Normalmente se distingue entre la IC con fracción de eyección reducida (IC-FER) o sistólica (FE >50%) y la IC con fracción de eyección conservada (IC-FEC) o diastólica (FE <40%)².

La última guía publicada en mayo de 2016 por la Asociación Europea de Cardiología (ESC) hace referencia al conjunto de pacientes con una FE situada entre el 40-49%, los cuales representan un “área gris” que actualmente se define como “insuficiencia cardiaca con fracción de eyección de rango medio” (*heart failure with mid-range ejection fraction*)¹⁸. Estos pacientes presentan de manera predominante una disfunción sistólica, pero asociada a rasgos de disfunción diastólica (ver Tabla 1)

La diferenciación de los pacientes según su FE es importante debido a la diferente etiología, características demográficas (los pacientes con IC-FEP tienen edades más avanzadas y son más frecuentemente mujeres) comorbilidades y respuesta al tratamiento (las estrategias terapéuticas actuales únicamente han demostrado reducir tanto la morbilidad como la mortalidad en pacientes con IC-FEP). Además, la gran mayoría de los ensayos clínicos seleccionan a los pacientes basándose en este parámetro¹⁸.

Actualmente existe controversia acerca de las diferencias en cuanto a supervivencia de ambas entidades, aunque la mayoría de los estudios indican que los pacientes con IC-FEP tienen una tasa de supervivencia ligeramente mayor que aquellos con IC-FER.

Clasificación funcional

La clasificación funcional de la NYHA (*New York Heart Association*) (ver tabla 1) se ha utilizado para seleccionar a los pacientes en casi todos los ensayos de tratamiento aleatorizados de la IC y, por tanto, para describir qué pacientes se benefician de tratamientos eficaces.¹

TABLA 1. Clasificación funcional de la NYHA basada en la gravedad de los síntomas y actividad física¹

CLASE I	Sin limitación para la actividad física. La actividad física normal no causa excesiva disnea, fatiga o palpitaciones
CLASE II	Ligera limitación para la actividad física. Cómodo en reposo pero la actividad física normal resulta en excesiva disnea, fatiga o palpitaciones
CLASE III	Marcada limitación para la actividad física. Cómodo en reposo, si bien una actividad física menor que lo normal resulta en excesiva disnea, fatiga o palpitaciones
CLASE IV	Incapacidad para mantener actividad física sin molestias. Puede haber síntomas en reposo. Si se realiza alguna actividad física, los síntomas aumentan.

Diagnóstico

Clínica y Exploración Física

Las manifestaciones clínicas más importantes y frecuentes de la IC aparecen detalladas en la tabla 2¹

El diagnóstico de la IC puede ser difícil, especialmente en las etapas iniciales, dado que los síntomas más frecuentes suelen ser inespecíficos.¹

TABLA 2. Signos y síntomas más frecuentes de IC¹

Síntomas	Signos
Típicos	Más específicos
Disnea	Presión venosa yugular elevada
Ortopnea	Reflujo hepatoyugular
Disnea paroxística nocturna	Tercer ruido
Baja tolerancia al ejercicio	Impulso apical desplazado lateralmente
Fatiga, cansancio	Soplo cardiaco
Inflamación de tobillos	
Menos típicos	Menos específicos
Tos nocturna	Edema periférico (tobillos, sacro, escrotal)
Sibilancias	Crepitantes
Aumento de peso (>2kg/semana)	Menor entrada de aire y matidez a la percusión en bases pulmonares
Sensación de hinchazón	Pulso irregular
Pérdida de apetito	Taquipnea (>16 rpm)
Confusión (especialmente en ancianos)	Hepatomegalia
Depresión	Ascitis
Palpitaciones	Caquexia
Síncope	

Los criterios clínicos de Framingham (CCF), presentados en 1971³ son los de uso más aceptado para el diagnóstico de insuficiencia cardíaca. Para establecerlo, se precisa el cumplimiento de 2 criterios mayores o 1 mayor y 2 menores. Estos criterios se muestran en la tabla 3.

TABLA 3. Criterios clínicos de Framingham para el diagnóstico de IC.

MAYORES	MENORES	MAYORES O MENORES
<ul style="list-style-type: none"> • Disnea paroxística nocturna • Distensión venosa yugular • Crepitantes • Cardiomegalia • Edema agudo de pulmón • Galope por s3 • Presión venosa yugular >16 cm h2O • Reflujo hepatoyugular 	<ul style="list-style-type: none"> • Edema en EEII • Tos nocturna • Disnea de esfuerzo • Hepatomegalia • Derrame pleural • Disminución de la capacidad vital en 1/3 de lo habitual • Taquicardia (> o = 120 lpm) 	<p>Pérdida de peso >o = de 4,5 kg de peso tras 5 días de tratamiento</p>

Exploraciones complementarias

A. Electrocardiograma

Se debe realizar un electrocardiograma (ECG) a todos los pacientes con sospecha de IC, dado que los cambios electrocardiográficos son frecuentes en estos pacientes. Un ECG anormal tiene poco valor predictivo para determinar la presencia de IC². Si el ECG es completamente normal, especialmente los parámetros relativos a la función sistólica, la presencia de IC es poco probable (< 10%).²

B. Radiografía de tórax

La radiografía de tórax es de uso limitado en el estudio clínico diagnóstico de los pacientes con sospecha de IC¹. Su utilidad reside en la identificación de una explicación pulmonar alternativa para los síntomas y signos del paciente. Es importante tener en cuenta que

puede haber una disfunción sistólica significativa del ventrículo izquierdo sin cardiomegalia en la radiografía torácica.¹

C. Pruebas de laboratorio

Un examen sistemático completo del paciente con sospecha de IC incluye un hemograma completo (hemoglobina, leucocitos y plaquetas), electrolitos séricos, creatinina sérica, tasa de filtración glomerular estimada (TFG), glucosa, pruebas de la función hepática y análisis de orina.

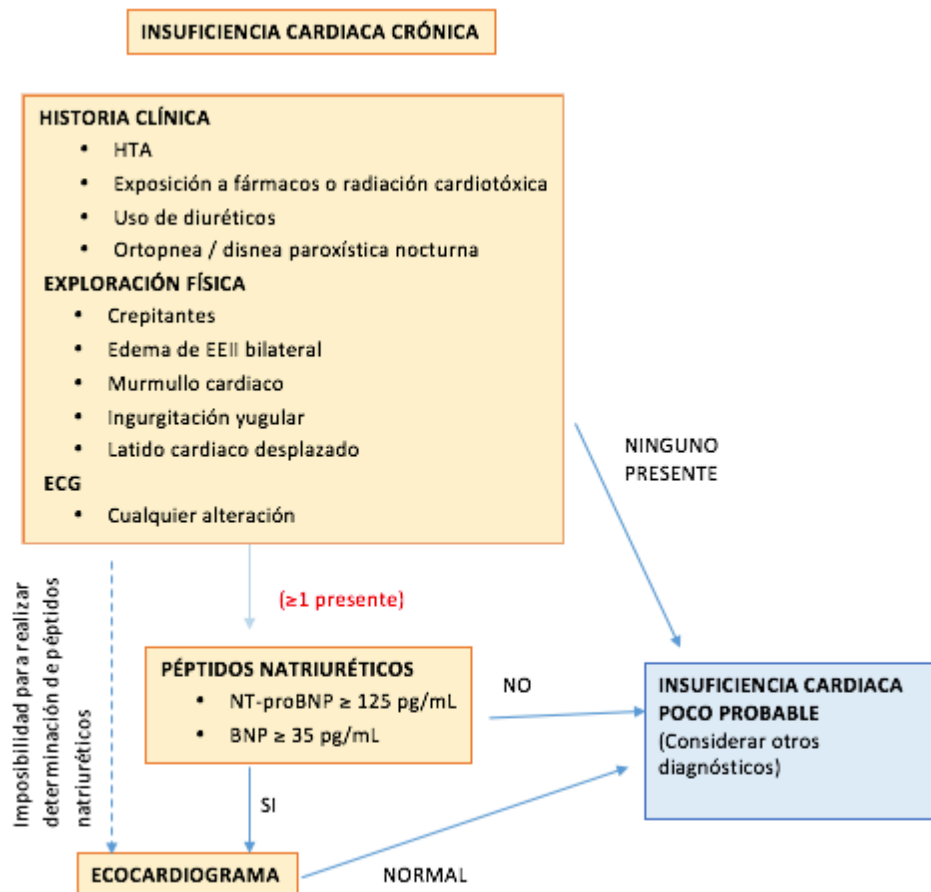
Péptidos natriuréticos

Los péptidos natriuréticos son biomarcadores útiles en el diagnóstico de la IC y en el manejo de los pacientes con IC crónica establecida, que se elevan con el aumento de estrés de la pared miocárdica. La evidencia disponible respalda su uso en el diagnóstico y en la planificación de las distintas fases de tratamiento, a la hora de tomar decisiones respecto a ingresos y altas hospitalarias y en la identificación de pacientes con riesgo de complicaciones clínicas¹⁷. Los péptidos usados con más frecuencia son el péptido natriurético tipo B (BNP) y la fracción aminoterminal de propéptido natriurético tipo B (NT-pro-BNP).

La concentración plasmática de estos péptidos puede ser usada como prueba diagnóstica inicial, especialmente en los episodios no agudos cuando el ecocardiograma no está disponible de inmediato. Los niveles elevados de péptidos natriuréticos identifican a aquellos pacientes que necesitarán una investigación de la función cardíaca más detallada; por otra parte, los pacientes con niveles por debajo del punto de corte que establece disfunción cardíaca importante no necesitarán la realización de un ecocardiograma¹⁶.

Una concentración plasmática normal de péptidos natriuréticos en un paciente sin tratar tiene un alto poder predictivo de exclusión de la enfermedad¹⁶, por lo tanto, en estos casos la IC es una causa poco probable de los síntomas. Una concentración elevada de péptidos natriuréticos, pese a tratamiento óptimo, indica un mal pronóstico.²

FIGURA 1. Algoritmo para el diagnóstico de la IC con péptidos natriuréticos en pacientes sin tratar con síntomas de insuficiencia cardiaca²



Troponinas. Ante la sospecha de IC y cuando el cuadro clínico indique un síndrome coronario agudo (SCA), se determinarán las troponinas I o T². El aumento de troponinas cardíacas es un indicador

de necrosis de miocitos, en cuyo caso, y si está indicado, debe considerarse la posibilidad de revascularización, para lo cual se realizarán las pruebas diagnósticas necesarias ². Además del síndrome coronario agudo, la miocarditis aguda produce también un aumento de las troponinas que también puede observarse en modo ligero en los pacientes con IC grave o durante episodios de IC descompensada, así como en la sepsis ².

D. Ecocardiografía

El ecocardiograma ofrece información inmediata de los volúmenes de la cámara, las funciones diastólica y sistólica ventriculares, el grosor de la pared y la función valvular, información crucial para determinar el tratamiento adecuado.¹ La confirmación del diagnóstico de IC o disfunción cardíaca mediante ecocardiografía es imprescindible y debe realizarse con prontitud ante la sospecha de IC ².

E. Pruebas no invasivas adicionales

Se realizarán pruebas no invasivas adicionales, como resonancia magnética cardíaca (RMC), tomografía computarizada (TC) o gammagrafía cardíaca, en pacientes en los que la ecocardiografía en reposo no proporcione suficiente información y en aquellos con sospecha de enfermedad coronaria².

Insuficiencia cardíaca aguda

La insuficiencia cardíaca aguda (ICA) hace referencia a la aparición brusca o empeoramiento de síntomas y/o signos de IC. Se trata de una condición clínica que amenaza la vida del paciente y que requiere por tanto una evaluación y tratamiento rápidos, normalmente precisando ingreso hospitalario urgente.

La ICA puede presentarse *de novo* o, más frecuentemente, como consecuencia de la descompensación aguda de la ICC. Puede ser causada por disfunción cardíaca primaria o ser precipitada por factores extrínsecos.

La disfunción miocárdica aguda (isquémica, inflamatoria o tóxica), la insuficiencia valvular aguda o el taponamiento cardiaco están entre las causas agudas más frecuentes de ICA.

La descompensación que tiene lugar en la ICC ocurre con frecuencia debido a uno o más factores extrínsecos, como las infecciones respiratorias, hipertensión incontrolada, arritmias o la falta de adherencia al tratamiento¹⁹.

Disfunción endotelial e insuficiencia cardiaca

Un nuevo paradigma ha emergido en los últimos años en relación a nuestra comprensión sobre la fisiopatología de la IC-FEP en contraposición a la IC-FER.

La disfunción endotelial se define como una serie de alteraciones que afectan a la síntesis, liberación, difusión y degradación de los diferentes factores derivados del endotelio y constituye un reconocido fenómeno de aparición precoz en diversas enfermedades cardiovasculares²⁰. Este conjunto de alteraciones conllevan a una pérdida del papel protector de la homeostasis vascular²⁰.

Diversos estudios han demostrado que la disfunción endotelial está involucrada en la patogénesis de la IC, especialmente en la IC-FEP^{21,22,23, 24, 25, 26} y constituye un factor pronóstico de futuros eventos adversos cardiovasculares²⁹. Esta disfunción se relaciona asimismo con el estado de inflamación sistémica que presentan los pacientes con condiciones que implican un riesgo metabólico - como la diabetes, HTA, o la obesidad- que habitualmente están presentes en los sujetos con IC-FEP²⁴.

La disfunción del endotelio provoca alteraciones en el cardiomiocito, la aparición de un remodelado concéntrico del ventrículo izquierdo y disfunción predominantemente diastólica²⁶. Además, en la IC-FEP, la disfunción endotelial también se relaciona estrechamente con la sintomatología, la capacidad funcional²⁷ y con la hipertensión pulmonar²⁸.

La activación de la cascada neuroendocrina es un hecho común en la IC (tanto con FEP como FER) que juega un papel fundamental en el remodelado patológico ventricular y la clínica resultante²⁶. Por consiguiente, el uso de los antagonistas del sistema R-A-A y del sistema adrenérgico han resultado efectivos a la hora de mejorar la supervivencia de los pacientes con IC-FER. De igual manera, aunque la disfunción endotelial tiene lugar en ambos tipos de IC, tiene un papel más determinante en la IC-FEP. Esta distinción resulta clave dado que esta alteración endotelial puede constituir una diana para las nuevas estrategias terapéuticas de la IC-FEP, que actualmente carece de terapias que mejoren la supervivencia²⁶.

La disfunción endotelial también afecta al territorio pulmonar, que constituye un determinante fundamental de la postcarga del ventrículo derecho (y que por tanto determina su salida de sangre).

*Siemsen et al*³⁰ demuestran en un estudio realizado en 2016 cómo la respuesta inflamatoria que aparece tras una infección por *P. Jirovecii* puede producir una disfunción endotelial a base de alteraciones en la concentración y función de agentes vasoactivos (fundamentalmente aumento de la respuesta a la endotelina-1, un importante agente vasoconstrictor pulmonar y una marcada disminución de la producción de adrenomedulina, vasodilatador). Estos cambios provocan alteraciones sustanciales en el tono de los vasos pulmonares, causando una remodelación vascular y aumento de las resistencias que pueden ser claves en el inicio de la hipertensión pulmonar³⁰, evento que aparece frecuentemente en los pacientes con IC.

PNEUMOCYSTIS JIROVECII

Pneumocystis jirovecii, anteriormente conocido como *Pneumocystis carinii* f.sp *hominis*, continúa siendo uno de los patógenos oportunistas más importantes que afectan a individuos con SIDA y pacientes con inmunodepresión debida a otras causas, en los que produce una neumonía (*Pneumocystis carinii* Pneumonia o PcP, sus siglas en inglés) grave y con una alta tasa de morbilidad y mortalidad⁴.

Taxonomía

La clasificación taxonómica de *Pneumocystis* ha sido problemática desde su descubrimiento y ha cambiado a lo largo de los años, debido gran parte a la imposibilidad para su cultivo *in vitro*⁴. Tras su identificación y durante muchos años fue considerado un protozoo pero, gracias a la utilización de técnicas de biología molecular se ha podido establecer que es un hongo atípico, que no crece en los medios de cultivo habituales ni responde a los tratamientos clásicos frente a hongos⁴.

Inicialmente se pensaba que había una sola especie de *Pneumocystis* que infectaba a todos los mamíferos y, por tanto, se creía que la neumonía por *Pneumocystis carinii* (PCP) en la especie humana podía ser una zoonosis y que cualquiera de los mamíferos con los que puede cohabitar el hombre de forma habitual podía ser su reservorio. Sin embargo, el estudio comparativo del DNA de aislados de *Pneumocystis* procedentes de diferentes mamíferos ha demostrado que se trata de especies distintas. Esta alta especificidad entre el huésped y el microorganismo que lo infecta es lo que se denomina estenoxenismo⁵. Este hecho ha motivado un cambio de denominación de la especie de *Pneumocystis* que infecta a los seres humanos, que ha pasado a denominarse *Pneumocystis jirovecii*, y la denominación de *Pneumocystis carinii* ha quedado reservada para la especie causante de las infecciones en ratas⁵. Por tanto, la PCP no es una zoonosis, como se creía, sino una antroposis (reservorio exclusivamente humano).⁵

Epidemiología y reservorio

Pneumocystis jirovecii es un hongo atípico, extracelular, ubicuo, unicelular, no cultivable y con un marcado estenoxenismo. Normalmente se encuentra restringido a los pulmones, aunque se ha demostrado su presencia en otras regiones del cuerpo⁴.

El DNA de *Pneumocystis* ha sido detectado en muestras ambientales pero nunca se ha podido visualizar la presencia de organismos completos con

técnicas microscópicas, por lo que no se ha encontrado ningún reservorio ambiental.

Un estudio realizado con 50 personas que no presentaban enfermedad pulmonar de base ni inmunosupresión demostró, mediante la técnica de PCR, que el DNA de *Pneumocystis jirovecii* se encontraba en el 20% de los casos, siendo todos ellos asintomáticos, VIH-, y con un recuento linfocitario normal. Este estudio proporcionó la primera evidencia de que *Pneumocystis jirovecii* puede encontrarse en el tracto respiratorio de adultos inmunocompetentes, lo que apoya la hipótesis de que la población general puede ser reservorio y fuente de infección de esta patología¹³.

Diversos estudios serológicos muestran que se encuentran anticuerpos específicos contra el patógeno en la mayoría de los niños a una edad temprana.¹⁴ En un estudio realizado con 233 niños españoles, se concluyó que la seroprevalencia era del 73%, demostrándose un incremento de hasta el 80% en niños de 13 años de edad⁸. A partir de este hallazgo, se ha pensado durante largo tiempo si la PcP era resultado de una activación de la infección latente adquirida durante la infancia. Sin embargo, estudios han demostrado que con frecuencia el patógeno es eliminado por el organismo tras la infección, demostrando que la persistencia de la infección latente es un hecho limitado.¹⁴ La reciente demostración de la transmisión vía transplacentaria de *P. Jirovecii* apoyaría la tesis de que la infección primaria se adquiere en la infancia, y que los niños suponen un importante reservorio del patógeno, dado que pueden permanecer colonizados hasta que su sistema inmune madura¹⁴.

Prevalencia e incidencia

Hasta 1980 la PcP no era frecuente y se asociaba a síndromes de inmunodeficiencia o situaciones de intensa inmunosupresión. Durante la pandemia del VIH, la neumocistosis emergió como la enfermedad más común definitoria de SIDA en países industrializados.⁴

Gracias a la terapia antiretroviral actual (TARGA) ha existido una disminución muy importante de PcP, hasta presentar en la actualidad una incidencia de 9.5 episodios por 100 personas al año en VIH+, observándose en más de un 50% de los pacientes con SIDA.⁴

A día de hoy la neumocistosis ha adquirido una importancia creciente especialmente en sujetos inmunodeprimidos no infectados con el VIH, como pacientes con cáncer, hemopatías malignas, afecciones inflamatorias crónicas donde se utilizan fármacos inmunosupresores y receptores de trasplante de cualquier tipo. La incidencia de la enfermedad entre estos grupos de pacientes puede alcanzar hasta el 40%.⁴

Colonización por *Pneumocystis Jirovecii*

La identificación del microorganismo por métodos moleculares como la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) ha permitido demostrar la presencia del patógeno en diferentes muestras biológicas sin manifestaciones clínicas ni radiológicas de neumonía, situación que ha sido denominada como colonización⁵. Este hecho ha revolucionado la epidemiología de la PcP porque estas personas podrían actuar como reservorio del microorganismo y transmitirlo a otros individuos susceptibles⁴.

La colonización se ha observado en distintos grupos poblacionales:

- Pacientes con la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)⁵
- Pacientes con enfermedades pulmonares crónicas: se ha descrito una prevalencia de colonización en torno al 40% en los casos de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)⁹ y del 21,5% en los casos de fibrosis quística (FQ)¹⁰
- El personal sanitario constituye otro grupo de población que ha sido motivo de estudio para la colonización por *Pneumocystis*. El primer trabajo sobre el tema no logró detectar la presencia de *P. Jirovecii* en el lavado orofaríngeo de una pequeña muestra de profesionales en contacto con pacientes con PCP¹⁵. Sin embargo, posteriormente se han realizado diversos estudios en los que se han utilizado técnicas de recogida como el frotis nasal, aspirado nasal y esputo inducido que han

comprobado la existencia de colonización transitoria en profesionales sanitarios, como médicos y enfermeras, que trabajaban en contacto con sujetos con PCP⁵

- En mujeres embarazadas, un estudio describió una prevalencia del 15% en un estudio de 33 gestantes en el tercer trimestre de embarazo. Esta colonización se ha relacionado con alteraciones de la inmunidad celular y humoral que tienen lugar en este periodo.⁵

Mecanismo de transmisión

Se plantean fundamentalmente dos hipótesis: la reactivación de un foco latente del microorganismo en el cuerpo humano o la adquisición reciente de la infección. Actualmente los estudios abogan por la segunda opción⁴.

El modo exacto de transmisión no ha sido del todo esclarecido, pero se propone un modelo de transmisión similar al de *Mycobacterium Tuberculosis*, siendo la vía aérea el vehículo, adquiriéndose la infección mediante gotitas de *Pflugge* que contendrían las formas tróficas del parásito⁴.

Como ya se ha comentado anteriormente, recientemente se ha publicado la primera evidencia molecular de la existencia de transmisión transplacentaria en humanos¹¹.

Diagnóstico

Ante la ausencia de un sistema de cultivo *in vitro* para *Pneumocystis jirovecii*, la base para el diagnóstico se basa en la visualización del patógeno con tinciones histoquímicas o inmunofluorescentes en diferentes muestras biológicas, siendo las más utilizadas los lavados broncoalveolares (LBA), el esputo y la biopsia transbronquial y pulmonar⁴. Estos métodos son útiles cuando la carga de microorganismo es relativamente alta pero es insuficiente para una detección fiable cuando hay una pequeña cantidad de parásito, por lo que no son adecuados para la detección del microorganismo en cuanto a la situación de colonización, para la que se requieren técnicas moleculares más sensibles y específicas⁴.

Actualmente se considera que el diagnóstico mediante métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) es más sensible y específico que los métodos de tinción¹². Estas técnicas tan sensibles son capaces de detectar muy bajas concentraciones de *P. Jirovecii*, que no serían detectables con las técnicas convencionales, a partir de muestras de esputo. Actualmente se considera que la detección de *Pneumocystis jirovecii* o su DNA en muestras respiratorias de individuos sin síntomas ni signos de neumonía representa colonización del organismo y va aumentando la evidencia que sugiere que este grupo de sujetos podrían ser trascendentales en la transmisión persona-persona de *Pneumocystis*.

Pneumocystis Jirovecii en EPOC

Diversos estudios han demostrado la alta prevalencia de colonización por *P. Jirovecii* en pacientes con enfermedades pulmonares crónicas, especialmente en el EPOC²⁹. La tasa de colonización se estima en un porcentaje que varía entre el 16 y el 55%³⁰, según las técnicas de detección utilizadas y el área geográfica, ya que la infección por este microorganismo está aparentemente relacionada con factores ambientales y probablemente existen zonas de alto y bajo riesgo³⁰.

Se ha demostrado que el cese del tabaco disminuye de manera significativa la reducción del FEV que presentan estos pacientes. Sin embargo, las alteraciones que tienen lugar en el espacio aéreo no se ralentizan con el cese del tabaco, y los procesos inflamatorios permanecen presentes en la vía aérea y en la circulación de pacientes con EPOC. Esto sugiere que hay factores que aumentan o mantienen el proceso inflamatorio crónico una vez que ha sido establecido. En este sentido, la colonización por bacterias del tracto respiratorio bajo o la infección viral latente se han implicado como cofactores que aumentan o mantienen esta respuesta inflamatoria, acelerando la progresión de la enfermedad.

*Calderón et al*³¹ demostraron en su estudio que los pacientes colonizados por el patógeno *Pneumocystis* tienen unos niveles de citoquinas más elevados que los sujetos no colonizados. Esto sugiere que *P. Jirovecii* puede jugar un rol importante en la fisiopatología y progresión de la enfermedad.

Además, en estudios realizados con modelos de animales, se ha demostrado que este microorganismo es capaz de inducir, en las fases más precoces de la infección, cambios en el surfactante pulmonar, degeneración de neumocitos tipo I, hipertrofia de neumocitos tipo II, alteraciones en la permeabilidad alveolocapilar y daño en la difusión alveolar junto con fibrosis pulmonar^{32,33}.

Por otra parte, el estudio de *Morris et al* encontró una asociación entre la colonización por *Pneumocystis* y la gravedad de la obstrucción al flujo aéreo independiente de la historia de hábito tabáquico en pacientes con EPOC³⁴. El estudio no logró demostrar causalidad, pero sugería encarecidamente que la colonización afecta a la progresión de la enfermedad.

Estos hallazgos sugieren que los pacientes colonizados por *P. Jirovecii* con patología pulmonar crónica concomitante podrían representar un problema de salud pública dado que podrían actuar como un reservorio y fuente de infección para otros sujetos susceptibles³⁵.

Por todo esto, son necesarias futuras investigaciones para definir mejor la epidemiología y rol de este patógeno en el curso natural de las enfermedades crónicas pulmonares, y determinar los mecanismos exactos por los que tienen lugar los efectos encontrados.

MICROBIOTA ORAL

Alrededor de 600 especies de bacterias y un número aún indeterminado de hongos conviven en la cavidad oral de los humanos³⁶.

Al constituir una puerta de entrada al tracto aéreo y gastrointestinal, los hongos de la cavidad oral (microbiota) tienen un papel relevante en el estado de salud³⁷.

Recientemente se ha desarrollado un código universal de DNA para la identificación de estos microorganismos, por lo que hasta la fecha aún no existen demasiados estudios centrados en el componente fúngico de la cavidad oral. Mientras se van desarrollando innovadoras técnicas genómicas, las nuevas investigaciones sobre la microbiota humana en diferentes lugares de nuestro organismo han empezado a arrojar luz sobre la complejidad y heterogeneidad de estas comunidades.

*Ghannoun et al*³⁸ investigaron por primera vez en el estudio realizado en 2010 la microbiota oral en sujetos sanos. Encontraron que existe una gran diversidad de hongos que conviven en este espacio, identificando un total de 101 especies tanto cultivables como no cultivables. Los hongos no cultivables representaron un importante porcentaje (36%) del total de identificados.

Entre las especies identificadas, *Candida* era la más prevalente, siendo aislada en el 75% de los participantes, seguida por *Cladosporium* (65%), *Aureobasidium* y *Saccharomycetales* (50% cada una), *Aspergillus* (35%), *Fusarium* (30%) y *Cryptococcus* (20%). El estudio también demostró que existe una gran variabilidad interindividual.

*Dupuy et al*³⁷ encontraron que las especies del género *Malassezia* (conocido patógeno de la piel) tenían una prevalencia muy alta en la microbiota oral. El estudio encontró además 13 nuevas especies que no aparecían en investigaciones previas.

El género *Malassezia* también fue identificado en el esputo de sujetos con fibrosis quística⁴⁰, sugiriendo de esta manera que la cavidad oral podría ser una puerta de entrada para este patógeno en el tracto respiratorio bajo condiciones de desequilibrio del huésped.

Los hongos oportunistas de la cavidad oral interactúan con la flora bacteriana y el huésped para asegurar su supervivencia y desarrollo³⁹. Estas relaciones consisten en uniones de tipo físico, comunicación mediante señales moleculares e intercambios metabólicos durante la adaptación a los múltiples microambientes de la cavidad oral. Las alteraciones en el entorno del huésped

resultan fundamentales para definir la composición de la microbiota y en el desarrollo de enfermedades de etiología fúngica³⁹.

Hasta la fecha, no existe ningún estudio que se haya centrado en investigar la composición de la microbiota de los pacientes con insuficiencia cardíaca.

Por todo ello, en el futuro, el rol que los miembros de la microbiota oral desempeñan en el estado de salud o enfermedad debe ser esclarecido.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La patología pulmonar supone una causa frecuente de descompensación aguda de insuficiencia cardiaca crónica, y dentro de ella, las infecciones del tracto respiratorio.

Recientes estudios relacionan la colonización por *Pneumocystis Jirovecii* con la estimulación de la inflamación pulmonar y el aumento la hiperreactividad bronquial⁴¹.

Por otra parte, se ha demostrado que los pacientes con EPOC tienen una alta tasa de colonización por *Pneumocystis jirovecii*, y que la tasa de colonización se correlaciona con la severidad del EPOC, ya que la presencia de niveles bajos de *Pneumocystis jirovecii* en los pulmones podrían estimular la inflamación pulmonar¹⁸.

De igual manera que en pacientes con EPOC la colonización por *P. Jirovecii* se relaciona con una mayor hiperreactividad bronquial, un aumento del grado de obstrucción bronquial y grado de gravedad de dicha enfermedad, en este estudio se especula acerca de la posible implicación de dicho patógeno en la fisiopatología de la insuficiencia cardiaca.

MATERIAL Y MÉTODOS

OBJETIVOS

- **Objetivo principal**

Determinar la colonización por *Pneumocystis jirovecii* en pacientes con diagnóstico de insuficiencia cardiaca.

- **Objetivos secundarios**

Valorar si existe un cambio en la microbiota oral en los pacientes ingresados.

Valorar si la colonización por *Pneumocystis jirovecii* se relaciona con una mayor tasa de ingresos hospitalarios en pacientes con insuficiencia cardiaca.

Valorar si la colonización por *Pneumocystis jirovecii* en pacientes con insuficiencia cardiaca con fracción de eyección conservada se relaciona con una mayor tasa de descompensación de su patología de base que en pacientes con insuficiencia cardiaca con fracción de eyección disminuida.

METODOLOGÍA

1. Diseño del estudio

Estudio transversal de prevalencia realizado entre los meses de febrero a junio de 2016 sobre una muestra de 36 pacientes diagnosticados de insuficiencia cardiaca del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (HCULB) frente a un grupo de 36 sujetos sanos.

2. Selección de la muestra

Se seleccionaron un número total de 72 sujetos, 36 de ellos con diagnóstico de insuficiencia cardiaca (de los cuales 18 se encontraban ingresados en el HCULB en el momento del estudio y 18 eran pacientes ambulatorios), y 36 sujetos sanos, distribuidos de la siguiente forma:

- 18 pacientes con Insuficiencia Cardiaca con fracción de eyección conservada: 50% mujeres (9), 50% hombres (9)
- 18 pacientes con Insuficiencia Cardiaca con fracción de eyección disminuida: 50% mujeres (9), 50% hombres (9)
- 36 sujetos sanos : 50% mujeres (18), 50% hombres (18)

A los pacientes ambulatorios se les realizó una llamada telefónica previa selección de las historias clínicas de la consulta específica de IC del Servicio de Medicina Interna del HCULB, explicando el motivo del estudio y la invitación a su participación, concertando posteriormente una cita para la realización de la prueba.

Los pacientes ingresados en el HCULB fueron seleccionados o bien del servicio de Medicina Interna o bien del servicio de Cardiología.

Finalmente, los individuos sanos fueron elegidos de los donantes voluntarios del Banco de Sangre y Tejidos de Aragón.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- Pacientes con cuadro clínico compatible con diagnóstico de insuficiencia cardiaca.
- Pruebas complementarias realizadas compatibles con el diagnóstico de IC:
 - Ecocardiograma

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- Edad > de 90 años
- Edad < de 18 años
- VIH +

Recogidos desde el 5 de abril de 2016 hasta el 6 de mayo de 2016.

Todos los pacientes incluidos en el estudio fueron informados sobre la metodología del estudio y aceptaron su inclusión en el mismo.

3. Variables utilizadas en el estudio

A. Datos recogidos (incluidos demográficos):

- Edad
- Género
- Ingresos hospitalarios previos (en los últimos 5 años)
- Historia de tabaquismo
- Antecedentes personales: historia de EPOC o asma

B. Analítica general incluyendo pro-BNP, situación de inmunocompetencia, cistatina, etc.

C. Ecocardiograma transtorácico: determinación de la fracción de eyección

D. Determinación de la colonización por Pneumocystis jirovecii mediante PCR

4. Obtención de la muestra para su análisis

A todos los sujetos se les realizó un enjuague orofaríngeo con 10 mL de suero fisiológico durante 1 minuto. Las muestras recogidas fueron conservadas

en frío y posteriormente centrifugadas en el laboratorio a 2500 rpm durante 10 minutos a 4°C. Una vez descartado el sobrenadante se congeló el pellet hasta su posterior envío al Hospital Virgen del Rocío de Sevilla, donde se llevó a cabo la identificación de la presencia de *Pneumocystis jirovecii* mediante la técnica de PCR, determinando si existía colonización por dicho microorganismo en sujetos sin manifestaciones clínicas ni radiológicas de neumonía.

Determinaciones moleculares:

-Extracción de DNA: Después de la digestión por proteinkinasa a 56°C, durante 4 horas, el ADN de *P. jirovecii* se extrae de las muestras respiratorias, usando el Kit comercial: QIAmp DNA commercial Kit (Qiagen, Hilden, Alemania).

-Análisis de PCR de mt LSU rRNA por PCR:

Se realizó mediante un protocolo que incluía dos rondas de amplificación.

1. En la primera ronda de amplificación, se utilizan los cebadores externos

pAZ102-E (5'-GAT GGC TGT TTC CAA CCG CA-3') pAZ102-H (5'-GTG TAC GTT GCA AAG TAC TC-3')
--

Esto produce un fragmento de 346 pares de bases (pb). La mezcla de PCR se preparó para un volumen final de 25 µl, que incluía:

- 3µl del DNA extraído de cada alícuota
- 2.5 µl de NH 4 reaction Buffer 10x (Bioline),
- 0.25 µl de Taq (BioTaq DNA pol. 5U/ µl de Bioline),
- 0,5 µl de una mezcla de nucleótidos trifosfato (1µM de cada dNTP),
- 0.5 µl de cada cebador (concentración de 20 µM cada uno)

- 0.75 µl de MgCl₂ 50mM.

Esta ronda se realizó en un total de 35 ciclos: desnaturalización (1 ciclo) a 94 °C durante 5 min, hibridación (35 ciclos) a 92°C x 30 seg seguido a 55°C x 30 segundos y 72° C durante 2 min y una fase de extensión final a 72°C durante 5 minutos.

2. En la segunda ronda de amplificación se utilizaron los cebadores internos

pAZ102-X (5''-TAC GTG AAA AAA TCG CAG TAG G-3'') pAZ102-Y (5''-TCA TCA CTT AAT AAT TGG GGA GC -3'')
--

Se obtuvo un producto 260 pb. La mezcla de PCR para esta ronda se preparó para un volumen final de 50 µl, que incluían:

- 5µl de ADN extraído.
- 5 µl de NH₄ reaction Buffer 10x (Bioline),
- 0.5 µl de Taq (BioTaq DNA pol. 5U/ µl de Bioline),
- 1 µl de una mezcla de nucleótidos trifosfato (1µM de cada dNTP),
- 1.2 µl de cada cebador a una concentración de 20 µM cada uno
- 1.5 µl de MgCl₂ 50mM.

Esta ronda se realizó en un total de 40 ciclos: desnaturalización (1 ciclo) a 94 °C durante 5 min, hibridación (40 ciclos) a 92°C x 30 seg; a 55°C x 30 segundos y 72° C x 2 min y fase de extensión final a 72°C durante 5 minutos.

Los productos de ambas reacciones, PCR primaria y PCR anidada, se revelaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% que contenía bromuro de etidio y las bandas se

visualizaron mediante luz ultravioleta.

Para evitar falsos positivos debido a contaminación, en todas las etapas se utilizaron puntas de pipeta con filtro. La extracción de ADN, preparación de la mezcla de reacción, amplificación por PCR y detección se realizaron en distintos recintos. Para detectar la posible contaminación cruzada, todas las reacciones de PCR llevaban como control negativo H₂O estéril.

5. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS (versión 20.0).

En primer lugar se llevó a cabo un análisis descriptivo de las variables a estudio. Para las variables cualitativas se calcularon las frecuencias relativas y absolutas, y para las variables cuantitativas se calcularon la media, la desviación estándar y el mínimo y máximo.

Aplicando el test de Kolmogorov-Smirnov se determinaron aquellas variables que no se ajustaban a la normalidad. Se estableció el nivel de significación estadística para un p valor <0.05.

Se utilizó el test de U de Mann Whitney como prueba no paramétrica para comparar las variables cualitativas, y la T de Student como prueba paramétrica para las variables cuantitativas.

El análisis de las variables cualitativas que se ajustaban a la normalidad fue llevado a cabo mediante chi-cuadrado.

Mediante el coeficiente de correlación de Spearman se analizó la asociación entre las variables cuantitativas. Por último, el test de *Kruskall-Wallis* fue utilizado para las variables cualitativas no dicotómicas.

6. Consideraciones éticas

Todos los individuos participaron de un modo voluntario tras obtenerse el correspondiente consentimiento informado (ANEXO 1)

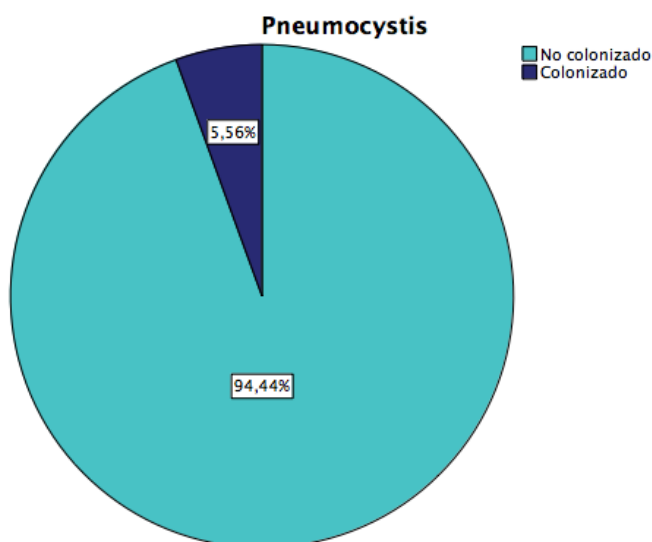
De acuerdo a la normativa del HCULB se utilizó el “procedimiento de solicitud y autorización de estudios de investigación en el sector III” (ANEXO 2)

RESULTADOS

ESTUDIO DE LA MICROBIOTA FARÍNGEA: COLONIZACIÓN POR PNEUMOCYSTIS JIROVECII

Cuando fueron comparados los casos de IC con los controles sanos, pareados por edad y género, únicamente se demostró la existencia de colonización de la microbiota faríngea por PJ en un paciente con IC (1,49%) y en 3 de los sujetos sanos (4,17%).

Figura 2. Porcentaje total de colonizados por P. Jirovecii



A continuación se muestra el comparativo entre el grupo de sujetos sanos (control) frente al grupo de pacientes con insuficiencia cardiaca (casos). La figura 3 muestra el resultado de manera gráfica.

De estos datos se concluye que no existe una mayor colonización por *P. Jirovecii* en pacientes con insuficiencia cardiaca ($p > 0,05$)

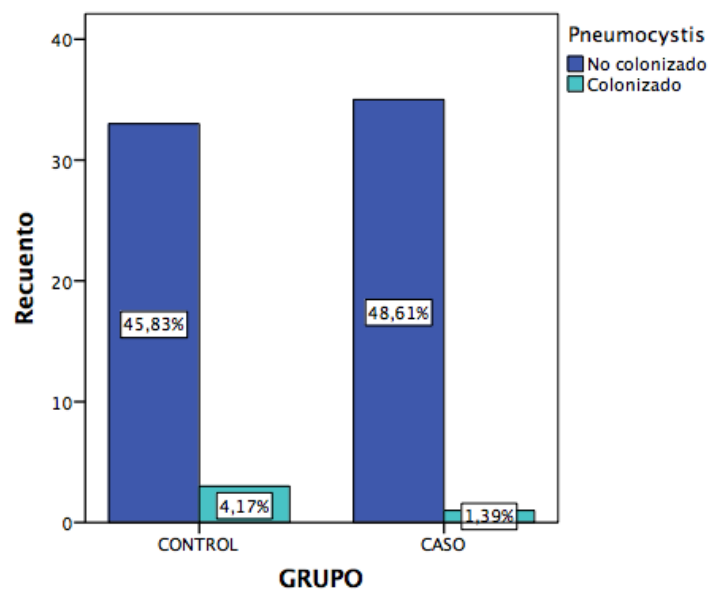
Tabla 1. Chi-cuadrado para Pneumocystis

		Pneumocystis		Total
		No colonizado	Colonizado	
GRUPO	CONTROL	33	3	36
	CASO	35	1	36
Total		68	4	72

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	1,059 ^a	1	,303		
Corrección por continuidad ^b	,265	1	,607		
Razón de verosimilitudes	1,105	1	,293		
Estadístico exacto de Fisher				,614	,307
Asociación lineal por lineal	1,044	1	,307		
N de casos válidos	72				

a. 2 casillas (50,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 2,00.

Figura 3. Colonización por *P. Jirovecii* en pacientes con insuficiencia cardiaca frente a sujetos sanos



PACIENTES

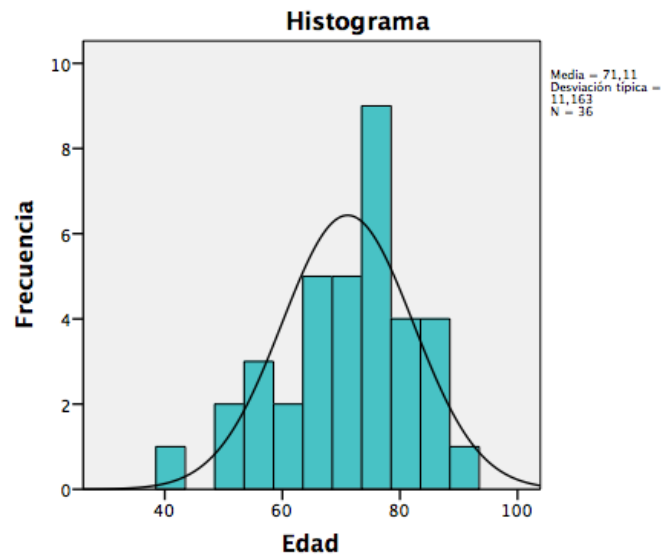
De un total de 36 pacientes incluidos en el estudio, 18 eran mujeres (50%) y 18 hombres (50%).

Del total de la muestra, 18 (50%) tenían una FE conservada y 18 (50%) una FE deprimida.

Además, 18 (50%) se encontraban ingresados en el momento del estudio y 18 (50%) eran pacientes ambulatorios.

La edad media del total de sujetos fue de 71 (± 11) años (mínimo 41 y máximo 89 años). La figura 4 muestra la distribución de la edad, que se ajusta a la normalidad.

Figura 4. Distribución de la edad



A continuación se muestran una serie de gráficos que representan el porcentaje total de pacientes según las variables: hábito tabáquico, diagnóstico de EPOC, asma, y clase funcional.

Figura 5. Distribución según la frecuencia de fumadores

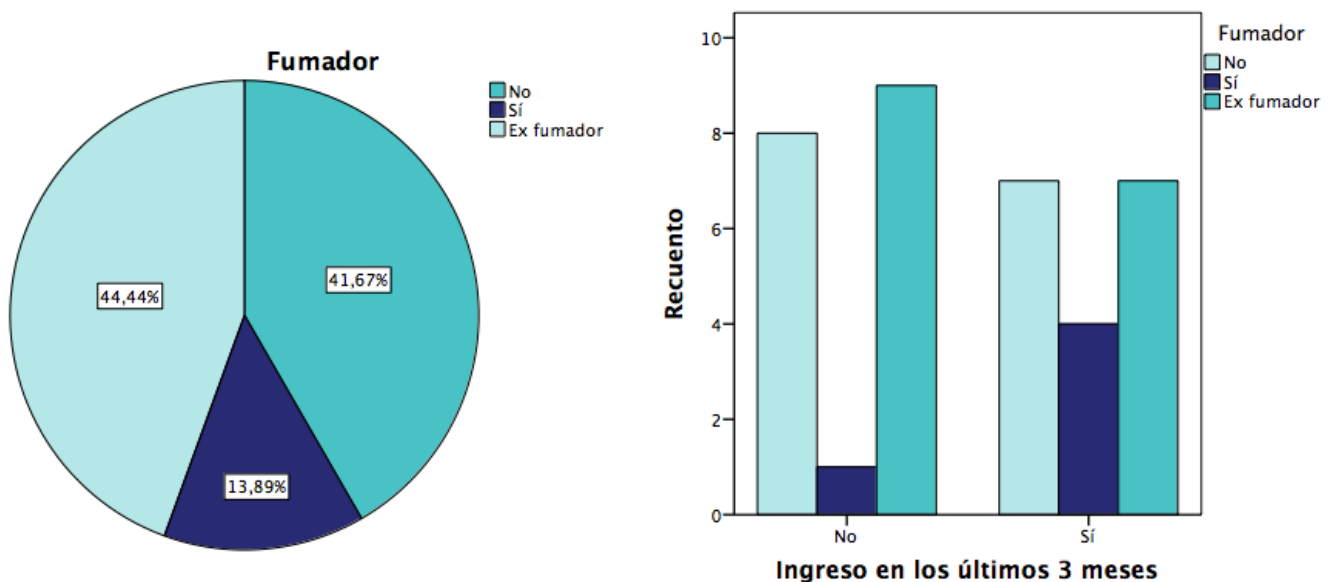


Figura 6. Distribución según la frecuencia de EPOC

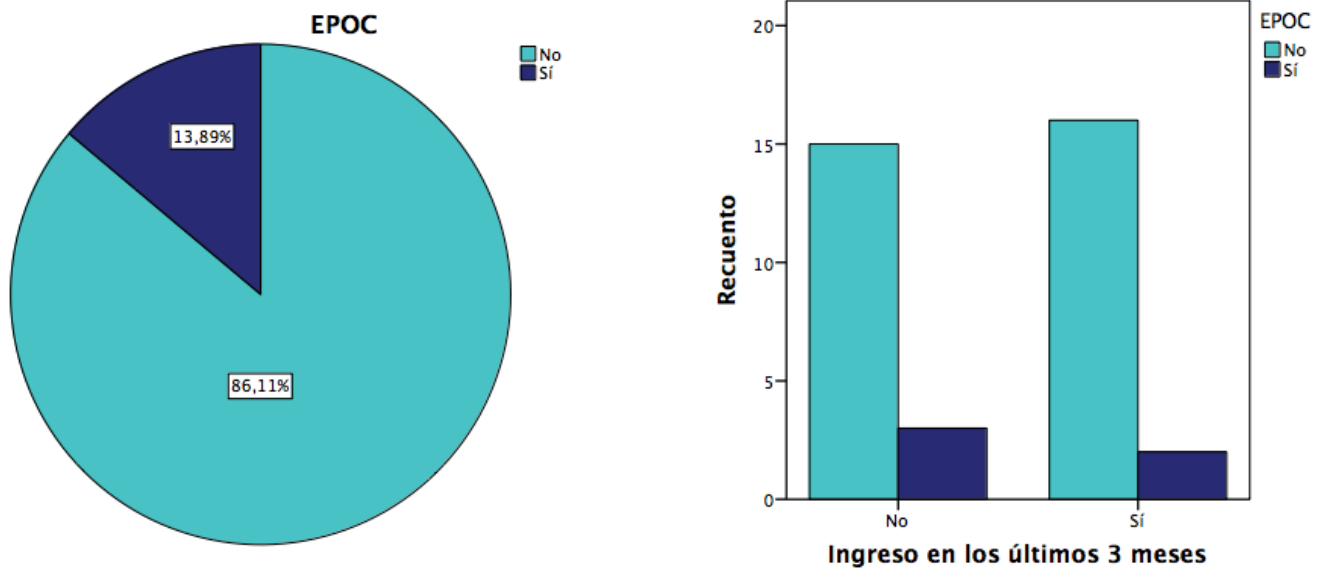


Figura 7. Distribución según la frecuencia de asma

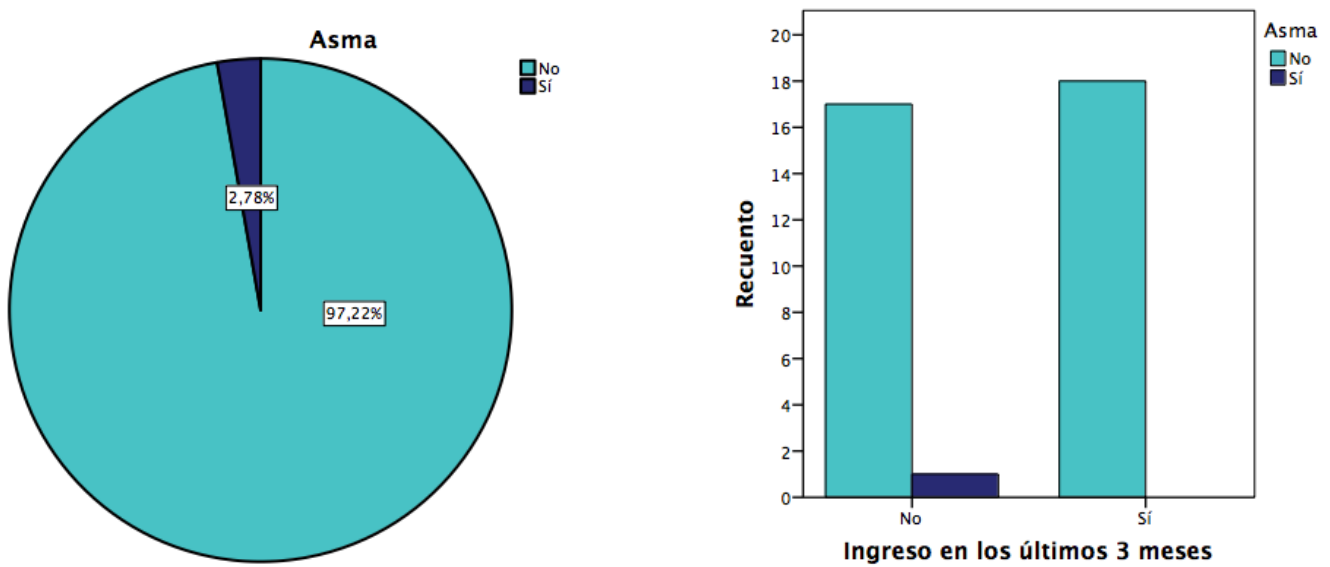
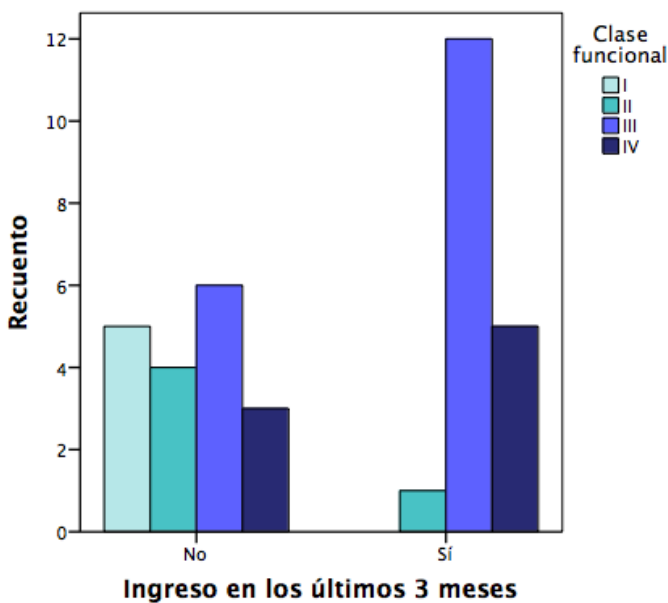
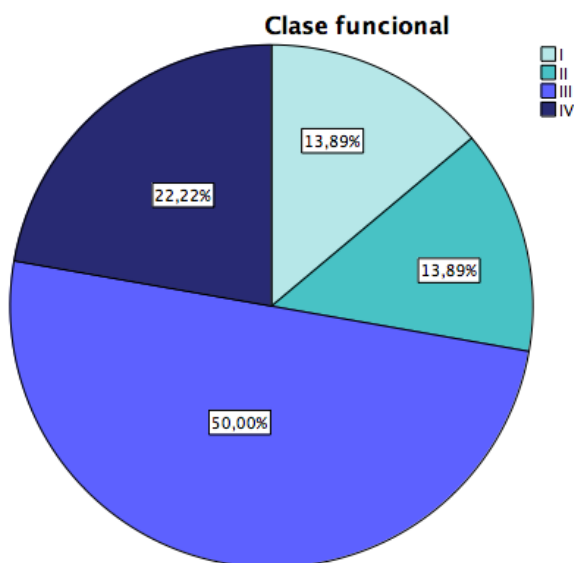


Figura 8. Distribución de la frecuencia según la clase funcional



ESTUDIO DEL PÉPTIDO NT-proBNP

Comparando el valor del NT-proBNP con las variables ingreso actual, FE y género se encontraron los siguientes resultados:

- En los sujetos ingresados, la media del NT-proBNP fue de 5006,34 pg/ml. En los sujetos no ingresados la media se situó en 2032,27pg/ml. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0.05$) (ver tabla 2), por lo que se concluye que el valor del péptido natriurético no variaba en función de la situación hospitalaria de los sujetos.
- Los pacientes con una FE conservada presentaban una media de 2292,36 pg/ml, mientras que en los pacientes con FE deprimida la media fue de 5945,5 pg/ml. Estas diferencias sí fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$) (ver tabla 3) lo que indicaba que los pacientes con FE deprimida tenían valores de NT-proBNP superiores a aquellos que conservaban su FE.
- Comparado por género, la media del NT-proBNP en las mujeres fue de 5742,13 pg/ml, mientras que los varones tuvieron una media de 2483,77

pg/ml. Las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0.05$) (ver tabla 4), por lo que el péptido natriurético no se relacionó con el género de los pacientes.

A continuación se muestran los resultados de manera gráfica.

Tabla 2. Test de U de Mann Whitney para el ingreso

Estadísticos de contraste ^a	
	NT-proBNP
U de Mann-Whitney	107,000
W de Wilcoxon	227,000
Z	-1,012
Sig. asintót. (bilateral)	,311
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	,325 ^b

a. Variable de agrupación: Ingreso en los últimos 3 meses

Figura 9. Diferencias entre las concentraciones del NT-proBNP en pacientes ingresados y no ingresados

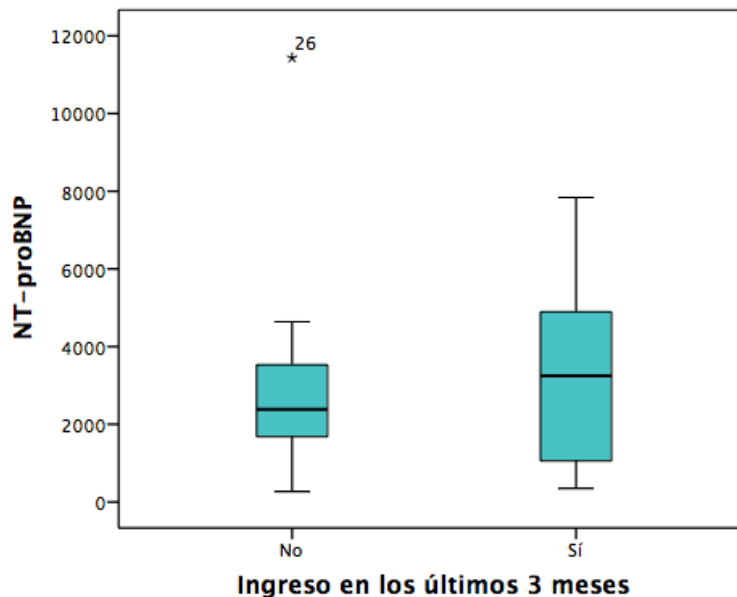


Tabla 3. Test de U de Mann-Whitney para la FE

Estadísticos de contraste^a

	NT-proBNP
U de Mann-Whitney	73,000
W de Wilcoxon	226,000
Z	-2,269
Sig. asintót. (bilateral)	,023
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	,023 ^b

a. Variable de agrupación: FE

Figura 10. Diferencias entre las concentraciones del NT-proBNP en pacientes con FE conservada y pacientes con FE deprimida

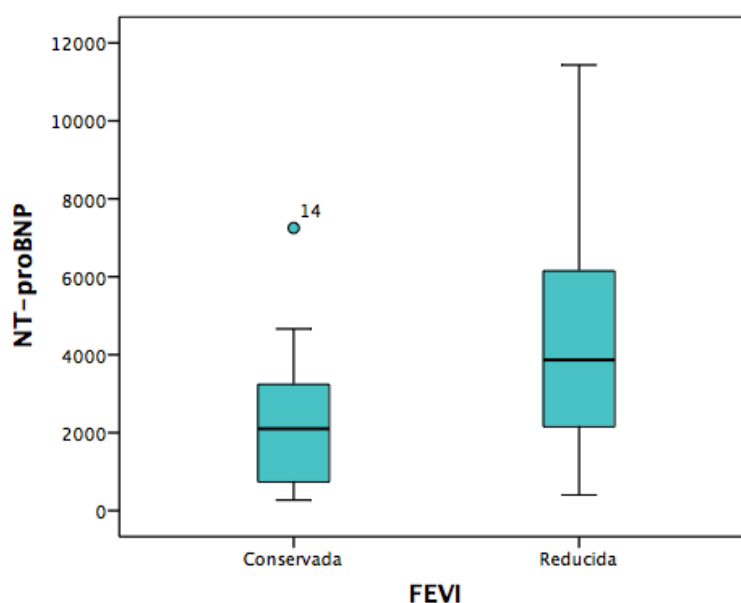
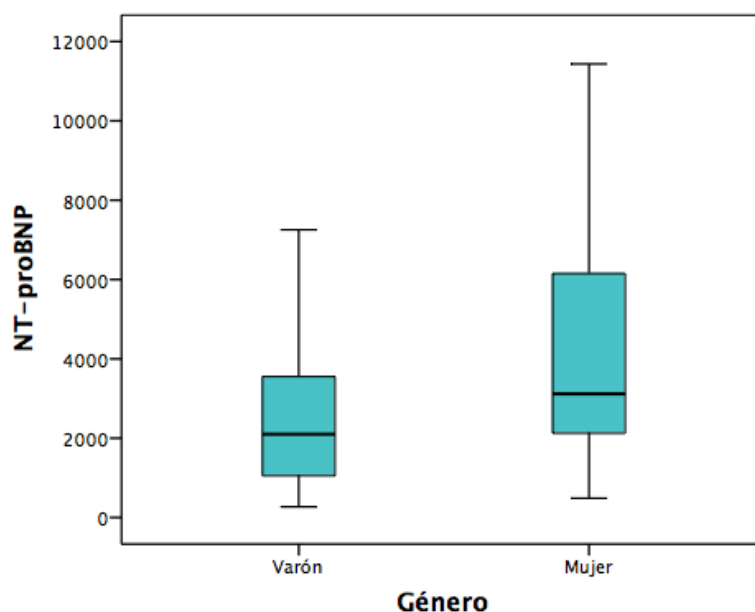


Tabla 4. Test de U de Mann-Whitney para el género

Estadísticos de contraste ^a	
	NT-proBNP
U de Mann-Whitney	87,000
W de Wilcoxon	240,000
Z	-1,765
Sig. asintót. (bilateral)	,078
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	,081 ^b

a. Variable de agrupación: Género

Figura 11. Diferencias entre las concentraciones del NT-proBNP en hombres y mujeres.



EVALUACIÓN DE LOS PACIENTES SEGÚN EL NÚMERO DE INGRESOS EN LOS ÚLTIMOS 5 AÑOS

Comparando el número de ingresos en los últimos 5 años con las variables NT-proBNP, género, edad y FE se encontraron los siguientes resultados:

- El número de ingresos previos y el valor del NT-proBNP estaban inversamente relacionados (coeficiente de correlación = -0.417) ($p < 0.05$). Esto indica que los pacientes con un mayor número de ingresos previos presentaban concentraciones inferiores de péptido natriurético (ver tabla 5)
- El número de ingresos y la edad no guardaron relación estadística ($p > 0.05$) (ver tabla 6)
- No existieron diferencias significativas en el número de ingresos en función del género de los pacientes ($p > 0.05$) (ver tabla 7).

- No existieron diferencias significativas en el número de ingresos en función de la FE ($p > 0.05$) (ver tabla 8)

Tabla 5. Coeficiente de correlación de Spearman para NT-proBNP

		Nº ingresos últimos 5 años	NT-proBNP
Rho de Spearman	Nº ingresos últimos 5 años	Coeficiente de correlación	1,000
		Sig. (bilateral)	-,417*
		N	,016
			33
	NT-proBNP	Coeficiente de correlación	-,417*
		Sig. (bilateral)	1,000
		,016	.
		N	33
			33

*. La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

Tabla 6. Coeficiente de correlación de Spearman para la edad

		Nº ingresos últimos 5 años	Edad
Rho de Spearman	Nº ingresos últimos 5 años	Coeficiente de correlación	1,000
		Sig. (bilateral)	,108
		N	,530
			36
	Edad	Coeficiente de correlación	,108
		Sig. (bilateral)	1,000
		,530	.
		N	36
			36

Tabla 7. Test de U de Mann-Whitney para el género

Estadísticos de contraste ^a	
	Nº ingresos últimos 5 años
U de Mann-Whitney	159,000
W de Wilcoxon	330,000
Z	-,102
Sig. asintót. (bilateral)	,919
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	,938 ^b

a. Variable de agrupación: Género

Tabla 8. Test de U de Mann-Whitney para la FEVI

Estadísticos de contraste ^a	
	Nº ingresos últimos 5 años
U de Mann-Whitney	147,000
W de Wilcoxon	318,000
Z	-,511
Sig. asintót. (bilateral)	,610
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	,650 ^b

a. Variable de agrupación: FEVI

EVALUACIÓN DE LOS PACIENTES SEGÚN LA EDAD

Comparando la edad de los sujetos con la FE, se observaba que los pacientes de edades más avanzadas tenían mayor prevalencia de IC con FE conservada, mientras que los pacientes más jóvenes tenían mayor prevalencia de IC con FE deprimida, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) (ver tabla 9). La figura 11 muestra los resultados gráficamente.

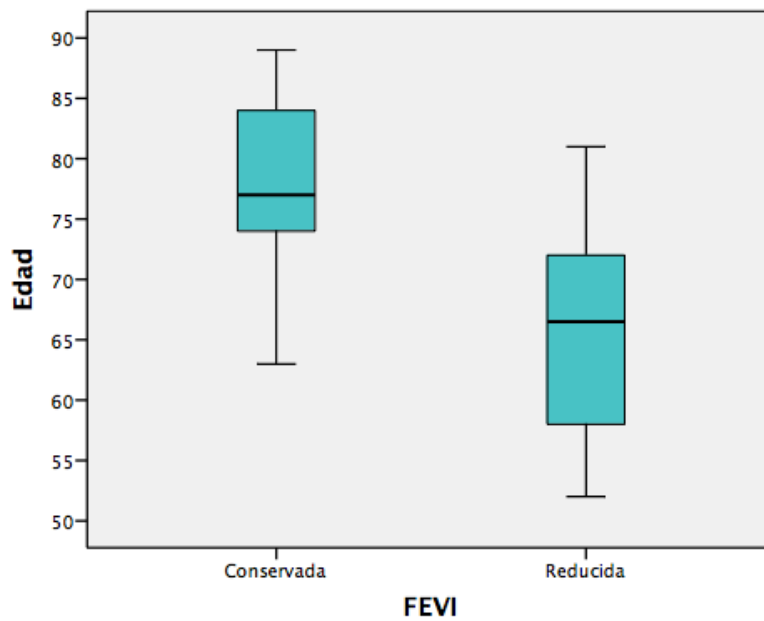
Tabla 9. T de Student para la FE

Estadísticos de grupo					
	FEVI	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Edad	Conservada	18	75,83	10,934	2,577
	Reducida	18	66,39	9,475	2,233

Prueba de muestras independientes

	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
								Inferior	Superior
Edad	,095	,760	2,769	34	,009	9,444	3,410	2,514	16,375
Se han asumido varianzas iguales			2,769	33,326				2,509	16,380
No se han asumido varianzas iguales									

Figura 12. Relación entre la edad de los pacientes y la existencia de IC con FE conservada y FE reducida



ESTUDIO DE LOS PACIENTES CON IC SEGÚN INGRESO

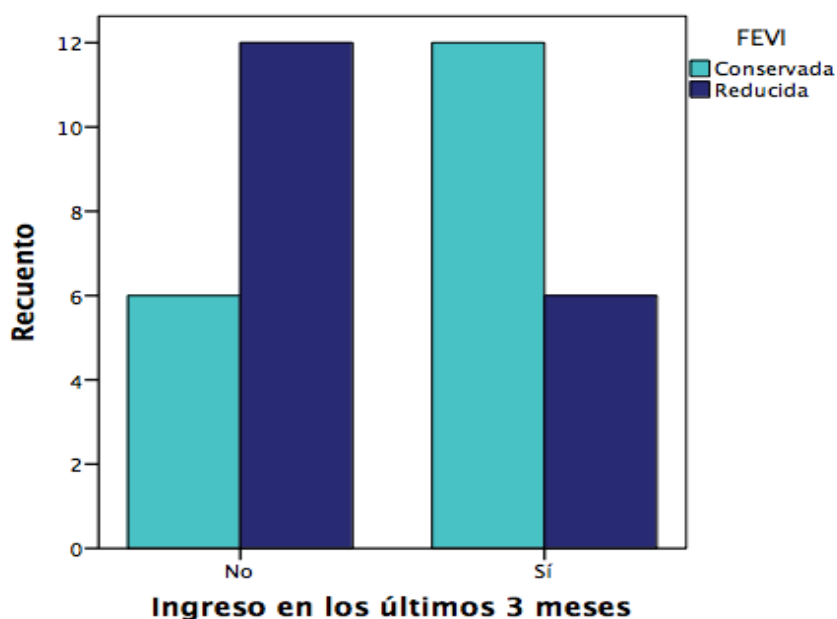
Comparando la FE de los pacientes ingresados frente a los ambulatorios, encontramos que no existían diferencias significativas entre ambos grupos.

Tabla 10. Chi-cuadrado para la FE

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	4,000 ^a	1	,046		
Corrección por continuidad ^b	2,778	1	,096		
Razón de verosimilitudes	4,078	1	,043		
Estadístico exacto de Fisher				,094	,047
Asociación lineal por lineal	3,889	1	,049		
N de casos válidos	36				

a. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 9,00.

Figura 13. Relación entre la FEVI y la situación hospitalaria de los pacientes



DISCUSIÓN

1. Aplicabilidad de la metodología usada

La técnica de lavado orofaríngeo constituye un método no invasivo, de fácil obtención, que ha demostrado ser comparable al esputo inducido o al lavado broncoalveolar para la detección de la colonización por *P. Jirovecii*. Al ser un procedimiento sencillo resulta más cómodo para los participantes, especialmente para los pacientes ingresados que podrían tener dificultades o contraindicaciones para la realización de técnicas de tipo invasivo.

Para la detección de la colonización del microorganismo se realizó una técnica molecular basada en la PCR, que ha demostrado ser una opción fiable y eficaz⁴ dada su mayor sensibilidad y especificidad frente a los métodos de tinción utilizados clásicamente^{42,43,44}.

El Hospital Virgen del Rocío de Sevilla ha desarrollado un protocolo de realización de dicha técnica que utiliza desde hace años por lo que consta de una adecuada validez.

A pesar de la adecuada metodología y diseño, el estudio presenta una serie de limitaciones.

En primer lugar, el reducido tamaño de la muestra (n=72) dificulta la extrapolación de los resultados a la población general dada su menor precisión. Con un tamaño de muestra mayor aumentaría la probabilidad de encontrar diferencias significativas entre ambos grupos y por tanto la potencia del estudio a la hora de realizar el contraste de hipótesis.

Por otro lado, el tiempo disponible para la realización del estudio es muy limitado (2 meses). Con un periodo más amplio podría haberse recogido un tamaño de muestra mayor y haber realizado otra serie de pruebas que apoyarían la hipótesis principal del estudio.

La realización de una espirometría y posterior prueba broncodilatadora (o de una prueba de provocación bronquial en el caso de una espirometría normal) hubiera permitido estudiar a aquellos sujetos con hiperreactividad bronquial e

insuficiencia cardiaca que bien podrían estar colonizados por *P. Jirovecii*. Sin embargo, por razones obvias metodológicas, no hemos podido completar el estudio en lo referente a este elemento de la práctica clínica diaria.

En este aspecto, nos permitimos especular que en el caso de que el estudio hubiera demostrado una mayor prevalencia del patógeno en los pacientes con insuficiencia cardiaca, se implicarían un nuevo abanico de posibilidades para explicar los mecanismos fisiopatológicos subyacentes de la enfermedad. Como se ha expuesto previamente, estudios recientes han demostrado que *P. Jirovecii* es capaz de provocar alteraciones en el endotelio vascular pulmonar de los sujetos infectados que conllevan una remodelación y aumento de las resistencias, provocando en última instancia hipertensión pulmonar²⁸.

La implicación de *Pneumocystis* en la insuficiencia cardiaca podría explicar la disfunción endotelial que actualmente es considerada un mecanismo clave en el desarrollo de las alteraciones que afectan al miocardio, pero cuyos mecanismos subyacentes a día de hoy no están del todo esclarecidos.

2. Impacto del estudio

La no implicación de *Pneumocystis Jirovecii* en la insuficiencia cardiaca conlleva un impacto en el conocimiento de esta patología.

A diferencia de los estudios realizados en otros hospitales^{15,31,32, 45,48, 49, 50}, parece que los pacientes ingresados en el HCULB no tienen a *P. Jirovecii* como patógeno habitual en su microbiota oral y por tanto, no actúan como reservorio.

Una de las posibles explicaciones para este hallazgo radica en el hecho de que existen variaciones en cuanto a la prevalencia del microorganismo según el área geográfica, describiéndose así regiones de alto y bajo riesgo. Asimismo, se han descrito zonas de mayor prevalencia en función de las condiciones climatológicas (*P. Jirovecii* aumenta su presencia en los países del sur de

Europa y durante los meses más cálidos⁵¹) e incluso a lo largo de las estaciones del año.

En seres humanos existe un número reducido de estudios que hayan investigado la presencia de *Pneumocystis jirovecii* en la población sana, y los resultados son controvertidos⁵².

El estudio más reciente es el realizado por *Medrano et al*¹⁵, que identificó DNA del patógeno en el 20% de los lavados orofaríngeos de una muestra de 50 sujetos sanos. Esto contrasta con los resultados obtenidos en estudios anteriores, que no lograron aislar *P. Jirovecii* en las muestras de los individuos sanos⁵².

Sorprendentemente, nuestro estudio aisló DNA de *P. Jirovecii* en las muestras de 3 sujetos sanos procedentes del Banco de Sangre y Tejidos de Aragón. Las características de los sujetos colonizados eran las siguientes: dos de ellos eran varones de 63 y 64 años respectivamente, y el restante era una mujer de 34 años. Todos eran ex fumadores.

Estos hallazgos constituyen un nuevo interrogante acerca de la epidemiología de *P. Jirovecii*, que tradicionalmente se ha relacionado con individuos inmunocomprometidos o con patología respiratoria de base, y apoyarían la hipótesis de que la población general puede ser reservorio y fuente de infección del patógeno.

Diversos estudios han demostrado que la población infantil tiene una alta prevalencia de colonización por *Pneumocystis*, pero ésta disminuye drásticamente al aumentar la edad de los sujetos^{8,14}.

Por tanto, sería necesario esclarecer el mecanismo por el cual se adquiere el microorganismo y determinar si efectivamente la población general sana constituye un reservorio para el mismo.

Por todo esto se necesitan más estudios que establezcan la prevalencia de la colonización por *P. Jirovecii* en la población general, y sus implicaciones epidemiológicas.

3. Utilidad del estudio

Podemos afirmar que, a diferencia de lo que sucede en la EPOC -donde sí se ha demostrado la importancia de la colonización por *P. Jirovecii*- los pacientes con insuficiencia cardiaca no tienen una mayor prevalencia de *Pneumocystis* frente a la población sana.

Los estudios centrados en la presencia de *Pneumocystis* en pacientes diagnosticados de EPOC sugieren que el microorganismo juega un papel importante en la perpetuación del estado de inflamación crónica así como en la progresión de la enfermedad²⁹⁻³⁴. Por otra parte, también se ha demostrado una mayor presencia de *Pneumocystis* en otros tipos de enfermedades pulmonares crónicas (como la fibrosis quística, las enfermedades intersticiales pulmonares o incluso el cáncer de pulmón³⁰). Después de los resultados de este estudio deberíamos preguntarnos si la respuesta inflamatoria celular de los pacientes con IC es tan diferente a la que presentan los pacientes EPOC o si esta última viene condicionada por los diferentes tratamientos antiinflamatorios a los que se someten.

La hospitalización por descompensación de la IC continúa siendo un proceso frecuente tanto en pacientes con disfunción sistólica como en aquellos con FEVI conservada, y las infecciones respiratorias constituyen una de las causas más frecuentes de esta descompensación. Es por ello que una mayor comprensión acerca de la microbiota oral de los pacientes con insuficiencia cardiaca es necesaria, pues podría arrojar luz sobre los patógenos presentes en la flora oral que podrían jugar un papel en las agudizaciones de la IC.

A pesar de que las bacterias constituyen los principales agentes responsables de estas infecciones, otros patógenos –como el hongo *Pneumocystis*- podrían colonizar el tracto respiratorio de estos pacientes.

4. Consideraciones finales

El presente estudio demuestra la ausencia de relación entre la colonización por el patógeno *Pneumocystis Jirovecii* y la insuficiencia cardíaca, independientemente de la clase funcional, el género, si el paciente ha sido hospitalizado o no en los últimos tres meses, el número de ingresos y la fracción de eyección del ventrículo izquierdo.

A pesar de ello –y teniendo en cuenta las limitaciones del estudio- sería conveniente realizar nuevas y más amplias investigaciones que utilizaran un tamaño muestral mayor, y que permitieran determinar si los pacientes con insuficiencia cardíaca tienen una mayor hiperreactividad bronquial y si ésta se asocia a la presencia de *Pneumocystis*. Otra posibilidad sería el llevar a cabo estudios prospectivos de seguimiento desde la infancia hasta la edad adulta en aquellos sujetos en los que la colonización por PJ fuera diagnosticada a una edad temprana.

CONCLUSIONES

Principales

- *Pneumocystis Jirovecii* no está presente en la microbiota orofaríngea de los pacientes con insuficiencia cardiaca.
- *Pneumocystis Jirovecii* no incrementa su presencia en los pacientes que han permanecido ingresados en el HCULB respecto a los pacientes extrahospitalarios.

Secundarias

- La población sana tiene una prevalencia de colonización por *Pneumocystis Jirovecii* que debe ser más ampliamente estudiada.
- El péptido natriurético NT-proBNP está relacionado con la fracción de eyección del ventrículo izquierdo: cuanto más deteriorada se encuentra esta función, mayores son los valores del NT-proBNP.
- El valor del NT-proBNP se encuentra inversamente relacionado con el número de ingresos previos del paciente, aunque el nivel asociación es bajo.
- Los pacientes con IC con fracción de eyección preservada tienen edades más avanzadas que los pacientes con IC con fracción de eyección deprimida

BIBLIOGRAFÍA

1. John J.V. McMurray, Stamatis Adamopoulos, Stefan D. Anker, Angelo Auricchio, Michael Böhm, Kenneth Dickstein, et al. Guía de práctica clínica de la ESC sobre diagnóstico y tratamiento de la insuficiencia cardiaca aguda y crónica 2012. *Rev Esp Cardiol.* 2012;65:937.e1-e59
2. Kenneth Dickstein (Coordinador) (Noruega)*, Alain Cohen-Solal (Francia), Gerasimos Filippatos (Grecia), John J.V. McMurray (Reino Unido), Piotr Ponikowski (Polonia), Philip Alexander Poole-Wilson (Reino Unido), et al. Guía práctica clínica de la Sociedad Europea de Cardiología (ESC) para el diagnóstico y tratamiento de la Insuficiencia Cardiaca aguda y crónica 2008. *Rev Esp Cardiol.* 2008;61:1329.e1-1329.e70
3. McKee PA, Castelli WP, McNamara PM, and Kannel WB. The natural history of congestive heart failure: the Framingham study. *N Engl J Med.* 1971; 144:1-6
4. Calderón Sandubete E, de Armas Rodríguez Y, and Capó de Paz Virginia. *Pneumocystis jirovecii*: cien años de historia. *Rev Cubana Med Trop* 2011; 63: 97-116.
5. Wissmann G, Morilla R, Friaza V, Calderón E, and Varela JM. Human reservoirs of *Pneumocystis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010 Jan; 28:38-43.
6. Wakefield AE. DNA sequences identical to *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii* and *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* in samples of air spora. *J Clin Microbiol* 1996; 34:1754–9.
7. Casanova-Cardiel L, and Leibowitz MJ. Presence of *Pneumocystis carinii* DNA in pond water. *J Eukaryot Microbiol* 1997; 44-28.
8. Respaldiza N, Medrano FJ, Medrano AC, Varela JM, de la Horra C, Montes-Cano M, et al. High seroprevalence of *Pneumocystis* infection in Spanish children. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 1029-31.
9. Enrique J. Calderón, Laura Rivero, Nieves Respaldiza, Rubén Morilla, Marco A. Montes-Cano, Vicente Friaza et al. Systemic inflammation in

- patients with chronic obstructive pulmonary disease who are colonized with *Pneumocystis jirovecii*. *E Clin Infect Dis*; 45: e17–e19.
10. Respaldiza N, Montes-Cano MA, Dapena FJ, De la Horra C, Mateos I, Medrano FJ, et al. Prevalence of colonization and genotypic characterisation of *Pneumocystis jirovecii* among cystic fibrosis patients in Spain. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11:1012-5.
 11. Montes-Cano MA, Chabe M, Fontillon-Alberdi M, de-Lahorra C, Respaldiza N, Medrano FJ, et al. Vertical transmission of *Pneumocystis Jirovecii* in humans. *Emerg Infect Dis* 2009; 15:125-7
 12. E Leibovitz, H Pollack, T Moore, J Papellas, L Gallo, K Krasinski, et al. Comparison of PCR and standard cytological staining for detection of *Pneumocystis carinii* from respiratory specimens from patients with or at high risk for infection by human immunodeficiency virus. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 3004-7.
 13. Medrano FJ, Montes-Cano M, Conde M, de la Horra C, Respaldiza N, Gasch A, et al. *Pneumocystis jirovecii* in General Population. *Emerg Infect Dis* 2005; 11:245-50.
 14. Calderón EJ. *Pneumocystis* Infection: Seeing beyond the Tip of the Iceberg. *Clin Infect Dis* 2010; 50: 354-6.
 15. Vargas SL, Ponce CA, Gigliotti F, Ulloa AV, Prieto S, Muñoz MP, et al. Transmission of *Pneumocystis carinii* DNA from a patient with pneumonia to immunocompetent contact health care workers. *J Clin Microbiol* 2000; 38:1536–8
 16. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JG, Coats AJ, et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 2016; May 20. pii: ehw128
 17. Komajda M, Carson PE, Hetzel S, McKelvie R, McMurray J, Ptaszynska A, et al. Factors associated with outcome in heart failure with preserved ejection fraction: findings from de Irbesartan in Heart failure with Preserved Ejection Fraction Study (I-PRESERVE). *Circ Heart Fail* 2011; 4:27-35.
 18. Perez Fernandez G A. Insuficiencia cardiaca congestiva y disfunción endotelial: aspectos de interés. *Medicina General* 2001; 34: 440-446

19. Fischer D, Rossa S, Landmesser U, Spiekermann S, Engberding N, Hornig B, et al. Endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure is independently associated with increased incidence of hospitalization, cardiac transplantation or death. *Eur Heart J* 2005; 26:65-9.
20. Maréchaux, S., Samson, R., van Belle, E., Breyne, J., de Monte, J., Dédrie, C., et al. Vascular and Microvascular Endothelial Function in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *J Car Fail* 2016; 22:3-11.
21. Paulus, W. , and Tschöpe, C. A Novel Paradigm for Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *J Am Coll Cardiol* 2013; 62:263
22. Franssen, C., Chen, S., Unger, A., Korkmaz, H., De Keulenaer, G., Tschöpe, C., et al. Myocardial Microvascular Inflammatory Endothelial Activation in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *JACC Heart Fail.* 2016; 4: 312.
23. Borlaug, B., Olson, T., Lam, C., Flood, K., Lerman, A., Johnson, B., et al. Global Cardiovascular Reserve Dysfunction in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *J Am Coll Cardiol* 2010; 56: 845-54.
24. Lam CSP, and Lund LH. Microvascular endothelial dysfunction in heart failure with preserved ejection fraction. *Heart* 2016; 102:257-9.
25. Borlaug BA, Olson TP, Lam CSP, Flood KS, Lerman A, Johnson BD, et al. Global cardiovascular reserve dysfunction in heart failure with preserved ejection fraction. *J Am Coll Cardiol* 2010; 56:845–54
26. Farrero M, Blanco I, Batlle M, Santiago E, Cardona M, Vidal B, et al. Pulmonary hypertension is related to peripheral endothelial dysfunction in heart failure with preserved ejection fraction. *Circ Heart Fail* 2014; 7:791–8.
27. Akiyama, E., Sugiyama, S., Matsuzawa, Y., Konishi, M., Suzuki, H., Nozaki, T., et al. Incremental Prognostic Significance of Peripheral Endothelial Dysfunction in Patients With Heart Failure With Normal Left Ventricular Ejection Fraction. *J Am Coll Cardiol* 2013; 60:1778-86.
28. Siemsen, D., Dobrinen, E., Han, S., Chiochi, K., Meissner, N. and Swain, S. Vascular Dysfunction in Pneumocystis-Associated Pulmonary Hypertension Is Related to Endothelin Response and Adrenomedullin Concentration. *Am J Pathol* 2016; 186: 259-69.

29. Calderón EJ, Regordan C, Medrano FJ, Ollero M, and Varela JM. *Pneumocystis carinii* infection in patients with chronic bronchial disease. *Lancet* 1996; 347:977.
30. Gutiérrez S., Respaldiza N., Campano E., Martínez-Risquez M., Calderón E., and De La Horra, C. *Pneumocystis jirovecii* colonization in chronic pulmonary disease. *Parasite* 2011; 18: 121-6.
31. Calderon E., Rivero L., Respaldiza N., Morilla R., Montes-Cano M., Friaza, V., et al Systemic Inflammation in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease Who Are Colonized with *Pneumocystis jirovecii*. *Clin Infect Dis* 2007; 45: 17-9
32. Calderón E, de la Horra C, Medrano FJ, López-Suárez A, Montes-Cano MA, Respaldiza N, et al. *Pneumocystis jirovecii* isolates with dihydropteroate synthase mutations in patients with chronic bronchitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23:545–9
33. Varela JM, Respaldiza N, Sánchez B, de la Horra C, Montes-Cano M, Rincón M, et al. Lymphocyte response in subjects with chronic pulmonary disease colonized by *Pneumocystis jirovecii*. *J Eukaryot Microbiol* 2003; 50:672–3.
34. Morris A., Sciurba F.C., and Norris K.A. *Pneumocystis*: a novel pathogen in chronic obstructive pulmonary disease? *COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* 2008; 5, 43-51
35. Calderón E.J. Epidemiology of *Pneumocystis* infection in Human. *J Myc Med* 2009; 19 :270-5.
36. Diaz P., Strausbaugh L., and Dongari-Bagtzoglou, A. Fungal-bacterial interactions and their relevance to oral health: linking the clinic and the bench. *Front. Cell. Infect. Microbiol* 2014; 4: 101.
37. Dupuy A., David M., Li L., Heider T., Peterson J., Montano E., et al. Redefining the Human Oral Mycobiome with Improved Practices in Amplicon-based Taxonomy: Discovery of *Malassezia* as a Prominent Commensal. *PLoS One* 2014; 9: 90899.
38. Ghannoum, M., Jurevic, R., Mukherjee, P., Cui, F., Sikaroodi, M., Naqvi, A. , et al. Characterization of the Oral Fungal Microbiome (Mycobiome) in Healthy Individuals. *PLoS Pathog* 2010; 6: 1000713.

39. Xu, H., and Dongari-Bagtzoglou. Shaping the oral mycobiota: interactions of opportunistic fungi with oral bacteria and the host. *Curr Opin Microbiol* 2015; 26: 65-70.
40. Nagano Y, Elborn JS, Millar BC, Walker JM, Goldsmith CE, Rendall J, et al. Comparison of techniques to examine the diversity of fungi in adult patients with cystic fibrosis. *Med Mycol* 2010; 48: 166–76.
41. Swain, S., Meissner, N., Siemsen, D., McInerney, K. and Harmsen, A. *Pneumocystis* Elicits a STAT6-Dependent, Strain-Specific Innate Immune Response and Airway Hyperresponsiveness. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2012; 46:290.
42. Durand-Joly I, Chabé M, Soula F, Delhaes L, Camus D, et al. E. Molecular diagnosis of *Pneumocystis pneumonia*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; 45(3): 405-10
43. Arcenas RC, Uhl JR, Buckwalter SP, Limper AH, Crino D, and Dei-Cas E. A real-time polymerase chain reaction assay for detection of *Pneumocystis* from bronchoalveolar lavage fluid. *Diag Microbiol Infect Dis* 2006; 54: 69-75
44. Helweg-Larsen J, Jensen JS, Benfield T, Svendsen UG, Lundgren JD, and Lundgren B. Diagnostic Use of PCR for Detection of *Pneumocystis carinii* in Oral Wash Samples. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2068–72.
45. Miller RF, Ambrose HE, and 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: 3877–82.
46. Sing A, Schmoldt S, Laubender RP, Heesemann J, Sing D, and Wildner M. Seasonal variation of *Pneumocystis jirovecii* infection: analysis of underlying climatic factors. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 957–60.
47. Calderón EJ, Varela JM, Medrano FJ, Nieto V, González-Becerra C, Respaldiza N, et al. Epidemiology of *Pneumocystis carinii* pneumonia in southern Spain. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 673–6.
48. Esteves F., Montes-Cano M., Horra C., Costa M., Calderón E., Antunes, F., et al. *Pneumocystis jirovecii* multilocus genotyping profiles in patients from Portugal and Spain. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 356-62.

49. Montes-Cano M., de la Horra C., Respaldiza N., Medrano F., Varela J., and Calderón E. Polymorphisms in *Pneumocystis jirovecii* Strains in Spanish Children with Cystic Fibrosis. *J Infect Dis* 2006; 193: 1332-3.
50. Respaldiza N., Montes-Cano M., Dapena F., de la Horra C., Mateos I., Medrano, F., et al. Prevalence of colonisation and genotypic characterisation of *Pneumocystis jirovecii* among cystic fibrosis patients in Spain. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 1012-5.
51. Varela JM, Regordán C, Medrano FJ, Respaldiza N, de La Horra C, Montes-Cano MA, et al. Climatic factors and *Pneumocystis jirovecii* infection in southern Spain. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 770–772.
52. Morris, A., Wei, K., Afshar, K. and Huang, L. Epidemiology and Clinical Significance of *Pneumocystis* Colonization. *J Infect Dis* 2008; 197 :10-7.

ANEXO 1. Consentimiento informado



HOSPITAL CLINICO
UNIVERSITARIO
"LOZANO BLESA"

Avda. San Juan Bosco, 15
50009-ZARAGOZA

DATOS DEL PACIENTE:

1^{er} Apellido: _____

2^o Apellido: _____

Nombre _____ n^o Historia

Fecha _____ Cama: _____ Servicio _____

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA REALIZACIÓN DE ESTUDIO DE PREVALENCIA DE PNEUMOCYSTIS JIROVENII EN UNA COHORTE DE PACIENTES CON INSUFICIENCIA CARDIACA

Solicitamos su consentimiento para:

1. Realizar estudio de la prevalencia de un hongo (*Pneumocystis Jirovenii*) en muestras biológicas de saliva cuya finalidad es determinar si es usted portador/a de dicho microorganismo.
2. Dichas pruebas serán realizadas en el laboratorio del Hospital Virgen del Camino de Sevilla.
3. Únicamente el personal sanitario debidamente autorizado por el Hospital Clínico Universitario "Lozano Blesa" podrá acceder a sus datos personales y a los resultados del estudio que se le han realizado, según la Ley de Protección de Datos vigente.
4. Los resultados obtenidos podrían ser relevantes para el conocimiento de algunos de los mecanismos básicos implicados en la génesis de la insuficiencia cardiaca.
5. Una vez finalizados los análisis solicitados, los datos obtenidos y las muestras excedentes se guardarán en Hospital Clínico Lozano Blesa por el interés que pueden tener para satisfacer futuras necesidades asistenciales suyas.

Yo,

.....

. declaro que

(paciente/ progenitor del paciente/ custodio legal del paciente, **nombre y apellidos**)

he sido informado de que soy voluntario para participar en el estudio, y por tanto, **otorgo el siguiente consentimiento para realizar dichas pruebas** y enviarlas al laboratorio mencionado por para completar el proceso diagnóstico.

CONSENTIMIENTO

D. _____ /
Dña.....
..... manifiesta que ha recibido información suficiente y en términos comprensibles para tomar la decisión, de acuerdo con su propia y libre voluntad y **presta su consentimiento y autorización** a la práctica del procedimiento o intervención reseñada.

Nombre, apellidos y nº colegiado del médico que informa:
.....
.....
.....

En Zaragoza a.....de.....de.....

Firma del Médico

Firma del paciente o representante legal

En caso de incapacidad del paciente (razonar la incapacidad)

DENEGACIÓN DE CONSENTIMIENTO

D. _____ /
Dña.,.....
..... decido no dar mi consentimiento para que se efectúe el procedimiento o la intervención reseñada.

Me han sido explicadas, entiendo y asumo las repercusiones que esta decisión pudiera ocasionar sobre la evolución del proceso.

En Zaragoza a..... dede

Firma del paciente o representante legal

En caso de incapacidad del paciente (razonar la incapacidad)

REVOCACIÓN

D. _____ / _____ Dña
.....
....., retiro mi consentimiento prestado anteriormente, sin que sea necesario aducir justificación alguna.

En Zaragoza adede

Firma del paciente o representante legal

En caso de incapacidad del paciente (razonar la incapacidad)

Duración y cronograma de actividades:

El proyecto tendrá una duración de 2 meses (hasta junio de 2016)

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES:

1. Selección de casos
2. Recogida de muestras + congelación
3. envío a laboratorio del H. Virgen de Lletjó de Sevilla para extracción de DNA y realización de la PCR
4. Análisis de resultados
5. Presentación y defensa de la tesis
6. Publicación

Análisis de costes: (Especificar los costes derivados de la realización del proyecto)

El presente estudio no derivará coste alguno para el Hospital exceptuando el uso de tubos tipo falcon para la recogida del líquido amniótico. El transporte de las muestras se pagará a través de fondos disponibles en la Universidad de Zaragoza

<p>Firma del Solicitante:</p> <p style="text-align: center;"><i>[Firma]</i></p> <p>Fdo:</p>	<p>Firma del Tutor:</p> <p style="text-align: center;"><i>[Firma]</i></p> <p>Fdo: Miguel A. Torralba</p>
<p>Lugar y Fecha</p> <p>En Zaragoza, a 15 de abril de 2016</p>	

ANEXO 2



**ACUERDO DE CONFIDENCIALIDAD Y DE FINALIDAD DE USO
EN ESTUDIOS DE INVESTIGACIÓN**

D/Dña: _____ con DNI _____ domiciliado en _____ dependiente de la institución _____ con título de proyecto _____, asume que está sujeto al deber de secreto con respecto a los datos a los que tenga acceso y, por tanto, estará obligado a no reproducir, modificar, hacer pública o divulgar a terceros a información a la que pueda tener conocimiento con motivo de la realización de un proyecto de investigación dentro del Sector Zaragoza III. Solo podrán divulgarse, en medios y con fines exclusivamente científicos los resultados derivados de los objetivos propios de la investigación, aunque siempre asegurando que no existe posibilidad alguna, bien directa o indirectamente, de identificar personalmente a los pacientes.

El solicitante se reconoce con capacidad para obligarse a cumplir el presente Acuerdo de Confidencialidad y no Divulgación de Información en base a las siguientes **ESTIPULACIONES:**

Primera.- El solicitante únicamente podrá utilizar la información para fines ligados a la realización del proyecto de investigación, comprometiéndose a mantener la más estricta confidencialidad de la información, aún después de la conclusión de dicho proyecto.

Segunda.- Que, de conformidad con lo establecido en la Ley 41/2002, el acceso a la Historia Clínica con fines de investigación obliga a preservar los datos de identificación personal de paciente, separados de los de carácter clínico-asistencial, de manera que quede asegurado el anonimato, salvo que el propio paciente haya dado su consentimiento para no separarlos.

Tercera.- En caso de que la información resulte revelada o divulgada por cualquier medio (impreso, gráfico, electrónico, etc.) por el solicitante, de cualquier forma distinta de objeto de este Acuerdo, ya sea de carácter doloso o por mera negligencia, será responsable de acciones civiles o penales en su contra emprendidas por la autoridad correspondiente.

Cuarta.- El solicitante se obliga a devolver la información en cualquier momento en el supuesto que existiere un cese de la relación entre ambas partes por cualquier motivo.

Quinta.- El presente Acuerdo entrará en vigor en el momento de la firma por ambas partes, extendiéndose su vigencia de forma indefinida.

En Zaragoza a 15 de abril de 2016

Firma de la Dirección
LA DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN

Fdo:

Fdo: [Firma]

Firma del Solicitante

Fdo:

[Firma]

ANEXO 3. Ficha para casos y ficha para sujetos sanos

FICHA CASOS

- Apellidos, Nombre:
- Género:
- NHC:
- Edad:
- Antecedentes
 - EPOC:
 - Asma:
 - Fumador:
- FEVI (%):
- Clase funcional:
- Número de ingresos en los últimos 5 años:
- pro-BNT:

Insuficiencia cardiaca con **FE preservada**

Insuficiencia cardiaca con **FE deprimida**

Tlf contacto _____

FICHA SANOS

- Género:
- Edad:
- Antecedentes
 - EPOC:
 - Asma:
 - Fumador:

Tlf contacto _____