



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina

Colonización por *Pneumocystis jirovecii* en pacientes en tratamiento con anti-TNF- α

Memoria presentada por **Isabel Martín Garrido** para optar al grado de
Doctor en Medicina y Cirugía

Sevilla, Noviembre 2015

Colonización por *Pneumocystis jirovecii* en pacientes en tratamiento con anti-TNF- α

Memoria presentada por **Isabel Martín Garrido** para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía

Sevilla, Noviembre 2015

Directores

**Enrique Calderón
Sandubete**

Profesor Asociado de Medicina

**José Manuel Varela
Aguilar**

Doctor en Medicina y Cirugía

Francisco Javier Medrano Ortega

Profesor Asociado de Medicina

Tutor

José Villar Ortiz

Catedrático de Medicina

Departamento de Medicina

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral no es mérito del esfuerzo personal. En ella, se ven reflejados más allá de los conocimientos que se aportan, el “buen hacer” de las personas que forman parte de un equipo de investigación del H.U. Virgen del Rocío, el grupo de Epidemiología clínica y molecular, del que he tenido la gran fortuna de formar parte. Por ello, quiero dar las gracias :

- A ellos, mis directores de tesis, Dr. Enrique Calderón, Dr. José Manuel Varela y Dr. Fco Javier Medrano, que me han transmitido la ilusión por la investigación, la calidad y rigurosidad en el trabajo, y sobre todo la dedicación a la medicina .

- A Rubén Morilla por recibirme siempre con una amplia sonrisa en el laboratorio y por todas sus horas de trabajo en la realización de las técnicas.

- Al Servicio de Farmacia, en especial a la Dra. Lluch, y al servicio de Reumatología del H U Virgen del Rocío, por hacer más fácil la inclusión de pacientes.

En la etapa de la residencia he estado acompañada de personas que son y serán insustituibles, que me han ayudado en momentos malos y que han disfrutado conmigo los maravillosos, gracias a Maite, Rafa, Laura, Diana, Julia... y a todos los demás.

Quiero dar las gracias también al servicio de Medicina Interna del que ahora formo parte, por apoyarme en la realización de esta tesis, por seguir ilusionándome por la medicina y modelarme como profesional como hasta ahora.

A Lucía y Alejandro, mis hermanos, por vuestro cariño incondicional y por todo lo que me seguís enseñando cada día.

Y sabiendo que cualquier cosa que quisiera expresarles en palabras, no llega a transmitir lo que siento, doy las gracias a mis padres, pues ellos son los responsables de ser lo que soy y llegar donde estoy...

A Luis, por ser mi apoyo y mi compañero

Gracias

Isabel

ÍNDICE

GLOSARIO DE TÉRMINOS

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Fármacos anti-factor de necrosis tumoral

1.1.1. Definición y funciones del factor de necrosis tumoral

1.1.2. Fármacos anti-factor de necrosis tumoral. Mecanismos de acción

1.2. Complicaciones infecciosas en el tratamiento con fármacos anti-factor de necrosis tumoral

1.2.1. Posibles mecanismos implicados en el aumento de riesgo de infecciones en pacientes en tratamiento con fármacos anti-factor de necrosis tumoral

1.2.2. Riesgo de infección por el uso de fármacos anti-factor de necrosis tumoral. Evidencia científica

1.3. Generalidades sobre *Pneumocystis jirovecii*

1.3.1. Introducción

1.3.2. Historia

1.3.3. Taxonomía

1.3.4. Epidemiología

1.3.5. Concepto de colonización

1.3.6. Clínica, radiología y exámenes de laboratorio.

1.3.7. Métodos de diagnóstico

1.3.8. Tratamiento y profilaxis

1.4. Neumonía por *Pneumocystis jirovecii* como complicación del tratamiento con fármacos anti- factor de necrosis tumoral

2. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

3. HIPÓTESIS DE PARTIDA

4. OBJETIVOS

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Población

5.2. Técnicas de laboratorio

5.2.1. Recogida de muestras

5.2.2. Procesamiento de las muestras

5.3. Análisis de datos

5.4. Aspectos éticos

6. RESULTADOS

6.1. Descripción de los grupos de pacientes

6.2. Prevalencia de colonización por *Pneumocystis jirovecii* en pacientes en tratamiento con fármacos anti- factor de necrosis tumoral

6.3. Factores de riesgo para la colonización por *Pneumocystis jirovecii* en pacientes en tratamiento con infliximab

7. DISCUSIÓN

7.1. Prevalencia global de la colonización por *Pneumocystis jirovecii* en pacientes en tratamiento con fármacos anti-factor de necrosis tumoral

7.1.1. Prevalencia de colonización en nuestro medio

7.1.2. Factores de riesgo para la infección por *Pneumocystis*

7.1.3. Colonización por *Pneumocystis jirovecii* en enfermedades autoinmunes

7.1.4. Colonización por *Pneumocystis jirovecii* y riesgo de neumonía por
Pneumocystis jirovecii

7.1.5. Limitaciones del estudio

**7.2. Factores de riesgo para la colonización por *Pneumocystis* en pacientes en
tratamiento con Infliximab**

8. CONCLUSIONES

9. BIBLIOGRAFÍA

GLOSARIO DE TÉRMINOS

AERS: Adverse Event Reporting System

AIJP- Artitis idopática juvenil

APs: Artritis psoriásica

AR: Artritis reumatoide

BAL: lavado broncoalveolar

CMH : complejo mayor de histocompatibilidad

DHFR: dihidrofolato reductasa

DHPS: dihidropeptorato sintasa

EA: Espondilitis anquilosante

EC: Enfermedad de Crohn

EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

ERK : quinasa reguladora de señales extracelulares

FDA: Food and Drugs Administration

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos

HACA: anticuerpos antiquméricos humanos

IBIS: Instituto de Biomedicina de Sevilla

IFN- γ : Interferón gamma

IG: inmunoglobulina

IL: Interleuquina

JNK: quinasa jun del extremo N-terminal

LBA: lavado broncoalveolar

LOF: lavado orofaríngeo

MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógenos

mtLSU rRNA: región mitocondrial de la subunidad mayor del ARN ribosomal

NF- κ B: Factor nuclear *kappa B*

NK: células Natural Killer o nulas

PAF: Factor activador de plaquetas

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PCR-RT: PCR a tiempo real

PcP: (del inglés :**P**neumocystis **C**arinii **P**neumonia o **P**neumo**C**ystis **P**neumonia) neumonía por *Pneumocystis jirovecii*

Ps: Psoriasis

RIP: Proteínas de interacción con receptores

SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

TACE: enzima convertasa de factor de necrosis tumoral alfa

TACAR: tomografía axial computerizada de alta resolución

TGF: factor de crecimiento transformante

TMP-SMX: trimetoprim-sulfametoxazol

TNF : factor de necrosis tumoral

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

TNF- β : Factor de necrosis tumoral beta

TNF-R: receptor para el factor de necrosis tumoral

TRADD: proteínas de dominio mortal asociadas a receptor TNF

TRAFs: factores asociados al receptor TNF

TS: Timidilato sintasa

VCAM: moléculas de adhesión endotelial vascular

ICAM: moléculas de adhesión endotelial intercelular

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

1. INTRODUCCIÓN

1.1. FÁRMACOS ANTI-FACTOR DE NECROSIS TUMORAL

1.1.1. DEFINICIÓN Y FUNCIONES DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL.

El factor de necrosis tumoral (TNF) es una citoquina proinflamatoria, descubierta inicialmente en el suero de ratones después de ser inoculados con endotoxinas bacterianas. Más tarde esta misma citoquina fue encontrada igualmente en ratas, conejos y en el ser humano. Se conocen dos formas moleculares, denominadas factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) o Caquexina y factor de necrosis tumoral beta (TNF- β) o Linfotoxina. TNF pertenece a la superfamilia de mediadores que llevan su nombre y a la cual pertenecen al menos 15 citoquinas. Los miembros de esta superfamilia de citoquinas comparten una serie de similitudes entre las que se encuentran: ser proteínas monotriméricas, excepto la linfotoxina, estar principalmente expresadas en la membrana celular y participar en la regulación de la proliferación celular y la apoptosis, aunque varios miembros, tal como el TNF- α , tienen una importante actividad proinflamatoria (Dinarello & Moldawer, 1999)

La síntesis de TNF- α puede ser inducida por diferentes agentes, como virus, parásitos, bacterias, células tumorales o situaciones como la isquemia, el daño celular o la irradiación. Por otra parte, algunas citoquinas como el interferón gamma (IFN- γ), la interleuquinas (IL)-1, la IL-2, la IL-12, la IL-17, el factor estimulador de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF), el factor activador de plaquetas (PAF) o el mismo TNF- α actúan también como inductores de su síntesis. El TNF- α es secretado principalmente por células del sistema inmune, como los monocitos, macrófagos, neutrófilos, células nulas (NK) y linfocitos T, principalmente CD4+. De la misma manera, otras células pueden producirlo como respuesta a un estímulo, tales como astrocitos, microglía, eosinófilos, condrocitos, osteoblastos, miocitos y fibroblastos, entre otras (Ibelgaufts, 1995; Frago, et al, 2014).

El gen que controla la síntesis de TNF se encuentra en el brazo corto del cromosoma 6 en 6p21.3, dentro de la región que codifica la síntesis del gen del complejo mayor de histocompatibilidad III (CMH-III), entre los genes HLA-B y el del factor C del complemento. El gen que codifica la síntesis de TNF- α tiene un tamaño de 3,6 Kb y está conformado por cuatro exones; el primero se encarga de codificar una proteína precursora de 233 aminoácidos, mientras que los tres restantes codifican cada uno de los monómeros

que conforman la proteína activa. Además este gen posee tres intrones cuya función es desconocida. El gen que codifica el TNF- β está ubicado a 1,2 Kb del gen de TNF- α y ambos genes son regulados de forma independiente (Ibelgaufts, 1995; Fragoso, et al, 2014).

Polimorfismo del TNF- α

El gen del TNF- α es altamente polimórfico. Este polimorfismo se encuentra en los microsatélites (STPRs), en los fragmentos de restricción (RFLPs) y en nucleótidos simples (SNPs). Se han identificado 5 microsatélites denominados TNF a, b, c, d, e, cada uno de los cuales presenta diferentes variables así, TNF- α AC/GT, que origina 13 alelos diferentes, TNFb TC/GA con 7 alelos, TNFc TC/GA con 2 alelos diferentes, el TNFd TC/GA con dos alelos diferentes y el TNFe TC/GA con 4 alelos. Se han registrado 19 SNPs dentro del gen del TNF, ubicados tanto en regiones promotoras como en sitios de transcripción y regiones no transcritas (UTR). El interés que tiene determinar el polimorfismo del TNF- α radica en la influencia que éste tiene en los niveles de expresión de la citoquina y por tanto, de sus efectos. (Cornelis, 1999; Verweij, 1999)

Estructura proteica

La glicoproteína TNF- α madura se encuentra expuesta en la superficie de la membrana celular, contiene 233 aa, pesa 26 kDa, es biológicamente activa y participa en la citotoxicidad e inflamación por interacción celular. El TNF- α soluble corresponde a una proteína de 17 KDa, conformada por 157 aminoácidos, producida a partir de TNF- α de membrana, el cual es procesado por cortes a nivel del residuo 76 por acción de la enzima convertasa de factor de necrosis tumoral alfa (TACE), una metaloproteína que está también en la membrana celular. Estudios cristalográficos muestran que TNF- α está formado por tres monómeros asociados no covalentemente y cuyo extremo N-terminal se encuentra expuesto en la superficie. Esta fracción N-terminal no parece importante en la interacción con el receptor (TNFR).

Mecanismos efectores

El TNF- α es una citoquina pleiotrópica que posee receptores en todos los tipos de células. El efecto que se puede desencadenar por la unión ligando (TNF) receptor (TNFR) en los diferentes tipos de células ha sido ampliamente estudiado. La transducción se produce por la interacción de TNF- α con algunos de los diferentes tipos de receptores. Las

proteínas que participan en esta cascada de señales no son específicas ya que pueden actuar con cualquier receptor de la familia del TNF y, por medio de ellos, enviar sus señales. (Darnay & Aggarwal, 1999).

La cascada de señales puede iniciarse con la interacción de varios miembros de la familia de receptores de TNF como son CD14, CD40, Fc o los RTNF, junto a factores de transcripción como son: NF-kb, API, MAPK, ERK, JNK y p38. También pueden participar en esta cascada de proteasas otros miembros conocidos como las "proteínas de dominio mortal", las cuales se unen a receptores que activan la apoptosis por la vía de las caspasas. Estos dominios presentan una interacción proteína-proteína, causando un efecto apoptótico indistinguible del generado por la interacción Fas-Fas ligando (FasL). Por último, se han involucrado recientemente un grupo de proteínas denominadas "factores asociados al receptor TNF" (TRAFs), que parecen funcionar como activadores de las proteínas quinasas (Darnay & Aggarwal, 1999).

Respuesta

La respuesta que provoca TNF- α depende directamente de la unión a sus receptores. Esta citoquina cuenta con dos receptores estructuralmente diferentes denominados: receptor tipo I (TNF-RI; p55 o p60) y el receptor tipo II (TNF-II; p80 o p75). Ambos receptores son glicoproteínas transmembrana y forman parte de la familia de los receptores del TNF. Esta familia se caracteriza por tener múltiples regiones ricas en cisteínas, principalmente a nivel de su dominio extracelular N-terminal además de la presencia de dominios mortales dentro de su estructura (Li, Yin & Wu, 2013).

Los dos receptores para el TNF están presentes en todos los tipos de células, excepto en los eritrocitos. Generalmente, el TNF-RI se distribuye de manera mucho más amplia que el TNF-II y su expresión es habitualmente constitutiva en muchos tipos de células, mientras que la expresión del TNF-II se da de forma inducida. Ambos receptores se conocen por mediar, de forma cooperativa o independiente, un amplio rango de respuestas celulares que incluyen la proliferación, la diferenciación, la citotoxicidad o la apoptosis celular. Además se han identificado formas solubles de ambos receptores (sTNF-R) en fluidos biológicos que parecen afectar de alguna forma la actividad y la biodisponibilidad de TNF- α a nivel sistémico (Kolliaas, Douni, Kassiootis & Kontoyiannis, 1999; Schneider, Willen & Smulski, 2014).

Se ha observado que las funciones y la cinética de los dos receptores para el TNF- α son diferentes. Hasta el momento parece que TNF-RII responde principalmente a la forma transmembrana del TNF, lo que le confiere un papel principal en la respuesta inflamatoria local, sin embargo la función del TNF-RII es considerada como auxiliar en cuanto al control de la respuesta celular, mientras que el TNF-RI presenta una función dominante en la respuesta celular inducida por TNF. Por esto, es necesario un estímulo de ambos receptores para conseguir una actividad citotóxica adecuada (Puimège, Libert & Van Hauwermeiren, 2014).

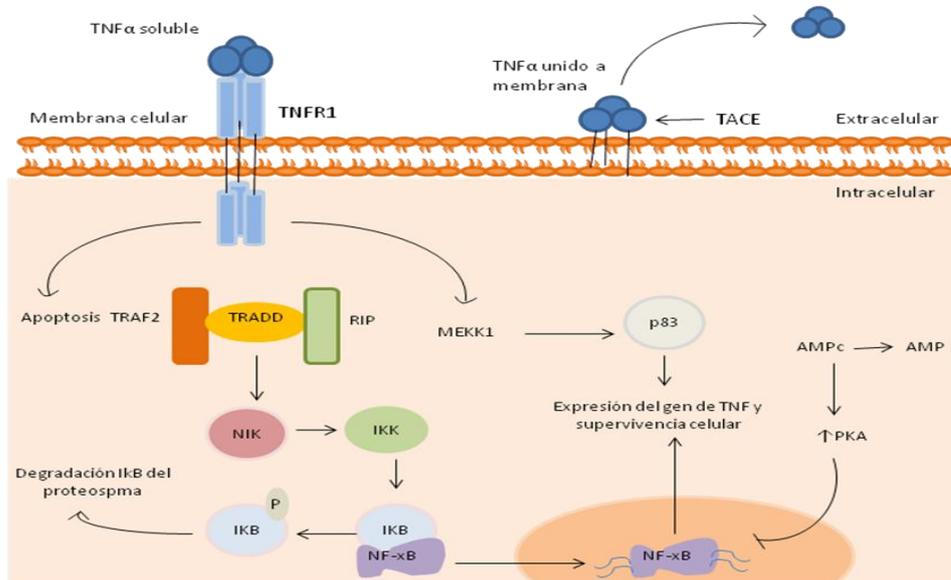
Por otro lado, existen diferencias en cuanto a la afinidad de unión de ambos receptores con el TNF. Se sabe que la unión al TNF-RI es irreversible, mientras que la unión al TNF-RII presenta una afinidad muy baja y una cinética bastante rápida. Algunos autores han planteado la posibilidad de que el TNF-RII pueda comportarse como un "paseador del ligando", debido a que se ha observado que puede unirse el TNF- α y luego pasarlo al TNF-RI para potenciar la unión ligando-receptor y por ende la acción del TNF- α cuando las concentraciones de éste son muy bajas. Todos estos hechos podrían explicar las posibles diferencias de función de los receptores para TNF- α . (Grell, Wajant, Zimmermann & Scheurich, 1998; Li, Yin & Wu, 2013).

La actividad *in vivo* e *in vitro* del TNF-RI se ha asociado fundamentalmente con la respuesta inflamatoria mediada por TNF- α soluble (sTNF- α), ya que es bastante superior que la que se presenta por medio del TNF-RII; además el receptor de p60 participa de forma importante en los procesos apoptóticos, mediados por las señales de dominio mortal, y por la vía de señalización de las moléculas Fas-FasL. Por otro lado, los dominios intracelulares del TNF-RI se unen a proteínas de interacción con receptores (RIP) que con la ayuda de las proteínas de dominio mortal asociadas al receptor TNF-RI (TRADD) pueden dirigir la respuesta bien hacia la apoptosis o hacia la vía de señales proinflamatorias por intermedio del factor NF- κ B. Así mismo, el TNF-RII también está involucrado en los procesos apoptóticos mediados por TNF- α , aunque por una vía diferente a la de p60, ya que en este caso participan las moléculas TRAF (Li, Yin & Wu, 2013).

A modo de resumen, la función principal del TNF-RI es la de interactuar con la forma soluble de 17 kD del TNF- α y regular los procesos proinflamatorios y apoptóticos inducidos por esta citoquina. El TNF-RII, en cambio, tiene su interacción principal con la forma de membrana del TNF- α (26 kD), cumpliendo un papel clave en la respuesta tisular local. Además, este receptor también participa en la unión del sTNF- α , aunque de forma

menos específica y es el encargado de generar un intercambio de ligando para potenciar la acción del TNF-RI.

FIGURA 1



Adaptado por I. Martín de Nature reviews

Por otra parte, los efectos de TNF- α parecen depender de las concentraciones séricas de esta molécula, por lo que se puede observar que:

- *A bajas concentraciones*, presenta un efecto inmuno-regulador, inhibiendo los efectos de varios progenitores de la serie mieloide, estimulando la activación de linfocitos T y la proliferación de linfocitos B. También, es capaz de focalizar la respuesta inflamatoria e inducir la expresión de adhesinas en los leucocitos y de receptores de éstas en el endotelio. Además, activa el sistema de defensa intracelular, así como la expresión de antígenos de histocompatibilidad clase I y perpetúa la formación de granulomas.
- *A concentraciones más elevadas*, induce la producción de fiebre y la aparición de caquexia. Favorece la producción y secreción de otras citoquinas implicadas en el proceso inflamatorio como el IFN- γ , la IL1, la IL6, la IL8 o el factor de crecimiento transformante (TGF) β , provocando una intensa vasodilatación, aumento de la permeabilidad endotelial, disminuyendo la contractilidad miocárdica y favoreciendo un estado procoagulante, que puede provocar finalmente un fenómeno de coagulación intravascular diseminada. Por otra parte, suprime la producción de las células hematopoyéticas, condicionando un estado de inmunosupresión.

Desde un punto de vista clínico, la importancia del TNF- α radica en ser una de las citoquinas clave en la respuesta inflamatoria y en la respuesta frente a la infección. Por ello, en las enfermedades autoinmunes, donde existe una alteración de la respuesta inmunitaria frente a un antígeno propio que es reconocido como extraño y donde se desencadena una respuesta inflamatoria anómala, esta molécula se ha convertido en una de las principales dianas terapéuticas (Willrich, Murray & Snyder, 2015).

1.1.2. FÁRMACOS ANTI-FACTOR DE NECROSIS TUMORAL. MECANISMO DE ACCIÓN

En 1975 George Köhler y Cesar Milstein desarrollaron la tecnología necesaria para la generación de anticuerpos monoclonales. Gracias a esta técnica, fue posible obtener poblaciones homogéneas de anticuerpos frente a un único antígeno mediante el cultivo de hibridomas, descubrimiento por el que consiguieron el premio Nobel en 1984 (Köhler & Milstein, 1975). A raíz de este descubrimiento se han puesto en marcha numerosos estudios enfocados en el desarrollo de anticuerpos monoclonales que bloqueen una determinada molécula y sus efectos, tal es el caso del TNF- α .

Infliximab (Remicade[®]) fue aprobado por la Food and Drugs Administration (FDA) en agosto de 1998, Etanercept (Enbrel[®]) que es una proteína recombinante frente al receptor tipo II del TNF en noviembre de 1998, Adalimumab (Humira[®]) en diciembre de 2002, Certolizumab pegol (Cimzia[®]) en abril de 2008 y Golimumab (Simponi[®]) en abril de 2009. En España y concretamente en nuestra área sanitaria, el Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla, la introducción de estos fármacos tuvo el siguiente orden cronológico: en el año 2002, se aceptó el uso de Infliximab en Artritis Reumatoide (AR) y enfermedad de Crohn (EC), en el año 2003, se aprobó el Etanercept en AR y en junio 2004, se declararon Adalimumab y Etanercept como alternativas terapéuticas equivalentes en pacientes *naive* con AR que no toleraran el uso de metotrexate. Posteriormente han ido aprobándose para el resto de las indicaciones. Finalmente, el año 2012 se han introducido el Certolizumab y el Golimumab.

Tipos de fármacos anti-factor de necrosis tumoral

Infliximab

Infliximab es un anticuerpo monoclonal quimérico producido mediante ingeniería genética usando una parte murina, que tiene la especificidad anti-TNF (fragmento Fab) y una parte constante procedente de inmunoglobulina IgG1 humana (fragmento Fc). Este anticuerpo se une con alta afinidad y neutraliza al TNF- α humano. El infliximab se utilizó por primera vez en 1995 en un ensayo abierto para el tratamiento de la enfermedad de Crohn refractaria y hasta la fecha es el fármaco más utilizado de su grupo (Van Dullemen et al., 1995).

Infliximab se une de forma estable tanto a la forma soluble de TNF- α humano (monómero y trímero) como al TNF- α unido a membrana, lo que impide la cascada de señalización responsable de la transcripción de genes implicados en la respuesta inflamatoria, al evitar la unión del TNF- α con su receptor. Estudios *in vitro* han demostrado que la unión del infliximab al TNF- α de membrana produce la lisis de la célula mediante citotoxicidad por activación del complemento. Sin embargo, este efecto no se ha confirmado en estudios *in vivo*. Además, infliximab también se une a linfocitos T activados de sangre periférica y los aislados de lámina propia, e induce su muerte por apoptosis. En este proceso de muerte celular programada parece desempeñar un papel importante la activación de la caspasa 3. Esta reducción del número de células productoras de TNF- α parece contribuir al efecto antiinflamatorio de este fármaco biológico y puede explicar por qué el infliximab es efectivo en el tratamiento de las enfermedades autoinmunes sistémicas (Scallon, Moore, Trinh, Knight & Ghayeb, 1995).

La composición parcialmente murina de infliximab origina que se puedan formar anticuerpos contra la molécula, denominados anticuerpos antiquiméricos, también conocidos como HACA (Aarden, Ruuls & Wolbink, 2008).

Etanercept

Etanercept es una proteína humana compuesta por el receptor p75 del factor de necrosis tumoral y la porción Fc de la IgG1 humana, obtenida por tecnología de ADN recombinante a partir de un cultivo de células de ovario de hámster chino. Es una proteína dimérica construida genéticamente por fusión del dominio extracelular soluble del receptor-2 del factor de necrosis tumoral humano (TNFR2/p75), unido al dominio Fc de la IgG1 humana. Este componente Fc contiene la región bisagra, las regiones CH2 y CH3, pero no la región CH1 de la IgG1. Se une a TNF- α y TNF- β circulantes, evitando de forma competitiva la unión a sus receptores. No produce lisis de las células que presentan TNF transmembrana y presenta una baja tasa de formación de anticuerpos bloqueadores debido a su origen humano (Daudén, 2010; Scott, 2014).

Adalimumab

Adalimumab es un anticuerpo monoclonal específico contra el TNF- α , muy similar a infliximab, pero de origen completamente humano. Esta característica le confiere menor antigenicidad que infliximab, siendo excepcional la aparición de reacciones de hipersensibilidad. Se une con gran afinidad al TNF- α soluble e inhibe su unión con los receptores de superficie de membrana CD120a/p55 y CD120b/p75. Además se une con el TNF- α de membrana lo que le confiere la capacidad de destruir células en presencia de complemento. También inhibe la producción de IL-1 e IL-6 y disminuye la producción de IL-10 e IL-12 por los monocitos. Asimismo, adalimumab modula la respuesta biológica inducida o regulada por el TNF, incluyendo cambios en los niveles de las moléculas de adhesión responsables de la migración leucocitaria (ELAM-1, VCAM-1, e ICAM-1) (Papadakis, 2006)

Golimumab

Golimumab es un anticuerpo monoclonal humano que forma complejos estables de gran afinidad con las dos formas bioactivas del TNF- α humano, la soluble y la transmembrana, impidiendo así la unión del TNF- α a sus receptores. Se ha demostrado que la unión de Golimumab al TNF humano neutraliza la expresión inducida por el TNF- α de la molécula de adhesión selectina E, la molécula de adhesión endotelial 1 (VCAM-1) y la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) de las células endoteliales humanas. *In vitro*, golimumab también inhibe la secreción inducida por el TNF de las IL-6 e IL-8 y GM-CSF por parte de las células endoteliales humanas (Voulgari, 2010).

Certolizumab pegol

Certolizumab pegol está formado por la unión de un fragmento Fab1 de un anticuerpo monoclonal murino humanizado a dos moléculas de PEG, un polímero no inmunógeno y no tóxico. Al carecer de la región Fc, presente en los anticuerpos monoclonales completos, no induce citotoxicidad mediada por anticuerpos ni por complemento. Además, su estructura pegilada le confiere una semivida plasmática de aproximadamente 14 días y le permite una mejor distribución en tejidos blandos. En experimentos *in vivo* en los que se ha comparado la distribución tisular de certolizumab pegol con las de adalimumab e infliximab en ratones con artritis inducida por colágeno, se observa que la cantidad de certolizumab pegol que penetra en el tejido inflamado en comparación con el tejido normal fue mayor con este compuesto que con los otros dos

anti-TNF (Palframan, Airey, Moore, Vugler & Nesbitt, 2009). Certolizumab pegol reconoce y neutraliza específicamente al TNF- α humano, tanto su forma soluble como la unida a membrana, de una forma dependiente de la dosis (Pasut, 2014).

Tabla 1. DOSIS E INDICACIONES DE FÁRMACOS ANTI-TNF

Nombre del fármaco	Vía de administración	Origen	Dosis	Indicaciones
Infliximab	Intravenosa	Humano-ratón	3-10 mg/kg 0,2,6 y cada 8 sem	AR, APs, EA, EC, CU, Ps
Etanercept	Subcutánea	Proteína recombinante	25mg/2 sem	AR, AIJP, APs, EA, Ps
Adalimumab	Subcutánea	Humano	40mg/2 sem	AR, AIJP, APs, EA, EC, Ps
Golimumab	Subcutánea	Humano	50mg/4 sem	AR, APs, EA
Certolizumab pegol	Subcutánea	Humano	400mg 0,2 y 4 sem 200mg/2 sem	AR

Leyenda: sem: semana; AR: artritis reumatoide; APs: Artritis psoriásica; EA. Espondilitis anquilosante; EC: enfermedad de Crohn; CU: colitis ulcerosa. Ps: psoriasis. AIJP: artritis idiopática juvenil

1.2. COMPLICACIONES INFECCIOSAS EN EL TRATAMIENTO CON FÁRMACOS ANTI-FACTOR DE NECROSIS TUMORAL

1.2.1. POSIBLES MECANISMOS IMPLICADOS EN EL AUMENTO DE RIESGO DE INFECCIONES EN PACIENTES EN TRATAMIENTO CON FÁRMACOS ANTI-FACTOR DE NECROSIS TUMORAL.

Aunque los mecanismos precisos por los que existe un mayor riesgo de infecciones por el uso de fármacos biológicos, y en concreto con los anti-TNF, están en estudio y en ocasiones muy discutidos, el hecho es que estos agentes se dirigen frente a moléculas esenciales en la respuesta innata del sistema inmune y por tanto de la respuesta ante la agresión por diferentes microorganismos, por lo que se ha planteado que el bloqueo de esta molécula podría conllevar una mayor predisposición al desarrollo de infecciones (Kopylov & Afif, 2014).

En concreto, en las enfermedades autoinmunes la inmunidad celular juega un papel fundamental. El infiltrado inflamatorio que se provoca en la mayoría de las lesiones de estas enfermedades está predominantemente formado por células mononucleares, incluyendo linfocitos T y B, células plasmáticas y macrófagos.

La inmunidad celular necesita para ponerse en marcha la activación, proliferación y diferenciación de las células T *naive* en células T efectoras capacitadas para enfrentarse a antígenos específicos provocada por la presentación de antígenos extraños mediante las células dendríticas, los macrófagos y las células B.

Las células T efectoras se dividen, a su vez, en tres clases funcionales: las células T citotóxicas (CD8+) cuya diana es una célula nucleada propia infectada intracitosólicamente; las Th1 (inflamatorias) que tienen como objetivo a macrófagos que ya contienen en sus vacuolas algún parásito y que debido a la unión al macrófago se desencadena la activación de esta célula que ayudará a eliminar al microorganismo y las Th2 (cooperadoras "clásicas") que tienen como objetivo principal a los linfocitos B, a los que suministrarán señales claves para que éstos se activen, proliferen y se diferencien hasta células plasmáticas secretoras de anticuerpos. Así, las células T cooperadoras incluyen los subconjuntos de efectores bien definidos tipo Th1 y Th2, y también los descritos recientemente Th17 y Th9, además de los reguladores Treg y Tr1.

De esta forma se pueden distinguir tres tipos de respuestas (Janeway, Travers, Walport & Capra, 2000):

1. La mediada por linfocitos T citotóxicos, donde los antígenos derivados de los microorganismos que se multiplican en el interior del citoplasma de la célula son transportados a la superficie celular por moléculas del CMH-I y son presentados a células T CD8, que se diferenciarán a células T citotóxicas. Posteriormente, éstas destruirán las células infectadas, bien por mecanismos directos de destrucción celular, bien por medio de la muerte celular programada o apoptosis. Algunos ejemplos típicos son las respuestas frente al virus de la gripe, virus de *Epstein-Barr* y frente a *Listeria monocytogenes*.
2. Mediante la respuesta humoral. Los antígenos derivados de toxinas y de bacterias extracelulares (*Clostridium tetani*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*) son transportados a la superficie celular por moléculas del CMH de clase II y son presentados a células T CD4. Estos antígenos tienden a estimular la diferenciación de células Th2, que inician la respuesta humoral, activando las células B específicas para que produzcan anticuerpos tipo inmunoglobulina (Ig) M.
3. Los antígenos de los microorganismos que se multiplican dentro de las vesículas intracelulares de los macrófagos se transportan a la superficie celular por moléculas del CMH de clase II y son presentados a células T CD4. Estos antígenos tienden a estimular la diferenciación de células Th1. Las células Th1 activan, a su vez, los macrófagos que fagocitan microorganismos intracelulares con mayor eficacia (*Mycobacterium tuberculosis* (TB) y otras micobacterias, *Brucella spp*, *Listeria spp*, *Candida spp*, *Pneumocystis*, *Histoplasma spp*, *Coccidioides spp*, *Criptococcus spp*, *Treponema spp*, *Leishmania spp.*, etc.) e inducen en las células B la producción de anticuerpos IgG, que opsonizan microorganismos extracelulares capturados por las células fagocíticas. Para ello, las células Th1 producen citoquinas como: el IFN- γ principal citoquina activadora de macrófagos; la IL-2, la IL-3, el factor estimulador de macrófagos, el TNF y los receptores del TNF (TNFR I y TNFR II).

Todas ellas, y en especial la familia de citoquinas del TNF, tienen una importancia clave en la respuesta inmunitaria frente a la infección intracelular, activando a los macrófagos infectados, eliminando a macrófagos viejos crónicamente infectados, estimulando la producción de nuevos macrófagos en la médula ósea y reclutando macrófagos hacia los sitios de infección e inflamación donde liberarán sus moléculas proinflamatorias. (Janeway, Travers, Walport & Capra, 2000)

Por todo lo anterior, la utilización de fármacos que bloquean la acción del TNF- α en las enfermedades autoinmunes para disminuir la respuesta inflamatoria crónica anómala y exagerada, podría asociarse a un mayor riesgo del desarrollo de infecciones que en la población general.

De hecho, estudios *ex vivo* han demostrado que la terapia con anti-TNF provoca un descenso mayor de los niveles de IFN- γ producidos como respuesta a la estimulación de diferentes microorganismos, así como un descenso en la expresión del receptor de la inmunidad innata *-Toll-like receptor 4-* (implicado en el reconocimiento de los microorganismos) en las células dendríticas (De Rycke et al., 2005).

1.2.2. RIESGO DE INFECCIÓN POR EL USO DE FÁRMACOS ANTI-FACTOR DE NECROSIS TUMORAL. EVIDENCIA

Desde la introducción del infliximab en 1999 para el tratamiento de la EC y del etanercept en 1998 para la AR, y posteriormente del resto de fármacos anti-TNF, se ha asistido a un incremento en el número de eventos infecciosos en esta población de pacientes (Kopylov & Afif, 2014).

Los datos de los que disponemos son dispares y en ocasiones contradictorios. El uso concomitante de otras terapias como los glucocorticoides, así como el aumento de susceptibilidad a las infecciones que tienen los pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas son factores que no se tienen en cuenta en todos los estudios y que pueden actuar como variables de confusión al interpretar los resultados.

En el primer ensayo clínico controlado post-comercialización sobre infliximab (AntiTNF Trial in Rheumatoid Arthritis with concomitant therapy; ATTRACT), publicado en el año 2000, hubo una incidencia similar de infecciones en los pacientes que recibieron metotrexato en monoterapia y los que recibieron metotrexato e infliximab en combinación (Lipsky et al., 2000). Resultados similares se obtuvieron cuando el estudio se extendió a dos años (Maini et al., 2004). Sin embargo, en el ensayo clínico ASPIRE (Active-Controlled Study of Patients Receiving Infliximab for the Treatment of Rheumatoid Arthritis of Early Onset), publicado en 2004, sí se encontró una incidencia significativamente mayor de infecciones graves en los pacientes con artritis reumatoide tratados con infliximab y metotrexato en combinación frente a los tratados sólo con metotrexato (St Clair et al.,

2004). Este hecho posiblemente pueda deberse a que el estudio ASPIRE incluyó un número mayor de pacientes.

En un ensayo clínico posterior, publicado en 2005, sobre la seguridad y eficacia de infliximab en pacientes con Espondilitis Anquilosante (ASSERT), 27 pacientes del grupo placebo y 86 del grupo tratado con infliximab (36 y 42,6% respectivamente) presentaron algún evento infeccioso, de ellos, fueron graves sólo el 1% de los registrados en el grupo de tratamiento y ninguno de los registrados en el grupo placebo, no siendo la diferencia estadísticamente significativa (Salliot et al., 2007). Un nuevo ensayo clínico publicado en 2006 no encontró aumento significativo de infecciones en el grupo de tratamiento respecto a placebo para la dosis de 3mg/kg pero sí para la dosis de 10 mg/kg (Westhovens et al., 2006).

Aunque en la mayoría de los ensayos clínicos comentados previamente no se pudo establecer que el uso de infliximab supusiera un mayor riesgo para desarrollar infecciones, en un metanálisis que incluyó nueve ensayos clínicos con un total de 3493 pacientes que recibieron anti-TNF (infliximab o adalimumab) y 1512 que recibieron placebo, se obtuvo un riesgo relativo de infecciones graves de 2 (IC 95%: 1,3-3,1) en los tratados con anti-TNF (Bongartz et al., 2006).

Las razones por las que los ensayos clínicos pueden fracasar para detectar un aumento del riesgo de infecciones son varias: que el número de pacientes en alguno de ellos es pequeño, que los pacientes incluidos suelen carecer de otras comorbilidades asociadas o que el periodo de seguimiento es relativamente corto en muchos casos. Algunos de estos factores pueden obviarse en las revisiones sistemáticas o metanálisis lo que explicaría los diferentes resultados obtenidos.

Pero, al margen de los ensayos clínicos, existen numerosos estudios observacionales, casos, series de casos, estudios de cohortes y registros de pacientes que, pese a sus limitaciones metodológicas, se ajustan más a la realidad de la práctica clínica diaria y apoyan la idea de un riesgo incrementado de infecciones. Los casos publicados (*case reports*) son numerosos y muchos han sido recopilados en una revisión publicada en 2010 sobre pacientes con AR (Furst, 2010).

En la serie de Lawrence y colaboradores (2010) se analizaron las complicaciones infecciosas graves y los posibles casos de tuberculosis en una población de 5562 pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal tratados con anti-TNF en Australia y Nueva Zelanda entre 1999 y 2009. No hubo ningún caso de tuberculosis aunque tres pacientes

habían recibido tratamiento para infección tuberculosa latente sin que presentaran reactivación. Sin embargo, sí se registraron 14 infecciones graves (2,2% de la serie). Siete de ellas ocurrieron en los primeros seis meses de tratamiento: dos infecciones por Varicela-Zoster, dos neumonías por *P. jirovecii*, dos bacteriemias por *S. aureus* y un caso con síndrome gripal grave. Las otras siete infecciones aparecieron tras seis meses de tratamiento con infliximab (media $32,6 \pm 24,3$ meses): un caso de varicela, un síndrome gripal grave y cinco infecciones bacterianas. Todos se resolvieron con tratamiento.

Suwannalai y colaboradores (2009) en un estudio retrospectivo comunicaron en un total de 100 pacientes con enfermedades reumatológicas y no reumatológicas tratadas con infliximab o etanercept una incidencia de infecciones de 0,2 casos/persona-año.

Lees y colaboradores (2009) analizando la seguridad de infliximab en un total de 207 pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal tratados en Edimburgo entre los años 1999 y 2007 con un tiempo medio de seguimiento de 2,4 años (620 pacientes-años de seguimiento), obtienen, entre otros datos, un total de 42 infecciones (20,8%) de las que 22 fueron graves.

Salliot y colaboradores (2007) realizaron un estudio retrospectivo en 709 pacientes con procesos reumatológicos tratados con anti-TNF entre 1997 y 2004 de los cuales 204 recibieron más de un tipo de anti-TNF- α con una acumulación de ciclos de 913 (etanercept 50%, infliximab 30% y adalimumab 20%). Se comunicaron un total de 275 eventos infecciosos en un total de 245 pacientes (34,5%), de las cuales 47 fueron definidas como graves. Las localizaciones más frecuentes fueron respiratoria superior e inferior y cutánea; la etiología más frecuente fue la bacteriana (28,2%) y todas curaron sin secuelas. Los autores analizaron además las infecciones que presentaron 623 de estos pacientes durante un periodo de control previo al inicio del tratamiento anti-TNF. La incidencia de infecciones graves fue $3,4 \pm 38,7/100$ pacientes-año durante dicho periodo y de $10,5 \pm 86,9/100$ pacientes año durante el primer ciclo de tratamiento ($p=0,03$). En este estudio la incidencia de infecciones fue mayor con infliximab que con etanercept o adalimumab.

García Vidal y colaboradores (2009) realizaron un estudio retrospectivo en 94 pacientes tratados con infliximab y comunicaron un total de nueve infecciones oportunistas: cuatro tuberculosis, una leishmaniasis, un absceso muscular por *Salmonella* ssp y otro por *S. pneumoniae* y dos infecciones víricas, una hepatitis por virus B y una endoftalmitis por virus *Varicela-zoster*. Además, observaron que el riesgo fue mayor durante el primer año de tratamiento.

En cuanto a los estudios disponibles con golimumab, en los ensayos en fase III para AR, APs y EA se notificaron como reacciones adversas las infecciones en el 28,3 % de los pacientes tratados con golimumab (incidencia de 26,3 por 100 pacientes año, IC95%: 22,1-33,2), de las cuales, las infecciones del tracto respiratorio superior fueron las más frecuentes (7,2% en pacientes tratados frente al 5,8% del grupo control). Se consideraron infecciones graves en el 1,4 % de los pacientes tratados con golimumab y en el 1,3 % de los pacientes control. Las infecciones graves detectadas en los pacientes tratados con golimumab fueron tuberculosis, infecciones bacterianas, incluida sepsis y neumonía, infecciones fúngicas invasivas y otras infecciones oportunistas (Kay et al., 2015).

En los ensayos clínicos en AR controlados con placebo para certolizumab la incidencia de casos nuevos de infecciones fue 0,91 por paciente/año para todos los pacientes tratados con certolizumab pegol y 0,72 por paciente/año para los pacientes tratados con placebo. Las infecciones consistieron fundamentalmente en infecciones del tracto respiratorio superior, infecciones por herpes, infecciones del tracto urinario e infecciones del tracto respiratorio inferior. El riesgo de infecciones graves con Certolizumab 200 mg y Certolizumab 400 mg (Peto OR 3,25; IC del 95%: 1,65 a 6,39 respectivamente) es similar a otros anti TNF (Keystone et al., 2008; Michaud et al., 2014).

Finalmente, algunos registros nacionales de pacientes tratados con anti-TNF ofrecen datos muy interesantes en tanto en cuanto recogen pacientes reales que se ajustan perfectamente a la práctica clínica diaria, si bien en la mayoría de los casos sus resultados no son comparables.

Registro alemán: Incluye 512 pacientes con AR tratados con etanercept, 346 con infliximab y 70 con anakinra durante un periodo de tiempo comprendido entre 2001 y 2003 y 601 pacientes tratados con fármacos modificadores de la enfermedad (controles). La incidencia de infecciones graves es de 22,6/100 pacientes-año (IC 95%: 18,7-27,2) para etanercept, 28,3 para infliximab (IC 95%: 23,1-34,7) y 6,8 en el grupo control (IC 95%: 5-9,4) ($p < 0.0001$). El riesgo relativo de infecciones con infliximab fue de 2,1 (IC 95%: 0,8-5,5) en relación al grupo control. Los autores concluyen que el uso de anti-TNF incrementa el riesgo de infecciones en esta población de pacientes que ya parten de un riesgo mayor que la población general inherente a la enfermedad. (Listing et al., 2005)

Registro francés (RATIO, Research Axed on Tolerance of biotherapies) Este registro se creó en 2004 con el objeto de recopilar todas las infecciones oportunistas ocurridas durante un periodo de tiempo de 3 años en pacientes tratados con anti-TNF; el registro incluye más de 50.000 pacientes/año. En diciembre de 2010 comunican 45 casos de

infecciones oportunistas no tuberculosas en 43 pacientes tratados con anti-TNF (29 infliximab, 10 adalimumab, 4 etanercept). Un tercio de las infecciones fue bacteriana (cuatro listeriosis, cuatro nocardiosis, cuatro micobacteriosis atípicas, tres salmonelosis no tiphy), 40% fueron víricas (ocho herpes zoster graves, tres varicelas, tres herpes simple extensos, cuatro infecciones diseminadas por CMV), 22% fueron fúngicas (cinco PcP), tres aspergilosis invasiva y dos criptococosis) y 4% parásitos (dos leishmaniasis). La mortalidad por infección fue del 9%. El riesgo de infección con infliximab fue del 17,6% (95% IC: 4,3-72,9; $p < 0.0001$) significativamente mayor que el observado con el uso de glucocorticoides (más de 10 mg día oral o bolos) en el año previo (OR=6,3; IC 95%: 2-20; $p=0,002$). (Salmon-Ceron et al., 2011)

Registro español (BIOGEAS) Cohorte prospectiva iniciada en 2002 que incluye pacientes con enfermedades sistémicas autoinmunes graves y refractarias tratadas *off-label* con terapias biológicas. Incluía 344 pacientes hasta julio de 2010, 77% tratados con rituximab, 11% infliximab, 6 % etanercept, 5% adalimumab y 1% con otros agentes biológicos. Tras un periodo medio de seguimiento de 26,76 meses se registraron 45 infecciones graves en 37 pacientes. Fallecieron cuatro pacientes. La tasa cruda de infecciones graves fue de 90,9 eventos/1000 personas-año (112,5 con rituximab, 76,9 con infliximab, 66,9 con adalimumab y 30,5 con etanercept). La localizaciones más frecuente fueron respiratoria (39%), sistémico manifestado como bacteriemia/sepsis (20%) y urinaria (16%). (Diaz-Lagares et al., 2011).

Después de lo comentado, se puede concluir que si bien existen datos contradictorios entre los distintos estudios disponibles en la literatura, en la mayoría de ellos queda patente que en la población de pacientes tratada con anti-TNF existe una mayor frecuencia de infecciones, pero es difícil definir el exceso de riesgo atribuido dada la alta prevalencia basal de infecciones en pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas, sobre todo en las formas graves y avanzadas, y debido al uso de otros fármacos inmunosupresores como los glucocorticoides (Keyser, 2011; Martín Garrido I, González León R, Varela JM & Calderón EJ, 2012; Michaud et al., 2014).

1.3 GENERALIDADES SOBRE *PNEUMOCYSTIS JIROVECHII*

1.3.1 INTRODUCCIÓN

Pneumocystis jirovecii, previamente conocido como *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis*, continúa siendo uno de los patógenos oportunistas más importantes que afectan a individuos con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y pacientes con inmunodepresión debida a otras causas, en los que produce una neumonía grave con una alta tasa de morbilidad y mortalidad (Calderon, Gutiérrez-Rivero, Durand-Joly & Dei-Cas E, 2010,

Desde su descubrimiento, y durante muchos años, *Pneumocystis* fue considerado un protozoo, aunque hoy se reconoce como un hongo atípico. Inicialmente, se pensaba que existía una sola especie del microorganismo que infectaba a todos los mamíferos y, por tanto, se creía que la enfermedad que causa en la especie humana podría ser una zoonosis y el reservorio cualquiera de los mamíferos con los que puede cohabitar el hombre de forma habitual, sin causarle enfermedad. Sin embargo, estudios genéticos con técnicas de biología molecular han puesto de manifiesto que existen diversas especies de *Pneumocystis* con una estrecha afinidad por su huésped (estenoxenismo). Por otra parte, el desarrollo de técnicas moleculares para la identificación de este patógeno ha permitido estudiar mejor su epidemiología y poner de manifiesto que la neumonía por *Pneumocystis* (PcP) constituye solo la punta del *iceberg* de la infección por *P. jirovecii* en la especie humana (Dei-Cas, 2000).

1.3.2 HISTORIA

Los microorganismos que hoy se conocen como *Pneumocystis* fueron observados por primera vez en 1909 por Carlos Chagas (1879-1934), mientras investigaba una nueva enfermedad que afectaba a los trabajadores de las vías del ferrocarril central en el estado brasileño de Minas Gerais. Chagas (1909) observó en los pulmones de cobayas que fallecían a los cinco días de ser inoculados con sangre que contenía un nuevo "trypansomoma" humano, la presencia de numerosas formas esquizogónicas que interpretó de modo erróneo como una parte del ciclo vital del *Trypanosoma cruzi*, que él denominó por ello *Schizotrypanum cruzi*.

Antonio Carini (1872-1950), director en ese momento del Instituto Pasteur de São Paulo, hizo un año después una descripción similar de quistes en el pulmón de ratas

infectadas con *Trypanosoma lewisi* (Carini, 1910). Sin embargo, quizás sospechando que los quistes pudieran corresponder a un organismo desconocido, envió muestras histológicas a Charles Louis Alphonse Laveran, Premio Nobel por sus estudios sobre paludismo, que en aquel momento trabajaba en el Instituto Pasteur de París y era uno de los parasitólogos de mayor prestigio mundial.

En el Instituto parisino dos discípulos de Laveran, el matrimonio Delanöe, estaban estudiando las infecciones presentes en las ratas de las cloacas de París y observaron quistes similares en los pulmones de estos animales que no podían estar infectados por tripanosomas. De esta forma en 1912 pudieron aclarar, revisando las publicaciones previas y las preparaciones de Carini, que esos peculiares quistes observados por Chagas y Carini pertenecían en realidad a un nuevo género y especie desconocidos sin relación con los tripanosomas. El matrimonio Delanöe sugirió para el nuevo microorganismo el nombre de *Pneumocystis carinii*. *Pneumo-* por su tropismo por el pulmón; *-cystis* por su morfología característica, y *carinii* en honor del Dr. Antonio Carini que les había facilitado sus preparaciones histológicas (Delanöe & Delanöe, 1912).

En 1913, Arãgao sugirió que este nuevo organismo debería colocarse dentro del género *Klebsiella*, aunque reconoció su semejanza con otro protozoo encontrado en el intestino de los ratones, el *Cryptosporidium*. Comenzaban así las dudas sobre su ubicación taxonómica que llevaron a que durante mucho tiempo se le considerara un protozoo. (Calderón-Sandubete et al., 2002)

Los pocos estudios que siguieron a estas descripciones iniciales estuvieron orientados a conocer la distribución de *Pneumocystis* en el reino animal. Su presencia en una gran variedad de mamíferos (ratas, cobayas, monos y conejos en Brasil, ratas y ratones en Gran Bretaña y ratones en Suiza) sin evidencia de enfermedad hizo cuestionar su patogenicidad y que el interés por su estudio decayera. (Porter, 1915).

El año inmediatamente anterior al inicio de la Segunda Guerra Mundial dos autores de forma independiente describieron por separado una forma de neumonía de origen desconocido que afectaba típicamente a recién nacidos prematuros y a niños malnutridos, la cual se denominó neumonía intersticial de células plasmáticas y adquirió proporciones epidémicas en Europa Central en el preludio de la Segunda Guerra Mundial y en los años inmediatamente posteriores (Ammich, 1938; Benecke, 1938).

En pleno apogeo de la guerra, dos científicos holandeses, van der Meer y Brug (1942) demuestran por primera vez una asociación histológica entre la neumonía

intersticial de células plasmáticas y *Pneumocystis*, aunque su descubrimiento pasó casi inadvertido. Una década después, tres investigadores checos, Vanêk, Jírovec y Lukes (1953) hallaron la etiología de esta forma de neumonía, por lo que son considerados con frecuencia como sus primeros descubridores (Calderón-Sandubete et al., 2002).

En 1974, Peter Walzer y sus colaboradores (1974) realizaron el primer estudio clínico amplio, al recopilar datos de 194 casos confirmados de PcP. Esta investigación arrojó que la malnutrición era un factor de riesgo para desarrollar la enfermedad y demostró además que esta neumonía podía presentarse en los pacientes con leucemias, linfomas, tumores sólidos y trasplantados.

Los años entre 1970 y 1980 resultaron muy importantes en el estudio de *Pneumocystis*, porque unido al conocimiento alcanzado mediante la microscopía electrónica y los métodos de tinción existentes (plata metenamina de Gomori y Giemsa), aparecieron los primeros estudios con anticuerpos aislados de sueros de ratas. Los resultados fueron realmente sorprendentes porque los anticuerpos procedentes de los sueros de ratas no reaccionaban con *Pneumocystis* obtenidos de humanos, pero sí lo hacían con otros procedentes de ratas. Estas diferencias inmunológicas condujeron a Frenkel (1976) a plantear la hipótesis de que la especie de *Pneumocystis* que afectaba al hombre era diferente de la que infectaba a las ratas, a pesar de no poseer diferencias morfológicas distinguibles. El nuevo nombre propuesto sería *Pneumocystis jiroveci* en honor al científico checo Otto Jirovec, quien en 1951 relacionara el patógeno con la neumonía que aparecía en los niños prematuros y malnutridos como hemos visto previamente.

En febrero de 1981, Sandra Ford, una auxiliar de farmacia de los centros para la prevención y el control de las enfermedades (CDC) de EE. UU., notó un incremento inusual de las peticiones de pentamidina para el tratamiento de la neumonía por *Pneumocystis* que le llegaban desde Nueva York y se dio cuenta además que no correspondían a sujetos con causas conocidas de inmunodepresión. Envío una carta a sus superiores alertándolos de estos hechos, que constituían la primera evidencia de la eclosión de la epidemia de SIDA. Se descubría de esa manera los primeros casos de SIDA gracias a la infección de pacientes por este patógeno oportunista (Calderón-Sandubete et al., 2002).

Desde ese momento y hasta la actualidad se reconoce a *Pneumocystis* como uno de los principales patógenos oportunistas que afectan tanto a pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) como a sujetos que presentan cualquier otra causa de inmunosupresión (Morris et al., 2004).

1.3.3 TAXONOMÍA

La clasificación taxonómica de *Pneumocystis* ha sido problemática desde su descubrimiento y ha cambiado a lo largo de los años. Tras su identificación y durante años, *Pneumocystis* fue considerado un protozoo, debido a sus características morfológicas, su resistencia a los antifúngicos clásicos y su respuesta al tratamiento con pentamidina. Edman y colaboradores (1988) encontraron que la secuencia nucleotídica del gen 16 S del ARN ribosómico de *Pneumocystis* presentaba mayor similitud a la de los hongos que a la de los protozoos. Estos mismos resultados fueron corroborados por Stringer y sus colaboradores (1989) un año más tarde.

Además, otros genes importantes como la subunidad mayor del ARN del ribosoma mitocondrial (mt LSU rRNA) y otros siete genes contiguos mitocondriales mostraron una significativa homología con sus respectivos genes en los hongos. *Pneumocystis* tiene también la presencia de un tercer factor de elongación en la síntesis proteica, elemento necesario para realizar este proceso en los hongos y no así en los demás seres eucariotas. Finalmente, la timidilato sintasa (TS) y la dihidrofolato reductasa (DHFR) en *Pneumocystis* son dos enzimas diferentes, mientras que en los protozoos es una proteína con doble función. (Calderón-Sandubete et al., 2002).

Las técnicas moleculares también pusieron de manifiesto que existía una gran heterogeneidad genética en *Pneumocystis* y una estrecha relación con la especie del huésped (Dei-Cas et al., 1998). Para reflejar estas diferencias se propuso en 1994 de forma provisional un sistema de denominación trinomial que utilizaba la denominación *Pneumocystis carinii* en todos los casos seguida de "*forma specialis*" (f. sp.). En este sistema, el microorganismo que infecta a los humanos correspondía a *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis*, mientras que *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii* es una de las especies que infecta a las ratas y *Pneumocystis carinii* f. sp. *murine* el que infecta al ratón (*Pneumocystis* Workshop. Revised nomenclature for *Pneumocystis carinii*, 1994).

No obstante, Frenkel en 1976 ya había propuesto el nombre de *Pneumocystis jirovecii* para el patógeno que infecta al hombre que en aquel momento se consideraba un protozoo por lo que el nombre se encontraba en concordancia con la Nomenclatura Internacional de Códigos Zoológicos. Sin embargo, al demostrarse que *Pneumocystis* pertenecía al reino de los hongos, su nombre debía corresponder con la Nomenclatura Internacional de Códigos Botánicos (ICBN). Eso conllevó a que cambiara el nombre anterior por el de *Pneumocystis jirovecii* (ICBN artículos 32.7 y 60.11). Su ubicación taxonómica actual es en el Reino: Fungi, Phylum: Ascomycota, Clase:

Pneumocystidomycetes, Orden: Pneumocystidales y Familia: Pneumocystidaceae. (Redhead, Cushion, Frenkel & Stringer, 2006).

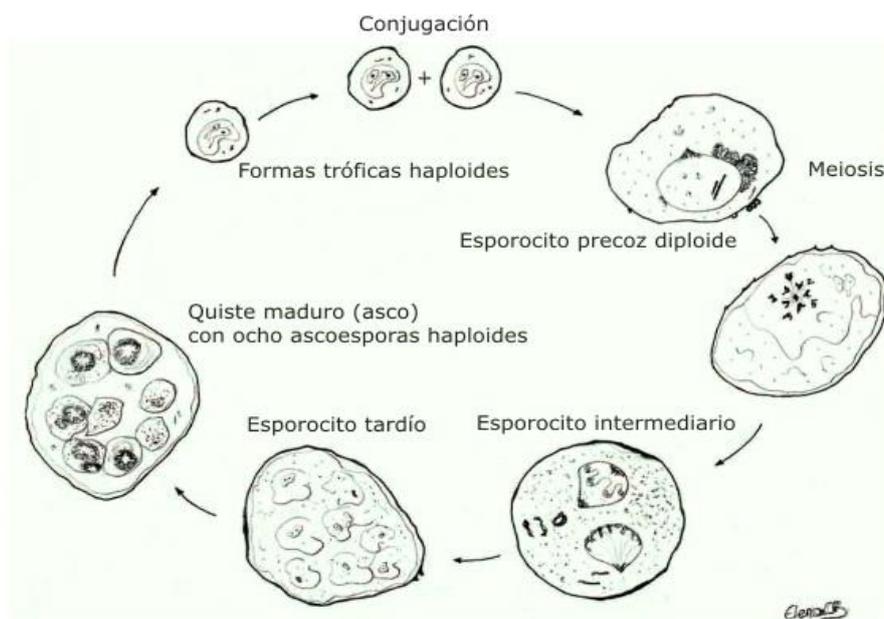
1.3.4 EPIDEMIOLOGÍA

Pneumocystis jirovecii es un hongo atípico, extracelular, ubicuo, unicelular, no cultivable y con marcado estenoxenismo. Habitualmente se encuentra restringido a los pulmones, aunque se ha demostrado su presencia en otros órganos en pacientes muy inmunodeprimidos. En la actualidad se han registrado casos de PcP en todos los continentes del mundo, excepto en la Antártica (Kovacs & Masur, 2009).

Microbiología

El ciclo de vida de *Pneumocystis* no se conoce completamente debido a las limitaciones de su cultivo *in vitro*. Se distinguen tres formas morfológicas: las tróficas, las esporocíticas y los quistes maduros. Cada una de ellas difiere en cuanto a su forma, tamaño y diámetro de la pared celular. Se considera que las formas tróficas son el estadio más abundante en el ciclo de vida del organismo, representando entre un 90 a un 95% de la población de *Pneumocystis* en el pulmón del paciente infectado, pudiendo presentar formas de reproducción sexual y asexual (Aliouat-Denis et al., 2009)

FIGURA 2.



Modificado por Elena Calderón de Aliouat-Denis et al., 2009

Las diferencias estructurales de la membrana de *Pneumocystis* frente al resto de los hongos radican en que éste presenta colesterol en su membrana, siendo ésta una característica de los mamíferos, y que por otro lado, carece de ergosterol en ella, lípido constitutivo de los hongos, provocando así su resistencia natural a la anfotericina B y otros antifúngicos (Wakefield, Stringer, Tamburrini & Dei-Cas, 1998).

Desde el punto de vista proteico, la glicoproteína mayor de superficie (MSG), es la más abundante en el microorganismo, presentando una gran variabilidad antigénica, que probablemente sirva como mecanismo para evadir la respuesta inmune del huésped. Otras proteínas importantes serían la PCSTE20 y la PCMAPK, que participan en los cambios morfológicos, el ciclo sexual y en la unión del hongo a las células del epitelio alveolar (Kottom, Köhler, Thomas, Fink & Limper, 2003).

La importancia de la DHPS radica en su posible vínculo con la resistencia a las sulfamidas. Por otra parte, la identificación de mutaciones presentes en el gen que controla la síntesis de esta enzima resulta útil para estudios de epidemiología molecular de *Pneumocystis* (Friaza, Morilla, Respaldiza, de la Horra & Calderón, 2010).

Recientemente se ha conseguido completar la secuenciación de los genomas de *P. carinii* y *P. jirovecii* lo que ayudará a esclarecer cuestiones importantes sobre la biología del microorganismo (Sesterhenn TM, 2010; Cissé, Pagni & Hauser, 2012; Cushion & Keely, 2013).

Prevalencia e incidencia

Hasta 1980 la PcP no era frecuente y se asociaba con síndromes de inmunodeficiencias adquiridas o situaciones de intensa inmunosupresión, en especial con la quimioterapia oncológica. En la pandemia del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), la neumonía por *Pneumocystis* emergió como la enfermedad más común definitoria de SIDA en los países industrializados. Antes de la introducción de la profilaxis, el 60% de los pacientes con SIDA eran identificados por presentarla. Además, se estimó que hasta un 80% de los pacientes con recuentos de linfocitos CD4⁺ menores que 200 células/mm³ podían desarrollar esta enfermedad. (Helweg-Larsen, 2004).

En la era de la terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA) ha existido una franca disminución de muchas infecciones oportunistas y la PcP no es una excepción. Los casos de PcP disminuyeron anualmente un 3,2% desde 1992 hasta 1995 con la utilización

de quimioprofilaxis, y después con la introducción de la TARGA la tasa continuó descendiendo hasta valores de 21,5% por año desde 1996 hasta 1998. En la actualidad, la PcP presenta una incidencia de 9,5 episodios por 100 personas al año en pacientes infectados por el VIH y se observa en más del 50% de los pacientes con SIDA (Morris et al., 2004).

Actualmente la neumocistosis ha adquirido una importancia creciente, sobre todo, en sujetos inmunodeprimidos no infectados por el VIH, como pacientes con cáncer, neoplasias hematológicas, enfermedades inflamatorias crónicas o sistémicas donde se utilizan fármacos inmunodepresores potentes y en receptores de trasplante de cualquier tipo. La incidencia de la enfermedad entre estos grupos de pacientes puede alcanzar hasta el 40 %, con un 50% de mortalidad (Russian & Levine, 2001).

La incidencia de la PcP varía de acuerdo con el tipo de proceso: oscila entre un 22 y un 45% en aquellos pacientes con leucemia linfoblástica aguda o con linfoma no-Hodgkin; 25% en los individuos con rhabdomiosarcoma y 1,3 % en los sujetos con tumores sólidos que reciben tratamiento con esteroides. También, la PcP ha sido identificada como complicación del mieloma múltiple y la macroglobulinemia. Por otra parte, la PcP afecta a más del 25% de los pacientes con inmunodeficiencia severa combinada (Sepkowitz, 2002).

En los individuos sometidos a trasplante cardíaco se ha descrito una incidencia de PcP del 2 al 10 %, que varía de acuerdo con su distribución mundial. Por otra parte, se ha estimado una incidencia de PcP del 25 % en los pacientes sometidos a trasplantes de pulmón y de corazón-pulmón (Cisneros et al., 1998).

Yale y Limper (1996) revisaron las historias clínicas de 116 pacientes sin infección por el VIH con un primer diagnóstico de PcP en la Mayo Clinic, Rochester, entre 1985-1991, con el objetivo de ver las enfermedades subyacentes de estos enfermos y el uso de esteroides entre otros fármacos inmunosupresores. Más de la mitad de los pacientes (57%) no presentaban ninguna enfermedad neoplásica. La gran mayoría tenían de base alguna enfermedad inflamatoria o autoinmune, representando los pacientes trasplantados un 25% del total.

La mayoría de los pacientes recibieron esteroides el mes previo al desarrollo de la PcP con una dosis de prednisona de 30mg/día o dosis equivalentes de otros esteroides. Sin embargo hasta en un 25% de ellos la dosis media de prednisona fue menor de 16mg/día. Por lo que su análisis les llevo a ver que dosis de entre 16-30mg de prednisona o equivalentes durante al menos 12 semanas (aunque describieron algunos casos en la sexta

semana) eran un factor de riesgo independiente para el desarrollo de esta infección. Sin embargo, también se han descrito casos de PcP en pacientes que reciben altas dosis de esteroides de forma puntual (Yale & Limper, 1996).

De la misma forma, otros fármacos inmunosupresores como el metotrexato, la ciclosporina y la ciclofosfamida también se han asociado con el desarrollo de PcP (Hardy, Wajszczuk, Suffredini, Hakala, & Ho, 1984; Perruquet, Harrington & Davis, 1983). Análogos de las purinas como la azatioprina, la cladribina o la fludarabina, solas, o en combinación con otros fármacos, también se han asociado a un aumento del riesgo de desarrollar PcP (Haberthür et al., 1994; Obeid et al., 2012).

Pero es actualmente con el desarrollo de los nuevos agentes inmunomoduladores como los inhibidores del TNF- α , de lo que hablaremos más tarde, y otros anticuerpos monoclonales (Rituximab, Alentuzumab, entre otros), donde se ha visto una nueva eclosión de casos de PcP (Laros-van Gorkom, Huisman, Wijermans & Schipperus, 2007; Kamel et al., 2010).

Por lo tanto, debe mantenerse un alto índice de sospecha por parte de los clínicos que ven a estos pacientes que están recibiendo o que han tomado inmunosupresores en el pasado. Esto además es particularmente importante si la condición médica subyacente en sí también afecta a las competencias inmunológicas del paciente.

1.3.5 CONCEPTO DE COLONIZACIÓN

Hoy día, como ya se ha comentado anteriormente, no se conoce de forma concreta el ciclo biológico de *P. jirovecii*, sin embargo, está bien establecido que este hongo atípico es estenoxénico, es decir, que tiene estricta especificidad por su huésped y recientemente se ha reconocido su capacidad de colonizar a los seres humanos (Wissmann, Morilla, Friaza, Calderón & Varela, 2010).

La colonización, se ha definido como la detección del microorganismo o de su ADN en muestras respiratorias tales como el lavado broncoalveolar (BAL), esputo, lavado orofaríngeo (LOF) o material nasofaríngeo de sujetos sin signos radiológicos específicos ni sintomatología alguna de neumonía, es decir, la persistencia en su hospedador sin producir aparentemente enfermedad. Este estado de portador asintomático (*carrier* en la literatura inglesa) o infección subclínica, jugaría un papel importante en el mecanismo de

transmisión de este microorganismo, ya que los sujetos colonizados podrían actuar como fuente de infección para pacientes susceptibles, como aquellos que presentan algún tipo de inmunosupresión. Por otra parte, los propios pacientes colonizados podrían desarrollar la PcP si presentasen una situación de inmunodepresión (Wissmann, 2010).

Durante años se consideró que la PcP se producía por reactivación de una infección latente y que debido a una situación puntual de inmunodepresión el huésped desarrollaba la infección en la forma activa. Esta idea se basaba en la alta prevalencia de anticuerpos frente a *P. jirovecii* encontradas en los estudios epidemiológicos realizados en niños. Sin embargo, por técnicas moleculares otros estudios demostraban que en pacientes con SIDA se podían producir recurrencias de la PcP por microorganismos genotípicamente diferentes (Keely & Stringer, 1997).

Así mismo, se ha descrito la existencia de variaciones geográficas en los genotipos de *P. jirovecii* en el hombre, como demuestra el estudio realizado en 5 ciudades de EE.UU: que encontraron relación entre el genotipo de *Pneumocystis* y el lugar de residencia, pero no con el lugar de nacimiento de los sujetos con PcP, lo que apoya la idea de una transmisión persona a persona en contra de la hipótesis de la reactivación de una infección latente (Beard et al., 2000).

A partir del concepto de infección *de novo*, viene la pregunta sobre cuál es el reservorio de esta infección. Se había propuesto un modelo de transmisión similar al de *Mycobacterium tuberculosis*. Se planteaba la vía aérea como vehículo, considerando que las formas tróficas de este hongo, con un tamaño de 2 a 4 μm , similar al bacilo tuberculoso (1-3 μm), pueden ser expectoradas por el paciente infectado y mediante gotitas de Pflugge adquiridas por los sujetos susceptibles (Ng, Yajko & Hadley, 1997). Sin embargo, estudios más recientes han demostrado que son las formas quísticas y no las tróficas las que tienen capacidad de transmitirse por vía aérea (Martinez et al., 2013).

Un estudio llevado a cabo usando un modelo animal ha demostrado que huéspedes sanos transitoriamente colonizados por *Pneumocystis* podrían servir como fuente de infección y reservorio de estos microorganismos (Chabe et al., 2004).

La transmisión interindividual de *P. jirovecii* desde pacientes hospitalizados con PcP se ha constatado en diferentes estudios que incluían una amplia gama de lugares: unidades pediátricas, salas de enfermedades infecciosas, unidades de cuidados intensivos, unidades de trasplantes o salas de oncología (Nevez et al., 2008).

Recientemente, se ha publicado la capacidad de un huésped colonizado por *Pneumocystis* de actuar como fuente de infección de la enfermedad en el seno de una familia española. En concreto se realizó un estudio epidemiológico mediante técnicas moleculares de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) donde se encontró que el genotipo que provocó la PcP en un recién nacido había sido el genotipo 1, probablemente transmitido vía aérea a través de sus abuelos, ya que ambos presentaban también el genotipo 1 del gen mtLSU rRNA (el abuelo también el genotipo 3) además de presentar todos ellos la forma silvestre del gen de la DHPS (Rivero et al., 2008). Sin embargo, en otros casos no ha existido suficiente evidencia para demostrar la transmisión interindividual del microorganismo, por lo que existen resultados contradictorios en la literatura (Olsson, Strålin & Holmberg, 2001).

En los últimos años, el fenómeno de la colonización ha despertado gran interés y se han realizado múltiples estudios que han mostrado la existencia de diferencias en las tasas de colonización entre diferentes grupos poblacionales. En pacientes adultos con infección VIH se han comunicado tasas de colonización entre el 46 y el 68% (Davis et al., 2008). Recientemente, se ha comunicado también una alta tasa de colonización del 40% en niños con infección VIH en nuestro medio, desarrollando uno de los pacientes colonizados una PcP durante el seguimiento de 50 semanas (Gutiérrez et al., 2011).

Por otra parte, también se ha observado la presencia de colonización en pacientes con enfermedades pulmonares crónicas, que pueden tener especial importancia en el ciclo de transmisión de este microorganismo al ser expectoradores crónicos. En este tipo de pacientes se han comunicado tasas de colonización en torno al 40% en pacientes con EPOC (Calderon et al., 2004), del 21% en pacientes con Fibrosis Quística (Respaldiza et al., 2005) y del 34% en sujetos con enfermedades pulmonares intersticiales difusas (Vidal et al., 2006).

1.3.6 CLÍNICA, RADIOLOGÍA Y EXÁMENES DE LABORATORIO.

Manifestaciones clínicas

Atendiendo a la edad y a la enfermedad de base responsable de la inmunodepresión, clásicamente se han diferenciado cuatro formas clínicas de infección por *Pneumocystis*: asintomática; infantil o neumonía intersticial de células plasmáticas;

neumonitis esporádica niño-adulto de pacientes inmunocomprometidos; e infección extrapulmonar. Además, recientemente habría que añadir a las clásicas la PcP asociada al síndrome de reconstitución inmune (Calderon, Gutiérrez-Rivero, Durand-Joly & Dei-Cas, 2010).

La PcP se presenta casi generalmente con fiebre, tos y disnea de esfuerzo. La tos normalmente es seca y no productiva. La disnea al inicio es a esfuerzos moderados, por lo que puede pasar inadvertida y progresar de modo gradual. La fatiga es una de las principales quejas de los pacientes, mientras que el dolor torácico de tipo pleurítico, los escalofríos, la hemoptisis y la sudoración nocturna son menos frecuentes. Por otra parte, la exploración clínica puede mostrar taquicardia, cianosis, y crepitantes finos en la auscultación de los afectados. (Thomas & Limper, 2004).

Las manifestaciones extrapulmonares no son comunes; sin embargo, la tiroiditis, la retinitis, la aparición de lesiones óseas y la presencia de *Pneumocystis* en cerebro, hígado, bazo y riñón se han descrito en alguna ocasión. (Panos, Karydis, Velakoulis & Falagas, 2007; Bartlett & Hulette, 1997; Guttler, Singer, Axline, Greaves & McGill, 1993; Dieterich, Lew, Bacon, Pearlman & Scholes, 1992). La afectación extrapulmonar suele ocurrir a pacientes que han estado en tratamiento profiláctico con pentamidina en aerosol o que estaban intensamente inmunocomprometidos, generalmente en estadios de SIDA muy avanzado.

La presentación clínica de los pacientes afectados por PcP difiere entre los pacientes inmunodeprimidos por el VIH y los paciente inmunodeprimidos por otras causas, tales como enfermedades hematológicas, tumores, enfermedades sistémicas o trasplantes. Así, los pacientes con infección VIH tienden a presentar una clínica subaguda, con aparición de disnea progresiva, tos no productiva o mínimamente productiva, fiebre de bajo grado y malestar general. En contraste, los pacientes inmunodeprimidos sin infección por el VIH suelen presentar una clínica más aguda, con disnea importante, fiebre alta, escalofríos y algunos pueden requerir inicialmente de forma urgente ventilación mecánica. De hecho, la insuficiencia respiratoria en este grupo lleva a una mortalidad total de hasta el 40% (Festic, Gajic, Limper & Aksamit, 2005). En contraposición con los pacientes con infección por el VIH donde la insuficiencia respiratoria que precisa ventilación mecánica no supera el 27%. (Huang, 2005).

Curiosamente, los pacientes con infección por el VIH suelen tener mayor cantidad de microorganismos en el lavado broncoalveolar (LBA) que los pacientes inmunodeprimidos sin esta infección, pero esto no parece correlacionarse con una peor

oxigenación. De hecho, se ha demostrado contrariamente, que los pacientes infectados por el VIH con PcP tienden a tener mayores presiones arteriales de oxígeno y un gradiente alevolo-arterial de oxígeno menor que los pacientes sin infección por el VIH. En contraste, el número de neutrófilos y células proinflamatorias parece que se correlaciona más que el número de microorganismos con el grado de oxigenación durante el desarrollo de una PCP, lo que sugiere que los pacientes que presentan una mayor respuesta inflamatoria están sometidos a un mayor riesgo de desarrollar una insuficiencia respiratoria aguda en comparación con los que presenten unos niveles de inflamación local pulmonar menores (Limper, Offord, Smith & Martin II, 1989).

En este sentido, se ha publicado que las tasas de mortalidad por PcP son diferentes en estos dos grupos, en aquello sin infección VIH oscilan entre el 30 y el 60 %, frente al 10-20% de los pacientes con infección por el VIH (Thomas & Limper, 2004).

Manifestaciones radiológicas

Los hallazgos radiológicos de la PcP generalmente no son específicos y pueden variar desde una radiografía de tórax normal (10-39%) o casi normal, asociada a un mejor pronóstico de la enfermedad, a diferentes grados de infiltrados pulmonares, generalmente bilaterales y simétricos. En pacientes con infección por el VIH con cuadro clínico compatible esta radiología típica se correlaciona altamente con la probabilidad diagnóstica de PcP, no siendo así en pacientes inmunodeprimidos sin infección por el VIH donde la radiología no es tan útil por ser poco expresiva o muy variable. (Opravil et al., 1994).

Otros patrones menos comunes serían: los infiltrados lobares, los nódulos pulmonares, los neumatoceles y otros cambios quísticos, y la parición de neumotórax. (Jasmer et al., 2000). Estas alteraciones son de nuevo más frecuentes en pacientes intensamente inmunocomprometidos y en los pacientes tratados con pentamidina en aerosol (Edelstein & McCabe, 1990).

A veces ante la sintomatología clínica, y una radiografía de tórax normal es necesario recurrir a enfoques radiológicos más sensibles como la tomografía axial computerizada de tórax de alta resolución (TACAR). El hallazgos más típico en TACAR es la presencia de opacidades bilaterales en vidrio esmerilado y menos frecuentemente lesiones reticulares, granulares, o la aparición de lesiones quísticas. (Hidalgo et al., 2003). Otras técnicas radiológicas como la tomografía por emisión de positrones con 18-

fluorodeoxiglucosa (FDG-PET) y la gammagrafía con Ga-67 han sido utilizadas como herramientas potenciales para ayudar en el diagnóstico precoz de la PcP (Zhuang & Alavi, 2002). Pero actualmente, debido a las técnicas de biología molecular, están en desuso.

Exámenes de laboratorio

Los exámenes de laboratorio de rutina no son útiles para el diagnóstico de la PcP y frecuentemente reflejan las alteraciones producidas por la enfermedad subyacente del paciente. Diferentes estudios han mostrado valores elevados de lactato deshidrogenada (LDH) en sueros de pacientes con esta enfermedad con una sensibilidad del 82 al 100 % (Tasaka et al., 2007). No obstante, su interpretación debe ser muy prudente y cautelosa, porque también existen casos confirmados con valores normales.

La determinación sérica de 1-3 b-D-glucano, el principal componente de la pared celular de muchos hongos, es una prueba útil para el diagnóstico de la candidiasis y la aspergilosis invasiva, pero también puede emplearse para la PcP. En este sentido, Tasaka y colaboradores (2010) encontraron una sensibilidad del 92,3 % y una especificidad del 86,1 % para esta prueba en pacientes con PcP. Otros autores observaron una reducción en los niveles de 1-3 b-D-glucano en pacientes con PcP que respondían al tratamiento, lo cual sugiere que esta prueba podría ser útil para monitorizar la respuesta terapéutica (Nakamura et al., 2009). Por otra parte, Shimizu y colaboradores (2009) han mostrado que los niveles séricos de 1-3 b-D-glucano pueden ser útiles para distinguir la colonización por *P. jirovecii* de la PcP en pacientes con neumopatías intersticiales.

1.3.7 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

La herramienta de diagnóstico más importante para la infección por *Pneumocystis* es una alta sospecha clínica. En el ámbito clínico, un paciente inmunodeprimido con aparición de disnea o síntomas compatibles con esta neumonía, con o sin los hallazgos radiológicos específicos, debe hacernos sospechar y realizar una búsqueda activa de este patógeno, sobre todo si no están recibiendo quimioprofilaxis.

No disponer de un medio de cultivo *in vitro* para *Pneumocystis* constituye una limitación importante. Durante muchos años, el diagnóstico de la infección por *P. jirovecii* se ha basado en la visualización microscópica del microorganismo, usando técnicas como

el Azul de Toluidina y el Giemsa o con técnicas de inmunofluorescencia usando anticuerpos monoclonales en muestras respiratorias. La sensibilidad de estas técnicas depende de varios factores tales como el tipo de muestra (LBA, esputo, tejidos, etc.) y la calidad de las mismas, el número de organismos presentes y la experiencia del personal del laboratorio. Además, todas estas pruebas tienen sus propias ventajas y desventajas.

Estas técnicas, que resultan útiles en casos de PcP en pacientes con infección por VIH con alta carga de microorganismos, carecen de suficiente sensibilidad para el estudio de pacientes con esta neumonía sin infección VIH o para el estudio de la colonización donde las cargas parasitarias también son mucho menores. Por este motivo se han desarrollado técnicas de diagnóstico molecular más sensibles basadas en la amplificación y detección de fragmentos del ADN de *Pneumocystis* y en los últimos 20 años se ha podido identificar la presencia de este microorganismo en diferentes muestras clínicas: LBA, LOF, esputo, o aspirados nasofaríngeo, tanto en pacientes con PcP como en colonizados (Calderon, Gutiérrez-Rivero, Durand-Joly & Dei-Cas E, 2010).

Se han desarrollado múltiples protocolos que utilizan distintos genes de *Pneumocystis*. La primera prueba de la utilidad del empleo de métodos moleculares para la detección de *P jirovecii* en muestras clínicas fue aportada por Anna Walkefield y sus colaboradores (1990). Desde entonces y hasta la actualidad, 17 genes del patógeno se han utilizado con fines diagnósticos y para estudios de caracterización genotípica (Ripamonti et al., 2009). Los principales genes utilizados incluyen el gen de la proteína de choque térmico (HSP70) (Huggett et al., 2008), el gen de la DHFR (Bandt & Monecke, 2007), gen de la DHPS (Alvarez-Martinez et al, 2006) y el gen de la CDC2 (Arcenas et al., 2006).

La amplificación mediante PCR del gen de la región mitocondrial de la subunidad mayor del ARN ribosomal (mtLSU rRNA) es la más utilizada; sobre todo, para estudios con fines diagnósticos y de epidemiología molecular, debido a que es un gen multicopia, que el ARN tiene menos viabilidad si el microorganismo no está presente (a diferencia del ADN) y que al ser mitocondrial presenta poca variabilidad porque no sufre recombinaciones, solo mutaciones generacionales. De hecho, esta técnica se ha propuesto como método de referencia para el estudio de la infección por este hongo (Helweg-Larsen, Jensen & Lundgren, 1997).

Se han encontrado diferentes polimorfismos para el mtLSU rRNA que establecerían unos genotipos determinados, de entre ellos, los más prevalentes serían: tipo 1 (85 C/248 C), tipo 2 (85 A/248 C) y tipo 3 (85 T/248 C)(Montes-Cano M et al, 2009)

Por otra parte, la utilización de un protocolo de PCR anidada para esta región genómica ha demostrado tener una alta sensibilidad, de más del 95%, y una buena especificidad, cercana al 88%, para detectar la presencia de colonización por *P. jirovecii* en pacientes no inmunodeprimidos utilizando muestras de LOF lo que resulta especialmente interesante para su aplicación en estudios epidemiológicos (Respaldiza et al, 2006).

Otro gen objeto de especial interés es el que codifica la DHPS por su posible vinculación al desarrollo de resistencias a las sulfamidas. Por lo que, estudios orientados a detectar la presencia de mutaciones en el gen de la DHPS y su relación a la respuesta al tratamiento o a la profilaxis están en auge (Calderon et al., 2004).

1.3.8. TRATAMIENTO Y PROFILAXIS

Tratamiento

El tratamiento recomendado de la PcP se ha mantenido sin cambios durante muchos años, siendo trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMX) el fármaco de elección de primera línea. En cuanto a los agentes de segunda línea los datos son más limitados. La duración media del tratamiento en pacientes con infección por el VIH debe ser 21 días, mientras que los pacientes sin infección por el VIH la duración podría ser de dos semanas, aunque siempre dependerá de la evolución clínica del enfermo y de la decisión de su médico. A continuación, se expone en la tabla 2, las pautas habituales de tratamiento para la PcP:

Tabla 2: PAUTAS DE TRATAMIENTO PARA PCP

FÁRMACO	DOSIS Y VÍA DE ADMINISTRACIÓN	INDICACIONES / COMENTARIOS
DE ELECCIÓN		
TMP-SMX	15-20mg/kg/día (TMP) +	Iv para casos graves
	75-100mg/kg/día (SMX)	Vía oral para casos leves o moderados
	Iv u oral (3-4 dosis al día)	Puede cambiarse de vía iv a oral cuando exista una mejoría clínica
TRATAMIENTOS		
		Deben monitorizarse los fármacos

ALTERNATIVOS		
Pentamidina	4mg/kg/día iv o im	Casos moderados o graves Alta frecuencia de toxicidad
Primaquina + clindamicina	30mg/día oral + 600mg/ 3 veces al día	Casos moderados o graves Realizar test del déficit de G6PD previo al uso de primaquina por riesgo de hemólisis
Atrovaquona	750mg dos veces al día	Casos leves o moderados
TMP + dapsona	5mg/kg 3 veces al día + 100mg/día	Casos leves o moderados Riesgo de metahemoglobinemia y hemólisis. Realizar test del déficit de G6PD

* Terapias complementarias

El uso de corticosteroides puede reducir la respuesta inflamatoria pulmonar causada después de iniciar el tratamiento para la PcP. En pacientes con SIDA se ha relacionado con un beneficio significativo en la prevención del deterioro de la oxigenación en los primeros siete días de tratamiento, la mortalidad y la intubación, con un 50% de reducción. (Briel, Boscacci, Furrer & Bucher, 2005). Estarán indicados en pacientes infectados por VIH con una PcP moderada-grave que presenten hipoxemia ($PaO_2 < 70$ mm Hg aire ambiente o un gradiente alveolo-arterial de oxígeno > 35). En estos casos, los corticosteroides se deben administrar lo antes posible dentro de las 72 horas después de comenzar el tratamiento antibiótico. En los pacientes sin infección por VIH y con PcP grave una dosis de 60 mg o más de prednisona parece presentar mejores resultados (Pareja, Garland & Koziel, 1998).

* Nuevos abordajes

Una de las características de identificación de *P. jirovecii* es la presencia de (1,3) -b - D- glucano en su pared celular (Kottom TJ and Limper AH. 2000), por lo que las equinocandinas como la caspofungina, que tienen como objetivo la síntesis de (1,3) -b- D- glucano, están siendo utilizadas para el tratamiento de la PcP con éxito (Annaloro et al 2006, Armstrong-James et al 2011)

Profilaxis

A pesar de que la mayoría de las guías clínicas sobre profilaxis primaria y secundaria se han realizado en pacientes infectados por el VIH, cada día toman más importancia aquellos pacientes inmunodeprimidos sin infección por el VIH, en especial aquellos que están recibiendo esteroides y otros fármacos inmunosupresores, ya que deberían ser considerados sujetos en riesgo de desarrollar una PcP, por lo que se beneficiarían de la profilaxis frente a *Pneumocystis*, tal y como se propuso en 2006 en el *Official American Thoracic Society Workshop on Pneumocystis* (Huang, Morris, Limper & Beck, 2006).

Como ya se comentó anteriormente, la PcP, que fue la causa más común de muerte entre los pacientes infectados por el VIH antes de la llegada de la profilaxis de rutina, continua siendo la etiología más frecuente de infección oportunista grave en estos pacientes. Las guías recomiendan iniciar la profilaxis primaria frente a PcP en personas con infección por el VIH, en adolescentes y adultos, incluyendo embarazadas y los pacientes bajo TARGA, cuando el recuento de células CD4 es inferior a 200 células/mm³ (o CD4 menores de un 15% de los linfocitos totales con alguna enfermedad definitiva de SIDA) o el paciente tiene antecedentes de candidiasis orofaríngea (Panel de expertos de Grupo de Estudio del Sida 2008)

Las recomendaciones de profilaxis para niños infectados por el VIH dependen de la edad. La quimioprofilaxis debe realizarse siempre en niños de seis años o más, basado en las directrices de adultos, para niños de uno a cinco años si el recuento de CD4 es inferior a 500 células/mm³ o porcentaje de CD4 es inferior al 15%, y para todos los lactantes infectados por el VIH menores de 12 meses y recomiendan la profilaxis secundaria a todos aquellos pacientes con infección VIH que han presentado una PcP y suspender según los criterios generales. En cuanto a los sujetos sin infección VIH no existen suficientes datos, pero se recomienda continuar la profilaxis hasta que desaparezca la situación de inmunodepresión. La profilaxis se debe suspender en pacientes infectados por VIH, adultos y adolescentes, que han respondido a la terapia TARGA con un aumento de células CD4 mayores de 200 células/mm³ durante más de tres meses. La profilaxis debe ser introducida de nuevo si el recuento de células CD4 disminuye a menos de 200 células/mm³. (Centers for Disease Control and Prevention, 2009; Mofenson et al., 2009).

A continuación, se expone en la tabla 3 las pautas habituales de profilaxis para la PcP:

Tabla 3: PAUTAS HABITUALES DE PROFILAXIS FRENTE A PCP

FÁRMACO	DOSIS Y VÍA DE ADMINISTRACIÓN
DE ELECCIÓN	
TMP-SMX	TMP 160mg/SMX 800mg 1 comprimido al día TMP 160mg/SMX 800mg 1 comprimido 3 veces a la semana TMP 80mg/SMX 400mg 1 comprimido al día
TRATAMIENTOS ALTERNATIVOS	
Dapsona	50mg dos veces al día o 100mg al día
Atrovaquona	750mg dos veces al día o 1500mg en suspensión
Pentamidina	300mg en aerosol o 4mg/kg iv de forma mensual

1.4. NEUMONIA POR *PNEUMOCYSTIS JIROVECHII* COMO COMPLICACIÓN DEL TRATAMIENTO CON FÁRMACOS ANTI-FACOTR DE NECROSIS TUMORAL.

Kaur y Mahl (2007) revisaron los casos de pacientes en tratamiento con infliximab en los que se hubiese comunicado como efecto adverso el desarrollo de una PcP, entre Enero de 1998 y Diciembre de 2003 mediante la bases de datos de la FDA “Adverse Event Reporting System” (AERS). Se comunicaron 84 casos de PcP en relación con infliximab. Los pacientes presentaban una edad media de 55 años, con diferentes enfermedades sistémicas de base entre las que se encontraban: AR, EC, CU, EA, APs, dermatomiositis, Granulomatosis de Wegener y enfermedad de Still. Así mismo, seis de los 84 pacientes tenían enfermedad pulmonar crónica, incluyendo asma, fibrosis pulmonar y bronquitis. El tiempo medio entre la infusión de infliximab y el inicio de los síntomas de neumonía fue de 21 ± 18 días; (n = 40). Los pacientes habían recibido un promedio de $2,1 \pm 1,3$ infusiones antes de la aparición de los síntomas. Presentaron una mortalidad del 27 % (23 casos).

Posteriormente, Komano y colaboradores (2009) realizaron un estudio retrospectivo de casos y controles de 21 pacientes que desarrollaron PcP durante el tratamiento con infliximab para su AR, frente a los 102 pacientes con infliximab para AR que no la desarrollaron. Detectaron que la duración media del tiempo de la infusión de infliximab para el desarrollo de PcP fue de 8,5 semanas. La dosis media de prednisona y metotrexato fue de 7,5mg/día y 8mg/semana, respectivamente. Los pacientes con PcP tenía los niveles de albúmina sérica significativamente menor (p <0,001) y menores

niveles séricos de IgG ($p < 0,001$) que los pacientes sin PcP. Aunque 16 de los 21 pacientes con PcP desarrollaron insuficiencia respiratoria aguda, llama la atención que todos sobrevivieron. A pesar de que inicialmente el grupo de pacientes con PcP presentaba una mayor edad, un mayor porcentaje de enfermedades pulmonares crónicas y fueron tratados con una mayor dosis de esteroides al inicio del tratamiento de la AR, al realizar la corrección de Bonferroni los resultados no fueron estadísticamente significativos.

En Japón, se han llevado a cabo varios programas de vigilancia post-comercialización con los anti-TNF más usados en AR, realizándose un seguimiento para detectar los efectos adversos documentados con el uso de estos fármacos. Inicialmente se realizó con Infliximab, donde se incluyeron a todos los pacientes con AR que recibían tratamiento con infliximab, con un período de seguimiento de seis meses para cada paciente (Takeuchi et al., 2008). De los 5.000 pacientes seguidos, se notificaron 144 infecciones del tracto respiratorio superior tipo neumonía, donde se identificaron 108 pacientes (2,2%) con neumonía bacteriana, 14 pacientes (0,3%) con tuberculosis y 22 pacientes (0,4%) con PcP, proporción mucho mayor que la comunicada en EE.UU. Asimismo, con el Etanercept, se ha realizado un estudio de vigilancia similar al anterior, donde se identificaron 16 casos (0,23%) que desarrollaron una PcP en el periodo de seguimiento de los 7.091 pacientes con AR que recibían etanercept incluidos. (Koike et al., 2011).

En el estudio post-comercialización del Adalimumab, también realizado en Japón entre junio 2008 y diciembre de 2009, se analizaron 3000 pacientes que recibían este fármaco para AR. Se notificaron 73 infecciones como efecto adverso, siendo las más comunes las del tracto respiratorio seguido de las de piel y partes blandas. De ellas, 35 fueron casos de neumonías (1,2% del total de pacientes) de las cuales 20 fueron graves, cuatro casos de tuberculosis y nueve casos de PcP grave (0,3% de todos los eventos adversos). Estos programas de vigilancia post-comercialización, muestran que la PcP es más común de lo esperado en pacientes que reciben terapia anti-TNF en Japón, mayor incluso que los casos de tuberculosis.

Por otro lado, en Australia y Nueva Zelanda, tal y como se ha comentado antes, en la serie de Lawrence y colaboradores (2010) se analizaron las complicaciones infecciosas graves en una población de 5562 pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal tratados con anti-TNF, infliximab y adalimumab, entre 1999 y 2009. Además de no encontrar de forma sorprendente ningún caso de tuberculosis (tres pacientes habían

recibido tratamiento para infección tuberculosa latente sin que presentaran reactivación) sí encontraron 14 infecciones graves (2.2% de la serie), siete de ellas ocurrieron en los primeros seis meses de tratamiento; de las cuales dos de ellas eran PcP.

Hasta el momento, no se han publicado en los estudios de postcomercialización ni en serie de casos de pacientes que están en tratamiento con golimumab ni certolizumab pegol, episodios de PcP directamente relacionados con estos fármacos. Probablemente esto se deba a que llevan poco tiempo en el mercado.

2 JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

La colonización podría suponer un riesgo para desarrollar PcP en pacientes tratados con anti-TNF.

En este sentido, en un estudio experimental con ratas que estaban colonizadas por *Pneumocystis carinii*, se pudo comprobar cómo al someterlas a inmunosupresión con corticoides desarrollaban en un periodo de seis a 14 semanas una PcP (Dei-Cas, Brun-Pascaud, Bille-Hansen, Allaert & Aliouat, 1998).

En otro estudio en pacientes trasplantados que recibían terapia inmunosupresora, se observó un caso de PcP en un paciente previamente colonizado que no estaba recibiendo profilaxis específica (Leigh, Wakefield, Peters, Hopkin & Collins, 1992). En la misma línea, Mori y colaboradores (2008) publicaron la aparición de una PcP en una persona mayor que estaba recibiendo pequeñas dosis de metotrexato y previamente estaba colonizada por *P. jirovecii*.

Todos estos datos refuerzan la idea de que la colonización por *P. jirovecii* constituye un riesgo para el desarrollo de PcP en sujetos sometidos a inmunosupresión. Sin embargo, no existe información suficiente sobre la frecuencia de colonización por *P. jirovecii* en paciente tratados con fármacos anti-TNF y su riesgo de desarrollar PcP.

3. HIPÓTESIS DE PARTIDA

TNF- α es una citoquina proinflamatoria que desempeña un papel fundamental en el control de la infección por *P. jirovecii*, por ello es posible que el efecto de los fármacos anti-TNF, al inhibir la acción de esta citoquina, pudiera favorecer tanto la colonización por *P. jirovecii* como el desarrollo posterior de PcP en los pacientes que reciben este tipo de tratamientos.

Actualmente no existe información suficiente sobre la frecuencia de colonización por *P. jirovecii* en paciente tratados con fármacos anti-TNF y su riesgo de desarrollar PcP.

4. OBJETIVOS

4.1.- Conocer la prevalencia de colonización por *Pneumocystis jirovecii* en pacientes que reciben tratamiento con fármacos anti- TNF- α (infliximab, adalimumab o etanercept) y si existe diferencia de prevalencia según el tipo de fármaco y enfermedad de base.

4.2.- Conocer las características epidemiológicas y los potenciales factores de riesgo para la colonización por *P. jirovecii* en estos pacientes. Presencia de enfermedad pulmonar previa, hábito tabáquico, tratamiento con corticoides sistémico, uso de otros inmunosupresores o empleo previo de sulfamidas, entre otros.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 POBLACIÓN

Se incluyeron pacientes no seleccionados con enfermedades autoinmunes sistémicas (AR, APS, PS, EA) atendidos en las consultas especializadas del Hospital Universitario Virgen del Rocío que recibían fármacos anti-TNF- α : infliximab, adalimumab o etanercept y que cumplieron todos los criterios de inclusión y no tenían causas de exclusión.

Criterios de inclusión:

- Pacientes mayores de 18 años
- Pacientes diagnosticados de artritis reumatoide (AR), artritis psoriásica (AP), psoriasis (PS) o espondilitis anquilosante (EA) que reciban fármacos anti-TNF por alguna de la indicaciones actuales
- Pacientes que firmen el consentimiento informado

Criterios de exclusión:

- Pacientes menores de 18 años
- Tratamiento con fármacos anti-TNF por uso compasivo fuera de las indicaciones actuales
- Pacientes con infección por VIH
- Pacientes con enfermedad neoplásica activa o que reciban tratamiento con quimioterapia
- Pacientes embarazadas

Como controles se incluyeron pacientes diagnosticados de AR, EA, APS atendidos en las mismas consultas que no recibían fármacos anti-TNF y que cumplieron el resto de criterios inclusión y no tuvieron causas de exclusión.

Tamaño muestral

Para el cálculo del tamaño muestral utilizamos como referencia la prevalencia de colonización por *P. jirovecii* del 20% encontrada en un estudio previo realizado entre el personal que se incorporaba a trabajar en nuestro centro y que no estaba recibiendo ningún tipo de tratamiento inmunosupresor (Medrano et al., 2005).

De esta forma, estimando una prevalencia en los pacientes controles sin tratamiento con fármacos anti-TNF del 20% y doble en los tratados con fármacos anti-TNF para una potencia del 75% y un nivel de confianza del 95% calculamos con el programa EPIDAT que se necesitarían 63 sujetos no expuestos a fármacos anti-TNF y 126 expuestos.

Finalmente se incluyeron un total de 195 pacientes, de los cuales, 63 fueron pacientes del grupo control sin antecedente ni uso actual de ningún fármaco biológico anti-TNF, 62 pacientes que recibían tratamiento con infliximab, 40 pacientes con etanercept y 30 pacientes con adalimumab.

Ámbito

El proyecto se ha realizado con la colaboración de los Servicios de Medicina Interna, Reumatología y Farmacia del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla.

Los estudios de las muestras biológicas se realizaron en las instalaciones con las que cuenta nuestro grupo de investigación en el Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS). Este grupo, coordinado por el director de esta tesis, que integra tanto a investigadores básicos como a clínicos cuenta ya con una contrastada trayectoria en el ámbito de la investigación en la epidemiología y la fisiopatología de la infección humana por *Pneumocystis*.

Método

Los pacientes se identificaron de forma consecutiva desde el Servicio de Farmacia del Hospital Universitario Virgen del Rocío en el momento en que se recibía la prescripción de estos fármacos del facultativo que los atendía. Cada paciente se incluyó en el estudio tras notificar al clínico responsable del paciente y obtener el consentimiento informado firmado del paciente.

A todos los pacientes incluidos en el estudio, se les realizó una encuesta clínico-epidemiológica específica donde se recogía información en cuanto a edad, sexo, hábito tabáquico, presencia de enfermedad pulmonar crónica previa, antecedente de neoplasia o

trasfusión sanguínea, uso de esteroides, uso de otros inmunosupresores y uso de profilaxis mediante fármacos frente a *Pneumocystis* en los últimos seis meses y antecedente de haber estado ingresado en el año previo a la recogida de muestras.

5.2 TÉCNICAS DE LABORATORIO

5.2.1 RECOGIDA DE MUESTRAS

En la visita donde se les realizó la encuesta clínico-epidemiológica se procedió a la obtención de las muestras de lavado orofaríngeo (LOF).

Para ello, cada paciente realizó un minuto de gargarismo con suero fisiológico estéril que después se recogió en un envase adecuado. En todos los casos la muestra fue inmediatamente criopreservada hasta su posterior estudio mediante técnicas moleculares en el laboratorio del IBiS. Las muestras de lavado orofaríngeo han sido validadas para la detección de la colonización de *Pneumocystis* en humanos en estudios previos realizados por nuestro grupo (Respaldiza et al., 2006).

5.2.2 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

*** Extracción de ADN**

La extracción de ADN se realizó a partir de cada alícuota de 500 µl de LOF con el Kit comercial NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel), previa digestión a 56°C, en agitación, durante 4 horas, con Proteinasa K a una concentración de 14mg/ml, EDTA 2mM y SDS al 10%. El ADN extraído se eluyó con 55 µl de agua ultrapura.

*** Detección de *P. jirovecii* mediante PCR a Tiempo Real**

Para la detección de *P. jirovecii* por la técnica de PCR a tiempo real (PCR-RT) se usó el equipo LightCycler 1.5 (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) y el LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Molecular Biochemicals). La

PCR-TR se realizó en un volumen final de 20 μ L, con los cebadores pAZ102-X y pAZ102-Y a una concentración de 250 nM cada uno, $MgCl_2$ 1mM y partiendo de 2 μ l de ADN de la muestra.

Tras una etapa inicial a 95°C durante ocho minutos para activar al enzima, la amplificación se realizó con 40 ciclos, incluyendo cada uno una etapa de desnaturalización (95°C durante 5 segundos), otra de annealing (55°C durante 15 segundos), extensión (72°C durante 10 segundos) y una etapa final a 76°C durante un segundo para medir la señal de fluorescencia únicamente de la sonda unida específicamente al ADN (Tabla III). El producto de amplificación se detectó usando el SYBR Green I, que emite fluorescencia cuando se une a la doble cadena de ADN. La tabla siguiente (tabla III) muestra el programa que se llevó a cabo. Se consideraron positivas las muestras que amplificaron antes del ciclo 35 y presentaban una T_m entre 77 y 82 °C.

Tabla 3: AMPLIFICACIÓN MEDIANTE PCR-TR

ETAPA	Nº CICLOS	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO
Desnaturalización	1	95	8 minutos
Amplificación	40	95	5 segundos
		55	15 segundos
		72	10 segundos
		76	1 segundo
Melting	1	95	30 segundos
		65	30 segundos
		95	0 segundos
Enfriamiento	1	40	30 segundos

* **Controles de Calidad**

Las muestras se procesaron en el laboratorio a ciegas y bajo código. La extracción del ADN, la preparación de la mezcla de reacción, la adición del ADN a la mezcla de la PCR, la amplificación por PCR y la detección se realizaron en diferentes áreas del laboratorio. Asimismo, para evitar falsos positivos, se utilizaron puntas con filtro en cada paso.

Por otra parte, en cada experimento se utilizaron controles positivos y negativos de agua estéril que permitieron detectar la posibilidad de contaminación cruzada.

En todas las muestras que resultaron negativas se estudió también la presencia del gen de la beta globina humana para descartar procesos de inhibición en la reacción de la PCR que pudieran estar condicionadas por la presencia de inhibidores de la amplificación del ADN en la mezcla de reacción o por una deficiente calidad de la muestra. Un resultado positivo utilizando la PCR para la beta globina humana con los cebadores BGLO-1 (5'-ACA CAA TGT GTT CAC TAG CA-3') y BGLO-2 (5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC -3') demostraba que un resultado negativo en la PCR de *P. jirovecii* no era debido a la inhibición de la reacción (Saiki, 1985).

*** Definición de colonización por *Pneumocystis***

Para los propósitos de este estudio, se consideró que un paciente estaba colonizado por *Pneumocystis jirovecii* cuando se identificó en muestras de enjuague orofaríngeo la presencia de ADN en dos extracciones mediante técnicas de PCR-RT en ausencia de síntomas o signos de neumonía. (Calderón, 2009; Wissmann, Morilla, Friaza, Calderón & Varela, 2010).

5.3 ANÁLISIS DE DATOS

Los datos epidemiológicos, clínico-biológicos y moleculares se recogieron en un formato informatizado. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico SPSS versión 18.0.

Los datos cuantitativos que presentan una distribución normal (Shapiro-Wilkins), se expresan con su media y su desviación estándar. Aquellos datos basales cuantitativos que no se distribuyen normalmente se expresan con su mediana y rango intercuartílico. Los datos cualitativos se expresan con una distribución de frecuencias.

Se ha realizado una estimación de la prevalencia de colonización por *P. jirovecii* de forma global en el grupo de casos y en los controles, así como para cada grupo de tratamiento.

Para la comparación de variables cualitativas se ha aplicado el test de X^2 con corrección de continuidad (Yates) y en aquellos casos en que fue necesario el test exacto de Fisher.

Para determinar la asociación entre la presencia de colonización y los diferentes factores considerados se ha utilizado la prueba de T de Student (o U de Mann-Whitney en caso de distribución no paramétrica).

Posteriormente para valorar correctamente la asociación se identificaron los posibles factores de confusión y modificadores del efecto existentes. Para ello, se ha llevado a cabo un análisis estratificado por los diferentes valores de las otras variables.

Una vez identificados los mencionados factores, se aplicó un modelo de regresión lineal para intentar controlarlos y minimizar su efecto.

5.4 ASPECTOS ÉTICOS

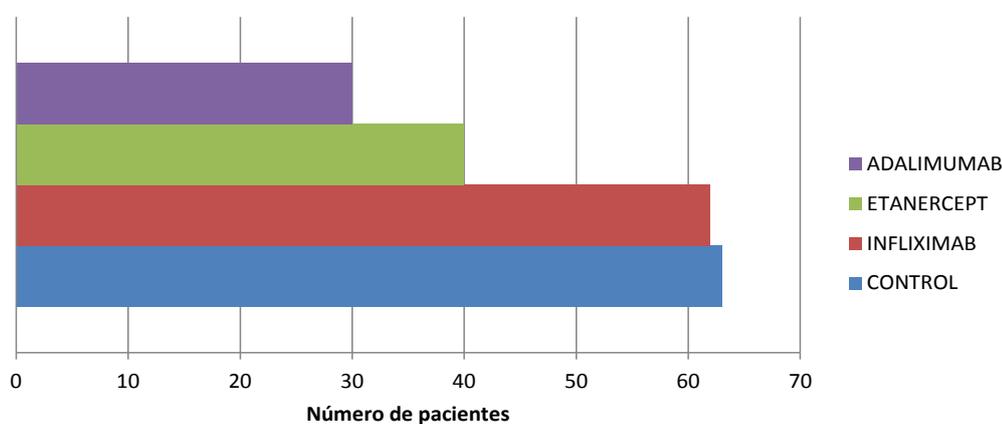
Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se han aplicado los principios éticos recogidos en la última revisión de la declaración de Helsinki. Los datos obtenidos en el estudio se han utilizado exclusivamente para obtener conclusiones científicas. La identidad de los pacientes se ha mantenido oculta a los investigadores del estudio y solo era conocida por el clínico responsable de cada paciente. El manejo de los pacientes donde se identificó la presencia de colonización por *P. jirovecii* se dejó a criterio de su médico responsable según la "*lex artis ad hoc*". En todos los casos se solicitó el consentimiento informado del paciente para participar en el estudio. Este proyecto ha contado con la aprobación del Comité Ético de los Hospitales Universitarios Virgen del Rocío de Sevilla al formar parte de un proyecto de investigación del programa ERA-Net PathoGenoMics: "*Pneumocystis* PathoGenoMics: Unravelling the colonization to disease shift" (GEN2006-27760-E/PAT).

6. RESULTADOS

6.1 DESCRIPCIÓN DE LOS GRUPOS DE PACIENTES

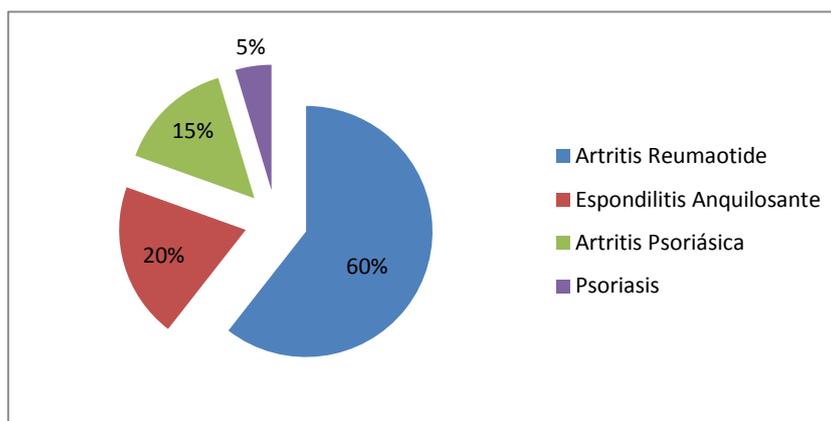
Tal y como se ha comentado previamente, los pacientes que se incluyeron en el estudio finalmente fueron un total de 195, con la siguiente distribución: 63 pacientes en el grupo control que no recibían ningún fármaco anti-TNF según criterio del clínico responsable de su atención y correspondían al 32,2% del total de pacientes, 62 pacientes que recibían infliximab y representaban un 31,8% del total de pacientes, 40 pacientes que recibían etanercept y que correspondían al 20,5% del total de la muestra y 30 pacientes que recibían adalimumab y por tanto, representaban al 15,4% del total de pacientes.

Tabla 4. DISTRIBUCIÓN DE LOS PACIENTES SEGÚN FÁRMACO



Las enfermedades de base de los pacientes fueron: AR en 118 pacientes representando un 60,5% siendo la enfermedad más prevalente, seguida de la EA con 39 pacientes representando un 20% de la muestra, y en menor medida la APs en 29 pacientes con 14,9% y la Ps en 9 pacientes con un 4,6% del total de todos ellos.

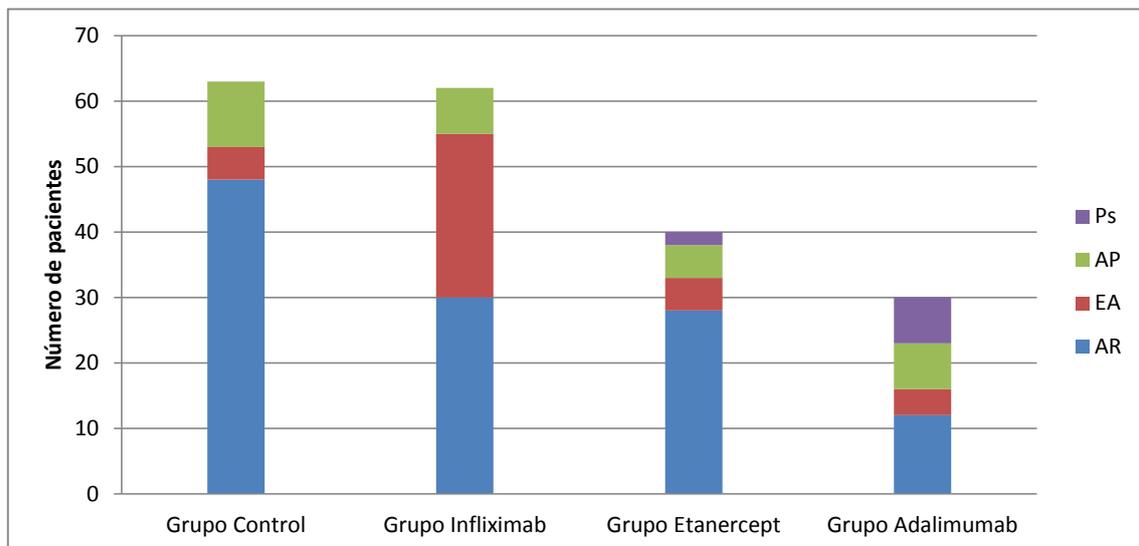
Tabla 5. ENFERMEDADES DE BASE



Si tenemos en cuenta el tipo de fármaco que recibían los pacientes, estas enfermedades sistémicas se distribuyeron de la siguiente manera:

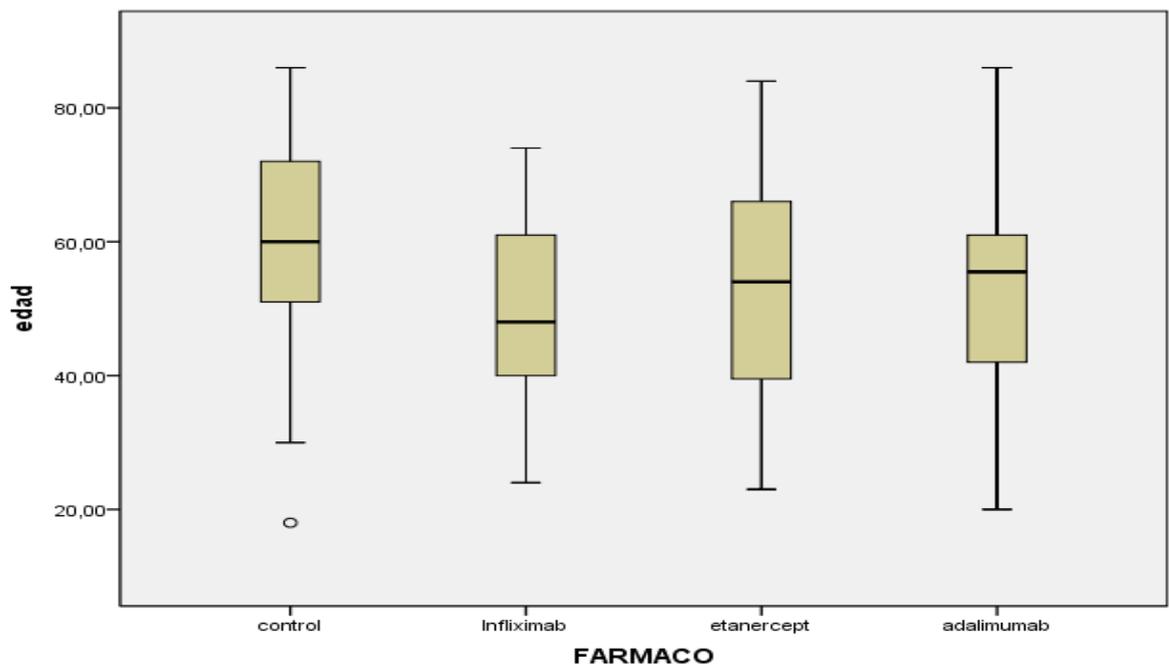
- En el grupo control de 63 pacientes, estaban diagnosticados de AR 48 pacientes (76,2%), de EA cinco pacientes (7,9%) y de AP 10 pacientes (15,9%). Para ninguna de estas enfermedades los pacientes estaban recibiendo ningún fármaco anti-TNF, sino que estaban tratados por sus clínicos con fármacos habituales no biológicos.
- En el grupo de 62 pacientes que recibía infliximab, estaban diagnosticados de AR 30 pacientes (48,4%), de EA 25 pacientes (40,3%) y de AP siete pacientes (11,3%).
- En el grupo de 40 pacientes que recibían etanercept, estaban diagnosticados de AR 28 pacientes (70%), de EA cinco pacientes (12,5%), de Ps dos pacientes (5%) y de AP cinco pacientes (12,5%).
- En el grupo de 30 pacientes que recibían adalimumab, estaban diagnosticados de AR 12 pacientes (40%), de EA cuatro pacientes (13,3%), de Ps siete pacientes (23,3%) y de APs siete pacientes (23,3%)

Tabla 6: DISTRIBUCIÓN DE PACIENTES SEGÚN ENFERMEDAD EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE TRATAMIENTO



En cuanto a la edad de los pacientes de nuestro estudio, la distribución fue la siguiente para los diferentes grupos:

- Grupo control: edad media $59 \pm 15,2$ años de con un rango de 18-86 años
- Grupo de infliximab: edad media $49,7 \pm 12,5$ años con un rango de 24-74 años
- Grupo de etanercept: edad media de $52,9 \pm 15,8$ con un rango de 23-84 años
- Grupo de adalimumab: edad media de $52 \pm 15,6$ con un rango de 20-86 años



En la tabla 7 se desglosarán las características de los pacientes que se incluyeron en cada grupo y los factores de riesgo que más se asocian a la presencia de colonización por *Pneumocystis jirovecii* según lo revisado en la literatura: edad (Fritzsche et al., 2012), hábito tabáquico (Morris et al., 2004), uso de esteroides (Helweg-Larsen et al., 2002), enfermedad pulmonar crónica (Calderon et al., 2004; Respaldiza et al., 2005; Vidal et al., 2006), inmunosupresores (Mori, Cho, Ichiyasu & Sugimoto, 2008) y otras características que creímos de interés.

De esta forma, el ser fumador activo o reciente estaba presente en 59 pacientes, lo que representa un 30,3% de la muestra; el antecedente de padecer alguna enfermedad pulmonar crónica, ya sea Enfermedad Pulmonar Osbtructiva Crónica (EPOC) o asma (ninguna neumopatía intersticial ni fibrosis quística) estaba presente en 22 pacientes, representando un 11,3%; mucho menos frecuentes eran: el antecedente de haber estado ingresado en el hospital en el último año con un 9,2% siendo por tanto 18 pacientes, el de trasfusión sanguínea con un 8,7%, es decir: 17 pacientes, el antecedente de neoplasia tan sólo presente en ocho pacientes al igual que el antecedente de haber estado bajo tratamiento con sulfamidas, representando cada uno el 4,1%, y por último el uso previo de azitromicina tan sólo presente en 4 pacientes, siendo así un 2,1%.

El uso previo de otro anti-TNF estaba presente en 21 pacientes, representado un 10,8% del total, de los cuales dos habían recibido previamente adalimumab, otros dos infliximab y otros 13 etanercept, siendo el motivo principal de la suspensión del fármaco biológico su ineficacia en conseguir un control adecuado de la actividad de la enfermedad de base.

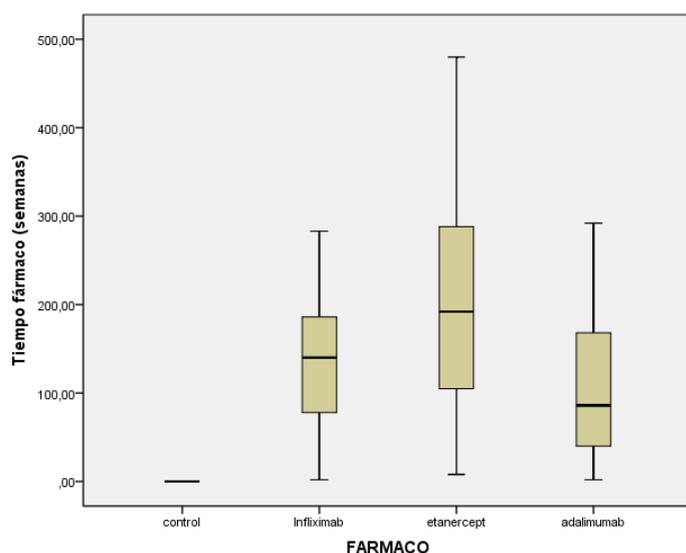
Tabla 7. CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DE LOS PACIENTES SEGÚN GRUPO

Características núm (% del total del grupo)	Grupo Control	Grupo Infliximab	Grupo Etanercept	Grupo Adalimumab
Sexo (H)	34 (54%)	28 (45,2%)	17 (42,5%)	11 (36,7%)
Edad	59 ± 15,2	49,7 ± 12,5	52,7 ± 15,8	52 ± 15,6
Fumador	14 (22%)	24 (38%)	16 (40%)	6 (20%)
Enfermedad respiratoria	6 (9,5%)	6 (9,7%)	5 (12,5%)	5 (16,7%)

Neoplasia	6 (9,5%)	1 (1,6%)	0	1 (3,3%)
Trasfusión previa	8 (12,7%)	1 (1,6%)	10 (4,6%)	4 (13,3%)
Uso previo de sulfamidas	0	8 (12,9%)	0	0
Uso previo de azitromicina	0	3 (4,8%)	0	1 (3,3%)
Ingreso último año	6 (9,5%)	8 (12,9%)	1 (2,5%)	3 (10%)
Uso previo de otro anti-TNF	0	3 (4,8%)	4 (10%)	14 (46,7%)
Uso actual de esteroides	31 (49,2%)	13 (21%)	12 (30%)	8 (26,7%)
Uso actual de metrotexato	38 (60%)	42 (67,7%)	12 (30%)	13 (43,3%)
Uso actual de leflunomida	11 (17,5%)	3(4,8%)	6 (15%)	2 (6,7%)

La duración del tratamiento biológico en el punto de corte de la obtención de la muestra del lavado orofaríngeo para analizar la presencia de colonización por *P. jirovecii* fue diferente según los grupos de tratamiento biológico, así en el grupo de infliximab la duración media del tratamiento fueron 128 semanas \pm 77,2 (rango de 2-283), en el grupo de etanercept fueron 202 semanas \pm 123 (rango de 8-480) y en el grupo de adalimumab la duración media del tratamiento fue de 110 semanas \pm 93 (rango de 2-292).

Tabla 8: DURACIÓN MEDIA DEL TRATAMIENTO SEGÚN FÁRMACOS



Por otro lado, la dosis media utilizada de tratamiento biológico en estos pacientes son las que actualmente se recomiendan según las guías de práctica clínica de las Sociedades de Reumatología y Dermatología Europeas, siendo por tanto: de infliximab dosis de 3-5mg/kg iv cada 6-8 semanas; de etanercept una dosis de 25-50mg sc cada 1-2 semanas y de adalimumab dosis de 40mg sc 1-2 semanas.

Para realizar un mejor abordaje estadístico y acorde con la hipótesis de la presente tesis doctoral, se han agrupado en un único grupo los pacientes que están recibiendo los tres tratamientos biológicos para compararlos posteriormente con el grupo control.

De esta manera, podemos observar que existen diferentes características en los dos grupos. El diagnóstico de AR es más frecuente en el grupo control que en la agrupación de los otros tres grupos (grupo llamado Anti-TNF), la EA y la Ps son más frecuentes en el grupo anti-TNF que en el control y la APs se distribuyó de forma similar. Los del grupo control presentaban mayor edad frente al grupo anti-TNF. No hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en cuanto al hábito tabáquico, antecedente de enfermedad respiratoria previa o neoplasia, el haber recibido una transfusión sanguínea en algún momento de su vida, el uso de antibióticos en los tres meses previos a la inclusión en el estudio como las sulfamidas o azitromicina, el uso actual de leflunomida o los ingresos hospitalarios en el último año.

En cuanto al uso actual de otros fármacos inmunosupresores que se han relacionado como factores de riesgo para la colonización por *P. jirovecii*, sí existe un mayor uso de esteroides en el grupo control frente al grupo Anti-TNF y una distribución similar en cuanto al uso de metotrexato en ambos grupos. El antecedente del uso de algún fármaco anti-TNF previamente es más frecuente en el grupo Anti-TNF, ya que se excluyeron estos pacientes en el grupo control.

Tabla 9: CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DE LOS PACIENTES AGRUPADOS SEGÚN RECIBAN O NO ANTI-TNF

Características núm (% del total del grupo)	Grupo Control (63 pacientes)	Grupo Anti-TNF (132 pacientes)	Valor de <i>p</i>
Diagnóstico de AR	48 (76,2%)	69 (52,3%)	<i>p</i> < 0,01*

Diagnóstico de EA	5 (7,9%)	34 (25,8%)	$p < 0,01^*$
Diagnóstico de Ps	0	9 (6,8%)	$p = 0,033^b$
Diagnóstico de AP	10 (15,9%)	19 (14,4%)	$p = 0,831^*$
Edad	$59 \pm 15,2$	$51,5 \pm 14,3$	$p < 0,043^a$
Sexo (H)	34 (54%)	56 (42%)	$p = 0,167^b$
Fumador	14 (22%)	45 (34,1%)	$p = 0,099^b$
Enfermedad respiratoria	6 (9,5%)	6 (9,7%)	$p = 0,592^*$
Neoplasia	6 (9,5%)	2 (1,5%)	$p = 0,15^b$
Trasfusión previa	8 (12,7%)	9 (6,8%)	$p = 0,173^*$
Uso previo de sulfamidas	0	8 (6,1%)	$p = 0,046$
Uso previo de azitromicina	0	4 (3%)	$p = 0,163^*$
Ingreso último año	6 (9,5%)	12 (9,1%)	$p = 0,922^*$
Uso previo de otro anti-TNF	0	21 (15,9%)	$p < 0,01^*$
Uso actual de esteroides	31 (49,2%)	33 (25%)	$p < 0,01^*$
Uso actual de metrotexato	38 (60%)	67 (50,8%)	$p = 0,223$
Uso actual de leflunomida	11 (17,5%)	11 (8,3%)	$p = 0,88$

* Test de Chi cuadrado de Pearson; ^a Prueba T para la igualdad de medias ^b Estadístico exacto de Fischer.

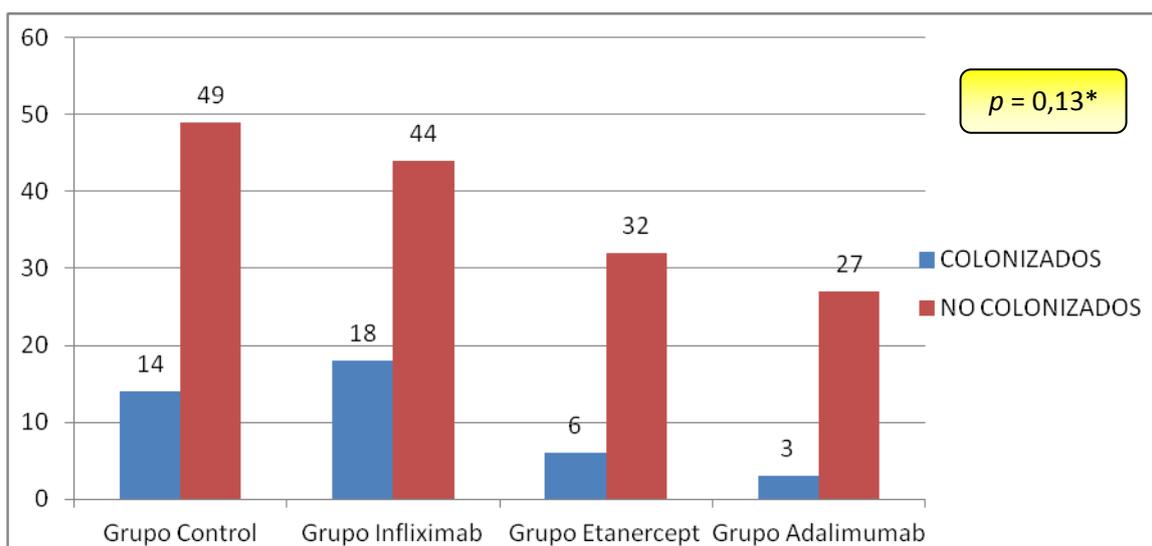
6.2 PREVALENCIA DE COLONIZACIÓN POR *PNEUMOCYSTIS JIROVECI* EN PACIENTES EN TRATAMIENTO CON FÁRMACOS ANTI-FACTOR DE NECROSIS TUMORAL

De todos los pacientes estudiados se encontraban colonizados por *Pneumocystis jirovecii* 41 pacientes representando el 21% de la muestra, frente a 154 pacientes que no lo estaban, representando por tanto el 79% restante.

La prevalencia de colonización en los diferentes grupos es la siguiente sin que existan diferencias estadísticamente significativas ($X^2 p=0,13$), aunque parece existir una mayor prevalencia de colonización por *Pneumocystis* en el grupo de pacientes tratado con infliximab:

- Grupo control: 14 colonizados de 63 que representan un 22,2% del grupo.
- Grupo de pacientes en tratamiento con infliximab: 18 pacientes colonizados de 62 representando un 29% del grupo.
- Grupo de pacientes en tratamiento con etanercept: 6 pacientes colonizados de 40 representando un 15% del grupo.
- Grupo de pacientes en tratamiento con adalimumab: 3 pacientes colonizados de 30, representando un 10% del grupo.

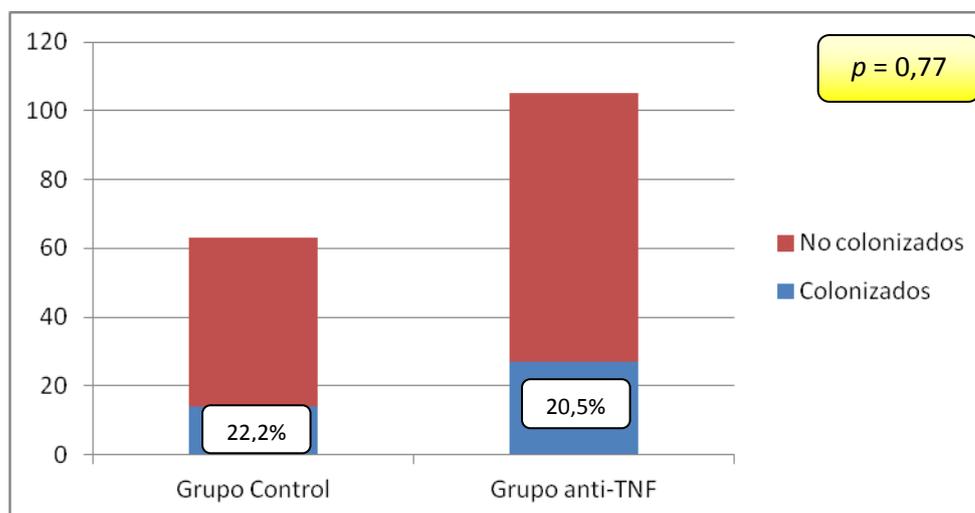
TABLA 10: DISTRIBUCIÓN DE LA COLONIZACIÓN POR *PNEUMOCYSTIS JIROVECHII* EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE PACIENTES



* Test de X^2 de Pearson

Si analizamos la prevalencia de colonización observada globalmente en los grupos anti-TNF frente al grupo control no encontramos tampoco diferencias estadísticamente significativas ($X^2 p = 0,77$), apareciendo en el grupo control 14 colonizados de 63 pacientes, representando un 22,2% del total de este grupo, frente al grupo anti-TNF, donde encontramos 27 pacientes colonizados por *Pneumocystis* de un total de 105 siendo de esta manera un 20,5% del total.

Tabla 11: DISTRIBUCIÓN DE LA COLONIZACIÓN SEGÚN TRATAMIENTO CON FÁRMACOS ANTI-TNF



Cuando realizamos el estudio de las características entre el grupo de pacientes que están colonizados por *Pneumocystis* y el grupo de pacientes que no lo está, las variables que hemos encontrado que presentan diferencias estadísticamente significativas a favor del grupo de pacientes colonizados, son el uso actual de esteroides, el uso actual de metrotrexato y existe una mayor tendencia a la colonización por este hongo según avanza la edad. Por lo tanto, no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas para las siguientes variables en cuanto a la presencia o no de colonización como son: el sexo, la enfermedad de base, el tabaquismo, la presencia de enfermedad pulmonar crónica, el antecedente de neoplasia o transfusión sanguínea, el hecho de haber estado ingresado en el año previo, el uso previo de sulfamidas o azitromicina, así como el uso de otro Anti-TNF. Todos estos datos se pueden observar en la tabla que se expone a continuación, así como los valores de p y los estadísticos utilizados.

Tabla 12: CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS SEGÚN LA PRESENCIA DE COLONIZACIÓN POR *P. JIROVECI*

Características núm (% del total del grupo)	Colonizados (41 pacientes)	No colonizados (154 pacientes)	Valor de p
Sexo (H)	22 (53,7%)	68 (44,2%)	$p = 0,27^*$
Edad	58 ± 14,5	52,8 ± 14,9	$p = 0,046^a$

Diagnóstico de AR	27 (65,9%)	90 (58,4%)	$p = 0,38^*$
Diagnóstico de EA	8 (19,5 %)	31 (20,1%)	$p = 0,93^*$
Diagnóstico de Ps	2 (4,9%)	7 (4,5%)	$p = 1^b$
Diagnóstico de AP	4 (9,8%)	25 (16,2%)	$p = 0,3^*$
Fumador	13 (31,7%)	46 (29,9%)	$p = 0,82^*$
Enfermedad respiratoria	8 (19,5%)	14 (9,1%)	$p = 0,09^b$
Neoplasia	1 (2,4%)	7 (4,5%)	$p = 1^b$
Trasfusión previa	3 (7,3%)	14 (9,1%)	$p = 1^b$
Uso previo de sulfamidas	3 (7,3%)	5 (3,2%)	$p = 0,36^b$
Uso previo de azitromicina	1 (2,4%)	3 (1,9%)	$p = 1^b$
Ingreso último año	4 (9,8%)	14 (9,1%)	$p = 1^b$
Uso previo de otro anti-TNF	4 (9,8%)	17 (11%)	$p = 1^b$
Uso actual de esteroides	20 (48,8%)	44 (28,6%)	$p = 0,014^*$
Dosis deflazacort mg/d media mg/d (rango)	6,04 (0-70)	2,26 (0-30)	$p = 0,007^c$
Uso actual de metrotexato	30 (73,2%)	75 (48,7%)	$p = 0,005^*$
Dosis metrotexato mg/sem media mg/sem (rango)	7,56 (0-20)	4,07 (0-20)	$p = 0,003^c$
Uso actual de leflunomida	4 (9,8%)	18 (11,7%)	$p = 1^b$
Uso actual de anti-TNF	27 (65,9%)	105 (68,2%)	$p = 0,77^*$
Duración en sem. de tratamiento con anti-TNF media (rango)	122,46 (0-480)	92,87 (0-384)	$p = 0,31^c$

* Test de X^2 de Pearson; ^a Prueba T para la igualdad de medias, ^b Estadístico exacto de Fischer, ^c Estadístico U de Mann-Whitney

Hemos analizado así mismo, la dosis media de esteroides diaria y su relación con la colonización por *Pneumocystis*. Para ello, hicimos la conversión a dosis diaria de

deflazacort para cada paciente que tomaba corticoides, ya que era el esteroide más usado en nuestros pacientes. En este sentido, sí se observaba una diferencia estadísticamente significativa con la dosis de deflazacort entre el grupo de pacientes colonizados con una media de 6,04mg/d y rango de 0-75 mg/d y los no colonizados con una media de 2,26mg/d y rango de 0-30mg/d, con una $p = 0,007$ (Estadístico U de Mann-Whitney).

De la misma manera se realizó el análisis con la dosis media de metrotrexato recibida por los pacientes y su relación con la colonización por *Pneumocystis*. Observamos al igual que en el caso de los esteroides, que sí existían diferencias estadísticamente significativas en favor de mayor dosis en el grupo de los pacientes colonizados. La dosis media de metrotrexato en el grupo de los colonizados fue de 7,56 mg/sem y rango de 0-20 mg/sem y en el grupo de no colonizados la dosis media fue de 4,07 y rango 0-20mg/sem con una $p = 0,003$ (Estadístico U de Mann-Whitney).

Análisis bivariante y multivariante.

Debido a que hemos encontrado varias variables que podrían estar relacionadas como factores de riesgo para el hecho de estar colonizados por *Pneumocystis jirovecii* en nuestros pacientes como son: la edad, el uso de esteroides y el uso de metrotrexato; decidimos realizar el análisis bivariante correspondiente para ver esta posible asociación; añadimos, así mismo, otras variables ampliamente reconocidas en la literatura como son el habito tabáquico y la presencia de enfermedad pulmonar crónica. Por último, realizamos también el análisis con el hecho de estar recibiendo los pacientes algún fármaco anti-TNF o no.

Los resultados de estos análisis se pueden ver en la tabla 13 para las diferentes variables independientes consideradas respecto a la variable dependiente *colonización*.

Tabla 13: ANÁLISIS MEDIANTE REGRESIÓN LOGÍSTICA DE VARIABLES ASOCIADAS A LA COLONIZACIÓN

VARIABLES INDEPENDIENTES	ODDS RATIO	Intervalo de confianza del 95%	Valor de p
Edad	1,024	1,010-1,049	$p = 0,048$

Fumador:			
- No fumador	Referencia		
- Ex/si fumador	1,09	0,519-2,291	$p = 0,820$
Enfermedad respiratoria crónica:			
- No antecedente	Referencia		
- Si antecedente	2,424	0,940-6,255	$p = 0,067$
Uso de esteroides			
- No	Referencia		
- Sí	2,381	1,176-4,816	$p = 0,016$
Uso de metrotexato			
- No	Referencia		
- Sí	2,873	1,344-6,141	$p = 0,006$
Uso anti-TNF			
- No	Referencia		
- Sí (alguno de los tres fármacos)	0,9	0,434-1,866	$p = 0,77$

A la vista de estos resultados, encontramos que tanto la edad, como el uso de esteroides y de metrotexato, continúan presentado una relación positiva a favor de ser posibles factores de riesgo para la colonización por *Pneumocystis* con diferencias estadísticamente significativas. El antecedente de presentar una enfermedad pulmonar crónica o el antecedente relacionado con el consumo de tabaco, presentan así mismo una relación positiva pero sin ser estadísticamente significativa.

Sin embargo, el hecho de que los pacientes estén recibiendo alguno de los tres fármacos anti-TNF incluidos en nuestro estudio, podría ser un factor protector, ya que la OR es de 0,9 - aunque no presente la significación estadística correspondiente - hallazgo que discutiremos más adelante.

Así mismo, hemos realizado el análisis para estimar la fuerza de asociación de cada variable, controladas por las demás, con la variable dependiente colonización. De esta forma, hemos calculados unas OR ajustadas para cada variable que se pueden observar en la siguiente tabla:

Tabla 14: ANÁLISIS AJUSTADO MEDIANTE REGRESIÓN LOGÍSTICA DE VARIABLES ASOCIADAS A LA COLONIZACIÓN

VARIABLES INDEPENDIENTES	ODDS RATIO AJUSTADA	Intervalo de confianza del 95%	Valor de <i>p</i>
Edad	1,011	0,983-1,039	<i>p</i> = 0,451
Fumador:	Referencia		
- No fumador			
- Ex/si fumador	1,124	0,504-2,508	<i>p</i> = 0,775
Enfermedad respiratoria crónica:	Referencia		
- No antecedente			
- Si antecedente	2,424	0,492-4,279	<i>p</i> = 0,5
Uso de esteroides	Referencia		
- No			
- Sí	1,894	0,872-4,111	<i>p</i> = 0,106
Uso de metrotexato	Referencia		
- No			
- Sí	2,386	1,081-5,266	<i>p</i> = 0,031
Uso anti-TNF	Referencia		
- No			
- Sí (alguno de los tres fármacos)	1,178	0,528-2,628	<i>p</i> = 0,689

Con estas seis variables, el modelo tiene una capacidad de clasificar correctamente al 79,5% de los casos analizados.

Con estos resultados, sólo hemos encontrado que el uso de metrotexato es el factor de riesgo asociado de forma independiente a la colonización, aunque las demás variables muestren tendencia positiva también, sus resultados no son estadísticamente significativos.

6.3 FACTORES DE RIESGO PARA LA COLONIZACIÓN POR *P. JIROVECHII* EN PACIENTES EN TRATAMIENTO CON INFLIXIMAB

Realizamos un estudio más específico en el grupo de pacientes que recibían Infliximab, porque era el grupo que presentaba mayor tasa de colonización, teníamos un mayor

número de pacientes y así podíamos compararlos con el grupo control por presentar un tamaño muestral más acorde.

Tendríamos así un total de 125 pacientes, distribuidos en el grupo control 63 y en el grupo que recibían infliximab 62. Los pacientes estaban recibiendo infliximab para AR en 30 de los casos representando un 48,3%, en 25 casos para EA representando un 40,3% y para APs en siete casos, representando un 11,2%, como se ha comentado anteriormente y en el grupo control la distribución fue ligeramente diferente con 48 pacientes diagnosticados de AR (76,2%), cinco pacientes de EA, (7,9%) y 10 pacientes de APs (15,9%). En la tabla 15 se pueden ver el resto de características estudiadas.

Tabla 15: CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DE PACIENTES SEGÚN RECIBAN INFlixIMAB O GRUPO CONTROL.

Características núm (% del total del grupo)	Grupo Control (63)	Grupo Infliximab (62)
Sexo (H)	34 (54%)	28 (45,2%)
Edad	59 ± 15,2	49,7 ± 12,5
Fumador	14 (22%)	24 (38%)
Enfermedad respiratoria	6 (9,5%)	6 (9,7%)
Neoplasia	6 (9,5%)	1 (1,6%)
Trasfusión previa	8 (12,7%)	1 (1,6%)
Uso previo de sulfamidas	0	8 (12,9%)
Uso previo de azitromicina	0	3 (4,8%)
Ingreso último año	6 (9,5%)	8 (12,9%)
Uso previo de otro anti-TNF	0	3 (4,8%)
Uso actual de esteroides	31 (49,2%)	13 (21%)
Uso actual de metrotexato	38 (60%)	42 (67,7%)

Uso actual de leflunomida	11 (17,5%)	3(4,8%)
----------------------------------	------------	---------

La dosis de infliximab intravenosa infundida para cada paciente osciló entre los 3-5mg/kg cada 6-8 semanas, con una duración media del tratamiento de 138 semanas (con un rango de 2-283 semanas) en el momento de la recogida de la muestra de lavado orofaríngeo.

La tasa de colonización detectada en el grupo control fue del 22,2%, por lo que 14 sujetos de 63 estaban colonizados por *Pneumocystis*, mientras que en el grupo de pacientes que recibían infliximab, se detectó este hongo en el lavado orofaríngeo en 18 pacientes, representado un 29% del total de este grupo, pero sin diferencias estadísticamente significativas.

Si analizamos a los pacientes según la presencia o no de colonización, las características evaluadas estaban representadas según la siguiente tabla (tabla 16)

Tabla 16: CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS SEGÚN EL ESTADO DE COLONIZACIÓN DE LOS EN PACIENTES

Características núm (% del total del grupo)	Colonizados (32 pacientes)	No colonizados (93 pacientes)	Valor de p
Sexo (H)	15 (46,8%)	48 (51,6%)	$p = 0,79^*$
Edad	56,4 ± 14,5	53,7 ± 14,7	$p = 0,37^a$
Diagnóstico de AR	22 (68,7%)	56 (60,2%)	$p = 0,51^b$
Diagnóstico de EA	6 (18,7 %)	24 (25,8%)	$p = 0,48^b$
Diagnóstico de AP	4 (12,5%)	13 (13,9%)	$p = 0,99^b$
Fumador	10 (31,2%)	27 (29%)	$p = 0,81^b$
Enfermedad respiratoria	5 (15,6%)	7 (7,5%)	$p = 0,18^b$
Neoplasia	1 (2,4%)	7 (4,5%)	$p = 1^b$
Trasfusión previa	3 (7,3%)	14 (9,1%)	$p = 1^b$
Uso previo de sulfamidas	3 (9,3%)	5 (5,3%)	$p = 0,42^b$

Uso previo de azitromicina	1 (3,1%)	2 (2,1%)	$p = 0,99^b$
Ingreso último año	4 (9,8%)	14 (9,1%)	$p = 1^b$
Duración en sem. de tratamiento con infliximab media (rango)	109 (0-283)	47 (0-192)	$p = 0,01^c$
Uso actual de esteroides	17 (53,1%)	27 (28%)	$p = 0,01^b$
Dosis deflazacort mg/d media (rango)	7 (0-75)	2,5 (0-30)	$p = 0,1^c$
Uso actual de metrotexato	26 (81,2%)	54 (58%)	$p = 0,02^b$
Dosis metrotexato mg/sem media (rango)	8,2 (0-20)	5,4 (0-20)	$p < 0,01^c$
Uso actual de leflunomida	3 (9,3%)	11 (11,8%)	$p = 0,99^b$

* Test de X^2 de Pearson con corrección de Yates; ^a Prueba T para la igualdad de medias, ^b Estadístico exacto de Fischer, ^c Test U de Mann-Whitney

Así podemos ver como existían diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pacientes colonizados frente al grupo de pacientes que no estaban colonizados en función de la duración del tratamiento con infliximab, el uso de esteroides y el uso de metrotexato (así como la dosis media de este último)

Posteriormente, estudiamos mediante análisis de regresión logística multivariante las posibles características que podrían estar en relación con la colonización por *Pneumocystis*, donde sólo el uso de esteroides, uso de metrotexato y la duración del tratamiento con infliximab mayor a 3 años se asociaron de forma estadísticamente significativa a la colonización. (Tabla 17)

Tabla 17: ANÁLISIS MEDIANTE REGRESIÓN LOGÍSTICA DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES ATENDIENDO AL ESTADO DE COLONIZACIÓN

VARIABLES INDEPENDIENTES	Odds ratio (IC 95%)	Valor de p	OR ajustada (IC 95%)	Valor de p
--------------------------	---------------------	--------------	----------------------	--------------

Sexo				
-Mujer	Referencia			
-Hombre	0,87 (0,37-1,85)	0,644	0,69(0,244-1,944)	0,482
Edad (años)	1,01 (0,985-1,041)	0,367	0,99(0,958-1,040)	0,917
Enfermedad reumática				
-AR	Referencia			
-EA	0,64(0,229-1,767)	0,386	1,02(0,196-5,303)	0,981
-APs	0,78 (0,230-2,665)	0,696	2,08(0,407-10,667)	0,379
Fumador:				
- No fumador	Referencia			
- Ex/si fumador	1,11(0,465-2,656)	0,813	0,66 (0,228-1,905)	0,441
Enfermedad respiratoria crónica:				
- No antecedente	Referencia			
- Si antecedente	2,27 (0,667-7,756)	0,189	1,35 (0,295-6,188)	0,699
Uso de esteroides				
- No	Referencia			
- Sí	2,27(1,223-6,329)	0,016	4,19(1,339-12,551)	0,010
Uso de metrotexato				
- No	Referencia			
- Sí	3,13 (1,176-8,327)	0,022	2,43 (0,695-8,532)	0.164
Uso de Leflunomida				
- No	Referencia			
- Sí	0,77 (0,201-2,96)	0,705	1,45 (0,274-7,642)	0,661
Duración del tratamiento				
≤ 3 años	Referencia			
≥ 3 años	3,65 (1,558-8,552)	0,003	6,13 (2,037-18,462)	0,001

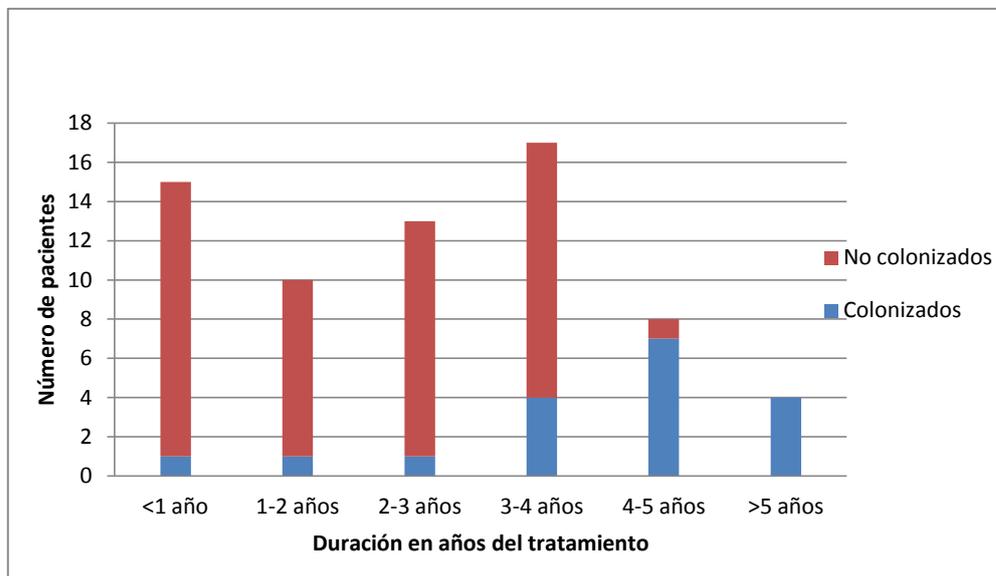
Cuando se ajustan estos hallazgos de acuerdo a las dosis de esteroides (mg/día) y la duración del tratamiento con infliximab (semanas), tan sólo la duración en el tratamiento con infliximab es estadísticamente significativa. (Tabla 18)

Tabla 18: ANÁLISIS POR REGRESIÓN LOGÍSTICA DE LA COLONIZACIÓN AJUSTADO A LA DOSIS DE ESTEROIDES Y DURACIÓN DEL TRATAMIENTO CON INFILIXIMAB

VARIABLES INDEPENDIENTES	Odds ratio (IC 95%)	Valor de <i>p</i>	OR ajustada (IC 95%)	Valor de <i>p</i>
Sexo				
-Mujer	Referencia			
-Hombre	0,83 (0,37-1,85)	0,644	1,04(0,361-2,983)	0,945
Edad (años)	1,01 (0,985-1,041)	0,367	1,01(0,964-1,047)	0,820
Enfermedad reumática				
-AR	Referencia			
-EA	0,64(0,229-1,767)	0,386	0,62 (0,124-3,14)	0,568
-APs	0,78 (0,230-2,665)	0,696	1,90 (0,409-8,854)	0,412
Fumador:				
- No fumador	Referencia			
- Ex/si fumador	1,11 (0,465-2,656)	0,813	0,64 (0,221-1,849)	0,408
Enfermedad respiratoria crónica:				
- No antecedente	Referencia			
- Si antecedente	2,27 (0,667-7,756)	0,189	178 (0,408-7,791)	0,442
Uso de esteroides (mg/día)	1,06 (0,999-1,128)	0,053	1,06 (0,977-1,162)	0,154
Uso de metrotexato (mg/sem)	1,11 (1,022-1,197)	0,13	1,08 (0,975-1,194)	0,144
Uso de Leflunomida				
- No	Referencia			
- Sí	0,77 (0,201-2,96)	0,705	1,69 (0,344-8,375)	0,561
Duración del tratamiento con infliximab (semanas)	1,01 (1,004-1,013)	0,001	1,01 (1,004-1,016)	0,001

La elevada asociación observada entre la duración del tratamiento con infliximab y la colonización por *Pneumocystis* se puede observar en el siguiente gráfico, donde se observa cómo a medida que se incrementa la duración del tratamiento, aumenta la tasa de individuos colonizados, siendo máxima cuando la duración supera los cinco años de tratamiento, donde encontramos que los cuatro individuos en esta franja de tiempo estaban colonizados.

Tabla 19: PACIENTES COLONIZADOS POR *PNEUMOCYSTIS JIROVECHII* SEGÚN LA DURACIÓN DEL TRATAMIENTO CON INFLIXIMAB



7. DISCUSIÓN

7.1 PREVALENCIA GLOBAL DE LA COLONIZACIÓN POR PNEUMOCYSTIS JIROVECI EN PACIENTES EN TRATAMIENTO CON FÁRMACOS ANTI-FACTOR DE NECROSIS TUMORAL

Este trabajo muestra por primera vez la prevalencia de colonización por *P. jirovecii* en pacientes que reciben fármacos anti-TNF como infliximab, adalimumab o etanercept para diferentes enfermedades sistémicas, principalmente reumatológicas, siendo la prevalencia encontrada de un 20,5% en nuestra población. Así mismo, debido al diseño de nuestro trabajo hemos podido obtener la tasa de colonización global en pacientes con enfermedades autoinmunes reumatológicas que ha llegado al 21%, incluyendo a pacientes de la práctica clínica habitual de consultas externas, reciban o no este tipo de fármacos biológicos.

7.1.1 PREVALENCIA DE COLONIZACIÓN EN NUESTRO MEDIO

En los últimos años diferentes estudios realizados en nuestro entorno han permitido aportar información sobre la prevalencia de colonización por *Pneumocystis* en diferentes grupos de población que nos permite establecer comparaciones, aunque de forma indirecta, con los datos obtenidos en este trabajo.

La prevalencia encontrada en pacientes con enfermedades autoinmunes en nuestro estudio del 21% es semejante a la encontrada en pacientes con Fibrosis Quística (Respaldiza et al., 2005), pero inferior a la que presentan los sujetos con EPOC que prácticamente la duplica (Calderón et al., 2004).

Esta mayor prevalencia encontrada en los pacientes con EPOC podría deberse a la importancia que determinados factores locales, dependientes de las alteraciones presentes en el pulmón de los pacientes con EPOC, pueden tener facilitando la colonización o dificultando la eliminación del microorganismo (Norris & Morris, 2011). En este sentido, la prevalencia de colonización por *Pneumocystis* del 20% encontrada en trabajadores no asistenciales de nuestro hospital reforzaría esta idea de la importancia de las alteraciones pulmonares en el fenómeno de la colonización (Medrano, 2005).

7.1.2 FACTORES DE RIESGO PARA LA COLONIZACIÓN POR *PNEUMOCYSTIS*

En nuestro estudio el factor de riesgo que más se ha asociado con el hecho de estar colonizado por *Pneumocystis* ha sido el uso concomitante de metrotexato (OR ajustada de 2,386; IC del 95%: 1,081-5,266). Existen abundantes publicaciones que registran la asociación del metrotexato con el desarrollo de PcP (LeMense & Sahn, 1994; Kaneko, Suwa, Ikeda & Hirakata, 2006), pero pocas en cuanto a la asociación de este fármaco con la colonización. En el estudio de Mori y colaboradores (2008) sobre colonización por *Pneumocystis* en 55 pacientes ancianos con AR y sometidos a bajas dosis de metrotexato, detectan una tasa de colonización del 10,9%, de los cuales, uno de ellos desarrolla una PcP durante el seguimiento, aunque en el estudio no se incluían pacientes con AR sin metrotexato con los que comparar.

En modelos animales se suele inducir con esteroides la inmunodepresión para el desarrollo posterior de una PcP (Dei-Cas et al., 1998) y se ha demostrado en los humanos que estos esteroides son factor de riesgo para el desarrollo de PcP tal y como ya describieron Yale y Limper (1996) en su cohorte de la Clínica Mayo. Además, Maskell y colaboradores (2003) describieron en su cohorte de pacientes sometidos a broncoscopia que en el grupo de pacientes bajo tratamiento con esteroides la colonización por *Pneumocystis* fue del 44% frente al 12% de los pacientes no tratados. Helweg-Larsen y colaboradores (2002) informaron que el 75% de los pacientes colonizados por *P. jirovecii* habían recibido esteroides frente a sólo el 13% de los pacientes no colonizados. Sin embargo, en nuestro estudio a pesar de que la relación fue positiva en cuanto al uso de esteroides (OR: 2,381, IC del 95%: 1,176-4,816, $p = 0,016$) cuando realizamos el análisis ajustado para todas las variables esta asociación no se mantuvo (OR ajustada: 1,894, IC al 95%: 0,872-4,111, $p = 0,106$) probablemente por el tamaño de la muestra

Al igual que con los esteroides, la edad resultó tener una asociación positiva con la colonización en el análisis univariante con el hecho de estar colonizado por *P. jirovecii*, en concordancia con los estudios de Fritzsche y colaboradores (2012) en pacientes con enfermedades sistémicas donde tan solo la edad mayor de 60 años, fue la variable más fuertemente asociada al hecho de la colonización. Sin embargo en el análisis ajustado nuevamente se perdía esta asociación (OR: 1,024, IC del 95%: 1,010-1,049, $p = 0,048$ y OR ajustada: 1,011, IC del 95%: 0,983-1,039, $p = 0,451$)

Se analizó igualmente si la presencia de alguna enfermedad pulmonar crónica (EPOC, asma, neumopatías intersticiales o fibrosis quística) sin que encontrásemos en nuestro estudio asociación estadísticamente significativa entre esta variable y el estado de colonización (OR: 2,424, IC al 95%: 0,940-6,25, $p = 0,067$ y OR ajustada: 2,424-, IC al 95%: 0,492-4,279, $p = 0,5$).

El hábito tabáquico no resultó tampoco ser un factor de riesgo para la colonización en nuestros pacientes (OR 1,09, IC del 95%: 0,519-2,291, $p = 0,820$ y OR ajustada de 1,124 con IC del 95%: 0,504-2,508; $p = 0,775$) en contraposición a lo observado por Morris y colaboradores (2004) en su estudio de autopsias de pacientes con infección VIH o entre pacientes con neumopatías intersticiales en nuestro medio (Martín Juan, 2008). En este sentido, se postula que el humo del tabaco al disminuir el aclaramiento mucociliar, podría facilitar la colonización al dificultar la eliminación del microorganismo (Morris, Scirba & Norris, 2008).

Paradójicamente el estar en tratamiento con cualquier anti-TNF en el análisis univariante mostraba una tendencia a comportarse como factor protector frente a la colonización, sin ser estadísticamente significativo (OR: 0,9, IC al 95%: 0,434-1,866 $p = 0,777$) que desaparecía en el análisis multivariante (OR ajustada: 1,178, IC del 95%: 0,528-2,628, $p = 0,689$); este hallazgo podría estar justificado porque los pacientes que reciben este tipo de fármacos suelen tener un menor uso concomitante de esteroides, metotrexato o leflunomida, fármacos por otro lado relacionados con mayor riesgo de estar colonizados por *Pneumocystis* y tener una edad algo menor que los que no los usan.

7.1.3 COLONIZACIÓN POR *PNEUMOCYSTIS* EN ENFERMEDADES AUTOINMUNES

En nuestro estudio la tasa de colonización en los pacientes con enfermedades autoinmunes ha sido del 21% y en el grupo de pacientes que estaban bajo tratamiento con anti-TNF del 20,5%; en este sentido existen tasas diferentes en los pocos estudios en grupos de pacientes con enfermedades sistémicas publicados hasta el momento. El trabajo realizado por Meniaki y colaboradores (2011) fue un estudio prospectivo observacional en el departamento de Medicina Interna del Hospital Universitario de Lille en el que incluyeron a pacientes con enfermedades del tejido conectivo: 15 (22%) presentaban Lupus eritematoso sistémico; 17 (25%) polimiositis; 15 (22%) esclerodermia, 15 (22%) diferentes tipos de vasculitis y los otros cinco pacientes, diferentes enfermedades

sistémicas no especificadas, y un grupo de sujetos sanos de la misma región como controles.

Les realizaron una prueba de esputo inducido y en ella analizaron la presencia de *P. jirovecii* mediante PCR utilizando los cebadores pAZ102-X y pAZ102-Y. Recogieron datos clínicos, de laboratorio y epidemiológicos y realizaron un seguimiento cada tres meses durante un año. La prevalencia de colonización por *Pneumocystis* fue del 16% (11 positivos de 67 pacientes) y no encontraron diferencias estadísticamente significativas con el grupo control de sujetos aunque la prevalencia en este último grupo fue algo menor (7%).

La única variable en la que se encontraron diferencias estadísticamente significativa en el análisis multivariante fue el sexo, con mayor predominio en varones colonizados para el grupo de pacientes, y cuando ajustaron el análisis por sexo, los hombres presentaban frente a las mujeres mayor dosis de esteroides y menor recuento linfocitario, por lo que esto podría manifestar enfermedades más graves o avanzadas y mayor grado de inmunosupresión en varones que en mujeres. Ninguno de estos pacientes, sin embargo, desarrolló una PcP durante el periodo de seguimiento. En este estudio ni la edad, ni el hábito tabáquico, ni la presencia de enfermedades pulmonares crónicas se identificó como factor de riesgo para la colonización por *Pneumocystis*. El tratamiento con esteroides o metrotexato tampoco se asoció a un incremento en el riesgo de colonización por *Pneumocystis* (Meniaki et al., 2011).

Posteriormente, Fristszche y colaboradores (2012) publicaron una alta prevalencia de colonización por *P. jirovecii* en sus pacientes en Alemania, con 29 pacientes colonizados del grupo de 102 pacientes con enfermedades sistémicas (28,5%) en comparación con tres sujetos sanos colonizados del grupo de 117 controles (2,6%) ($p < 0,001$, OR: 15,1; IC: 95% 4,43 a 51,38]. En los pacientes con enfermedades sistémicas la edad mayor de 60 años se asoció significativamente con la colonización (OR: 3,19, IC del 95%: 1,27-7,94 $p = 0,015$) y además, el análisis multivariado reveló que la edad se asociaba de forma independiente con la colonización de *P. jirovecii*. Ni la duración ni la dosis del tratamiento con corticosteroides ni los otros fármacos inmunosupresores tenían una influencia significativa en la colonización.

7.1.4 COLONIZACIÓN POR *PNEUMOCYSTIS* Y RIESGO DE PCP

Como ya se ha comentado en la introducción, el estudio de la colonización por este hongo atípico y el papel de ésta en el ciclo vital del microorganismo, es un aspecto de la epidemiología de la infección por *Pneumocystis* que está adquiriendo un carácter muy relevante y por ello, cada día aparecen múltiples estudios encaminados a obtener información sobre este nuevo concepto.

De hecho, una de las hipótesis actuales es que la colonización en el tracto respiratorio, sea la forma que permita a este hongo mantenerse como reservorio y que a su vez los pacientes colonizados, portadores o *carriers* (en inglés), podrían por ello estar en riesgo de desarrollar posteriormente una PcP si se sometiesen a un estado de inmunosupresión de cualquier origen. Esta hipótesis es diferente a la que se tenía previamente de que la PcP se producía por una reactivación de una infección latente, debido a que aparecieron varios estudios que utilizando métodos de biología molecular apoyaban la idea de una infección *de novo* según las diferencias encontradas en los genotipos, así como las diferencias geográficas (Keely & Stringer, 1997; Beard et al., 2000).

El hecho de que la colonización sea factor de riesgo para el desarrollo de PcP se ha comprobado en modelos animales: Dei-Cas y colaboradores (1998) realizaron un estudio experimental con ratas que estaban colonizadas por *P. carinii* (especie que infecta a las ratas) a las que sometieron a una inmunosupresión con corticoides; pasado un periodo de 6-14 semanas observaron como estas ratas desarrollaban una PcP.

Existen otros estudios como el de Leigh y colaboradores (1992) en el que se describe la aparición de una PcP en un paciente trasplantado que recibía terapia inmunosupresora y que estaba colonizado previamente por *Pneumocystis* y no recibía una profilaxis específica, planteando de esta forma que en humanos esta situación también podría darse. Posteriormente Mori y colaboradores (2008) describieron un caso de PcP en una persona mayor que estaba recibiendo pequeñas dosis de metrotexato para una AR y que además previamente también había estado colonizada por *Pneumocystis* como ya se ha comentado previamente.

Recientemente, en un estudio realizado por nuestro grupo en una cohorte de adolescentes infectados por VIH, donde se identificó una prevalencia de colonización del 40%, se pudo documentar el desarrollo de una PcP en uno de los pacientes colonizados que presentaba una intensa inmunodepresión y estaba recibiendo quimioprofilaxis (Gutiérrez et al., 2011).

De esta manera, la hipótesis de que el estado de colonización o portador asintomático sea un factor de riesgo para el desarrollo posterior de una PcP tiene sustento y por ello la realización de una profilaxis específica a aquellos pacientes en riesgo de desarrollar una PcP sería una intervención adecuada que mejoraría el pronóstico de estos pacientes.

Hasta el momento, tan solo existe consenso sobre cuándo se debe iniciar la profilaxis para evitar una PcP en pacientes con infección por el VIH. Tal y como se comentó en la introducción, las guías recomiendan iniciar la profilaxis primaria frente a PcP en personas con infección por el VIH, en adolescentes y adultos, incluyendo embarazadas y los pacientes bajo TARGA; cuando el recuento de células CD4 es inferior a 200 células/mm³ (o CD4 menores de un 15% de los linfocitos totales con alguna enfermedad definitoria de SIDA) o el paciente tiene una historia de la candidiasis orofaríngea (Panel de expertos de Grupo de Estudio del Sida 2008).

Las recomendaciones de profilaxis para niños infectados con VIH dependen de la edad. La quimioprofilaxis debe realizarse siempre para niños de 6 años o más, basado en las directrices de adultos, para niños de 1 a 5 años si el recuento de CD4 es inferior a 500 células/mm³ o porcentaje de CD4 es inferior al 15%, y para todos los lactantes infectados por el VIH menores de 12 meses y recomiendan la profilaxis secundaria a todos aquellos pacientes VIH que han presentado una PCP y suspender según los criterios generales. (Centers for Disease Control and Prevention, 2009).

Sin embargo, se ha realizado una metanálisis sobre la indicación de profilaxis en pacientes inmunodeprimidos sin infección por el VIH, donde se analizaron doce ensayos aleatorios, incluyendo 1245 pacientes (50% hombres) que habían sido sometidos a trasplante autólogo de médula ósea, trasplante de órgano sólido, enfermedades hematológicas o cáncer. Cuando se utilizó el trimetoprim-sulfametoxazol como profilaxis se observó una reducción del 91% en la incidencia de PcP (RR, 0,09; IC95%: 0,02-0,32), con un número necesario a tratar de pacientes (NNT) de 15 (IC 95%: 13-20). Se redujo de forma significativa la mortalidad relacionada con PcP (RR 0,17, IC 95%: 0,03-0,94), mientras que la mortalidad por cualquier otra causa no cambió significativamente (RR = 0,79, IC 95%, 0,18-3,46). Se concluyó finalmente que está justificada la profilaxis frente a *Pneumocystis* si el riesgo de PcP es mayor del 3,5% en adultos (en los niños donde existe un riesgo menor, probablemente esté justificada la profilaxis debido a que los eventos adversos son poco frecuentes) (Green, Paul, Vidal & Leibovici, 2007).

El grupo japonés de Mori y colaboradores (2009) realizó un seguimiento a una cohorte de pacientes con AR que se sometían a terapia inmunosupresora para evaluar los efectos preventivos de una profilaxis específica frente a *Pneumocystis*. Para ello, realizaron un seguimiento a 82 pacientes a los que se les realizaba PCR en esputo inducido o LBA. A los pacientes que fueron positivos se les siguió mediante PCR cada dos semanas y tomografía axial computerizada de alta resolución (TACAR); a los que desarrollaron una PcP se les hizo seguimiento por PCR semanal y a los que fueron negativos o negativizaban después de haber sido positivos, se les espaciaba la PCR a los meses primero, tercero y sexto. Detectaron a nueve pacientes colonizados (11%) y tres de ellos desarrollaron una PcP previa al inicio de la profilaxis específica.

En todos los casos de colonización la quimioprofilaxis durante 1-2 semanas hizo que se negativizara la PCR y que no volviera a positivizarse durante el seguimiento, por lo que los autores concluyen que los pacientes con AR que se someten a terapia inmunosupresora y colonizados por *Pneumocystis* se beneficiarían de una profilaxis a corto plazo frente a PcP (Mori, 2009). En este sentido se ha sugerido que la identificación de los sujetos colonizados por *Pneumocystis* mediante el análisis molecular de muestras de LOF podría ser una prueba de cribado previa a la introducción de tratamientos con fármacos anti-TNF en pacientes con enfermedades autoinmunes para prevenir el desarrollo de PcP (Wissmann, Varela & Calderón, 2008).

Posteriormente, el estudio realizado en Tailandia por Vananuvat y colaboradores (2011) concluyó que la profilaxis primaria con TMP/SMZ es eficiente en pacientes de alto riesgo de PcP. En éste, se hizo un análisis retrospectivo de pacientes con enfermedades sistémicas atendidas en las consultas externas de un servicio de reumatología. Se incluyeron como pacientes o episodios de riesgo aquellos que, además de presentar una enfermedad sistémica, recibían esteroides a dosis equivalente a 20 mg/d al menos durante dos semanas y donde se pudo realizar un seguimiento de tres meses. Detectaron 138 episodios de riesgo de PcP en 132 pacientes, en 59 de los cuales su médico responsable le había prescrito TMP/SMZ en dosis diaria semanal, mientras que en 79 episodios no. Se detectaron seis casos de PcP 4,3% (IC al 95%: 1,6%-9,2%) anual, todos ellos en el grupo que no había recibido la profilaxis específica, por lo tanto con una incidencia diferente y estadísticamente significativa ($p = 0,038$). Se observaron una reducción absoluta del riesgo y reducción del riesgo relativo del 7,3% y 100%, respectivamente, y un NNT de 14. De las reacciones adversas documentadas, todas fueron leves en cinco pacientes con LES (8,5%). La mortalidad de las neumonías fue del 50%. Por ello concluyen que el uso de TMP/SMX a

dosis única diaria, sería efectivo como profilaxis primaria en pacientes con enfermedades sistémicas con alto riesgo.

7.1.5 LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Para evaluar la posible presencia de colonización por *Pneumocystis* en los pacientes con enfermedades autoinmunes con y sin tratamiento con fármacos anti-TNF se han empleado en este estudio técnicas moleculares para la detección de ADN del microorganismo en muestras no invasivas.

Una posible limitación de nuestro estudio reside en el hecho de que la detección de ADN de *Pneumocystis* en los pacientes no necesariamente indica la existencia de microorganismos completos y viables con capacidad infectiva. En este sentido, algunos de los casos identificados podrían no ser verdaderos portadores del microorganismo. Sin embargo, al no disponerse de otras técnicas para confirmar los resultados, ya que las técnicas de tinción carecen de sensibilidad en el caso de portadores y no existen métodos de cultivo, la presencia de ADN de *Pneumocystis* en muestras respiratorias se ha considerado suficiente para identificar los sujetos colonizados en estudios realizados por diversos autores (Vargas et al., 2010; Pereira et al., 2014; Khalife et al., 2015; Juliano et al., 2015).

En modelos animales la identificación de ADN de *Pneumocystis* en muestras de secreciones respiratorias altas es un buen indicador de la presencia del microorganismo en los pulmones. (Oz & Hughes, 1999). Por otro lado, los modelos animales ha mostrado también que *Pneumocystis* puede mantenerse en el alveolo pulmonar de individuos inmunocompetentes con un estado de replicación activo y manteniendo su capacidad infectiva (Chabé et al, 2004).

Las técnicas de PCR para la amplificación de diferentes genes de *Pneumocystis* están validadas y son ampliamente utilizadas para la realización de estudios epidemiológicos de colonización. El principal inconveniente de este tipo de técnicas es la aparición de falsos positivos, fundamentalmente por problemas de contaminación, lo que podría representar una posible limitación a la hora de interpretar los resultados de este estudio. Sin embargo, para evitar el riesgo de contaminación, durante el procesamiento de las muestras se tomaron medidas encaminadas a eliminar la posible presencia de ADN exógeno como los amplicones de determinaciones anteriores. Para ello, la extracción de ADN, y las fases previas y posteriores a la amplificación se realizaron en zonas de trabajo

separadas espacialmente. Las superficies de trabajo se limpiaron con soluciones específicas que destruyen el ADN antes y después de trabajar en ellas. Asimismo, se usaron puntas con filtros y controles negativos (agua estéril) y positivos (muestras de pacientes con PcP diluidas 1:10) en todos los ensayos.

Otra posible limitación de nuestro estudio podría estar en relación con la validez del uso de técnicas moleculares en muestras de LOF para identificar la presencia de colonización. El diagnóstico clínico de la PcP continua realizándose mediante la identificación directa del patógeno en muestras de LBA o esputo convencional o inducido (Calderón, 2010), pero este tipo de abordaje no puede emplearse para evaluar la presencia de colonización en estudios epidemiológicos como el nuestro en el que se incluyen sujetos que habitualmente no expectoran y donde éticamente no hay justificación para obtener una muestra de LBA mediante fibrobroncoscopia.

Sin embargo, en los últimos años varios estudios han demostrado la utilidad de técnicas más sensibles como la PCR para el estudio del fenómeno de la colonización en muestras respiratorias como el LOF o el aspirado nasal (Medrano et al., 2005; Respaldiza et al., 2006; Vargas et al., 2010), que pueden ser fácilmente obtenidas de forma no invasiva. En concreto, el abordaje utilizado en el presente estudio en el que se utilizan muestras de LOF y PCR para el gen mtLSU rRNA de *Pneumocystis* ha sido utilizado con éxito en estudios previos (Medrano et al., 2005; Respaldiza et al., 2006), habiéndose demostrado que tiene una sensibilidad del 95.6% y una especificidad del 87,5% para el diagnóstico de la colonización (Respaldiza et al., 2006), lo que la valida como una técnica idónea para la realización de estudios epidemiológicos como el presente.

Por último, cabría plantearse como una limitación de este estudio el no haber incluido una población de sujetos sin enfermedades autoinmunes para poder establecer comparaciones. Sin embargo, disponíamos de estudios previos realizados por nuestro grupo en la misma zona que incluían una gran variedad de situaciones clínicas e incluso sujetos sanos que hemos podido utilizar como referencia (Montes-Cano et al., 2004; Medrano et al., 2005).

Por tanto, determinar cuáles son aquellos factores que aumentan el riesgo de estar colonizados por *P. jirovecii* y del desarrollo de PcP en los pacientes con enfermedades sistémicas será clave para determinar cuáles de estos pacientes se beneficiarán de una profilaxis específica frente a este patógeno oportunista.

7.2 FACTORES DE RIESGO PARA LA COLONIZACIÓN POR *P. JIROVECHII* EN PACIENTES EN TRATAMIENTO CON INFLIXIMAB

Para profundizar en el análisis de los factores de riesgo para la colonización por *Pneumocystis* en pacientes en tratamiento con fármacos anti-TNF nos hemos centrado en los que estaban recibiendo infliximab por ser fármaco más utilizado y con el que se tiene más experiencia de manejo.

La tasa de colonización detectada en el grupo control fue del 22,2%, por lo que 14 sujetos de 63 estaban colonizados por *Pneumocystis*, mientras que en el grupo de pacientes que recibían infliximab, se detectó este hongo en el lavado orofaríngeo en 18 pacientes, representado un 29% del total de este grupo, pero sin diferencias estadísticamente significativas.

Cuando realizamos el análisis de las características de los pacientes que están colonizados frente a aquellos que no lo están, similar a lo que encontramos previamente, se observó una mayor tasa de fumadores y enfermos con EPOC en los pacientes colonizados, aunque sin poder asociarlo de forma estadísticamente significativa cuando agrupamos a estos 125 pacientes.

Resulta interesante constatar como el uso de esteroides está relacionado de forma significativa con la presencia de colonización, incluso en el análisis ajustado (OR: 2,275, IC al 95%: 1,223-6,329, $p=0,016$ y OR ajustada: 4,190, IC al 95% de: 1,339-12,551 $p=0,01$, que no se observaba cuando se agrupaban todos los pacientes en tratamiento con fármacos anti-TNF). Sin embargo, el efecto de los esteroides no es dosis- dependiente (OR: 1,062; IC 95%: 0,999-1,128 $p=0,053$ y OR ajustada: 1,065; IC 95%: 0,977-1,162, $p=0,154$).

En esta misma línea, el uso de metrotexato se asociaba en el análisis univariante a la presencia de colonización (OR: 3,130; IC 95%: 1,176-8,327, $p=0,0229$, aunque esta relación se pierde en el análisis ajustado (OR ajustada: 2,435; IC 95%: 0,695-8,532, $p=0,164$).

Curiosamente al analizar solo el grupo de pacientes en tratamiento con infliximab se pudo comprobar cómo la tasa de colonización aumentaba con el tiempo, es decir a mayor tiempo de tratamiento con el fármaco, observamos que es mayor el número de pacientes colonizados, siendo del 100% cuando son más de 5 años desde el inicio (OR: 3,650; IC 95%: 1,558-8,552 $p=0,003$ y OR ajustada: 6,132; IC del 95%: 2,037-18,462, $p=$

0,001), datos que no han sido descritos en ningún otro estudio hasta el momento. En esta misma línea, se pudo demostrar que el efecto del infliximab sobre el riesgo de colonización por *Pneumocystis* en dosis dependiente y aumento con las semanas de tratamiento (OR: 1,008; IC al 95%:1,004-1,013, $p= 0,001$ y OR ajustada: 1,01, IC al 95%: 1,004-1,016, $p= 0,001$).

En este estudio la duración del tratamiento con infliximab fue el principal factor de riesgo para la colonización por *Pneumocystis* junto al tratamiento con corticoides, aunque el efecto de estos no fue dosis dependiente.

Estos hallazgos resultan de especial importancia a la hora de diseñar posibles estrategias preventivas para disminuir el riesgo de PcP en pacientes con enfermedades autoinmunes y plantea la necesidad de tener en cuenta no solo el tipo de fármaco anti-TNF utilizado sino también el efecto acumulado del uso de los mismos.

8. CONCLUSIONES

La prevalencia global de colonización por *Pneumocystis jirovecii* en pacientes con enfermedades sistémicas en nuestro medio ha sido alta, del 21%; y en concreto entre aquellos pacientes que reciben fármacos anti-TNF ha sido del 20,5%, sin haber existido diferencias estadísticamente significativas entre los que sí reciben este tipo de fármacos y los que no.

Existe una mayor tasa de colonización entre el grupo de pacientes que reciben infliximab frente a los demás grupos, aunque sin diferencias significativas. Sin embargo, sí hemos hallado que a mayor tiempo de exposición a este fármaco, mayor número de pacientes están colonizados.

Así mismo, no hemos encontrado diferencias significativas en cuanto a la colonización según las enfermedades de bases estudiadas: Artritis reumatoide, Espondilitis anquilosante, Psoriasis ni Artritis psoriásica.

El factor de riesgo que se asocia con más fuerza al hecho de la colonización en los pacientes estudiados ha sido el uso concomitante de metrotexato. Existe asociación, aunque más débil, con el uso de esteroides y la mayor edad de los pacientes.

No hemos encontrado relación significativa entre el hábito tabáquico ni si presentaban enfermedad pulmonar crónica de base o uso previo de sulfamidas.

CONCLUSIONS

The overall prevalence of *Pneumocystis jirovecii* colonization in patients with systemic diseases in our study has been high at 21%; and in particular among patients receiving anti-TNF drugs was 20.5%, with no statistically significant differences between patients who received this drugs and those who do not.

There is a higher rate of colonization among the group of patients receiving infliximab compared to other groups, although no statistically significant differences. However, we found that colonized individuals increased as the length of treatment with infliximab increased.

Likewise, we have not found significant differences in colonization by studied diseases: rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis or psoriasis.

The risk factor associated more strongly to the fact of colonization in the patients studied has been the concomitant use of methotrexate. We found a relationship, although weaker, with the use of steroids and with older patients.

We have not found significant relationship between smoking or if they had chronic underlying pulmonary disease or previous use of sulfonamides.

BIBLIOGRAFÍA

- Aarden L, Ruuls SR, Wolbink G (2008) Immunogenicity of anti-tumor necrosis factor antibodies-toward improved methods of anti-antibody measurement. *Curr Opin Immunol*, 20, pp.431-435.
- Aliouat-Denis CM, Martinez A, Aliouat el M, Pottier M, Gantois N, Dei-Cas E (2009) The *Pneumocystis* life cycle. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104, pp. 419-426.
- Alvarez-Martínez MJ, Miró JM, Valls ME, Moreno A, Rivas PV, Solé M, ... Spanish PCP Working Group (2006) Sensitivity and specificity of nested and real-time PCR for the detection of *Pneumocystis jiroveci* in clinical specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 56, pp. 153-160.
- Ammich O (1938) Über die nichtsyphilitische interstitielle Pneumonie des ersten Kindesalters. *Virchows Arch Pathol Anat*, 302, pp. 539-554.
- Armstrong-James D, Stebbing J, John L , Murungi A, Bower M , Gazzard B, Nelson M. A trial of caspofungin salvage treatment in PCP pneumonia (2011). *Thorax* ;66:537- 538
- Anaya JM (2003) Descripción molecular del TNF- α . *Reumatología*, 19, pp. 112-120.
- Annaloro C, Della Volpe A, Usardi P, lambertenghi deliliers G . Caspofungin treatment of Pneumocystis pneumonia during conditioning for bone marrow transplantation.(2006) *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 25:52-4
- Arcenas, R.C., Uhl, J.R., Buckwalter, S.P., Limper, A.H., Crino, D., Roberts, G.D. Wengenack NL (2006) A real time polymerase chain reaction assay for detection of Pneumocystis from bronchoalveolar lavage fluid. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 54, pp. 169-175.
- Bandt, D. and Monecke, S (2007) Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of Pneumocystis jiroveci. *Transpl Infect Dis*, 9, pp. 196-202.
- Bartlett, J.A. and Hulette, C (1997) Central nervous system pneumocystosis in a patient with AIDS. *Clin Infect Dis*, 25, pp. 82-85.
- Beard CB, Carter JL, Keely SP, Huang L, Pieniazek NJ, Moura IN,... Navin TR (2000) Genetic variation in Pneumocystis carinii isolates from different geographic regions: Implications for transmission. *Emerg Infect Dis*, 6, pp. 265-272.

- Benecke E (1938) Eigenartige Bronchiolenerkrankung im ersten Lebensjahr. *Verh Dtsch Ges Pathol*, 31, pp. 402-406.
- Bongartz T, Sutton AJ, Sweeting MJ, Buchan L, Matteson EL, Montori V (2006) Anti-TNF antibody therapy in Rheumatoid Arthritis and the risk of serious infections and malignancies. Systematic review and meta-analysis of rare harmful effects in Randomized Controlled Trials. *JAMA*, 295, pp. 2275-2285.
- Briel M, Boscacci R, Furrer H, Bucher HC (2005) Adjunctive corticosteroids for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with HIV infection: a meta-analysis of randomised controlled trials. *BMC Infect Dis*, 5, pp. 10
- Calderón EJ (2009) Epidemiology of *Pneumocystis* infection in Human. *J Mycol Med*, 19, pp. 270-275.
- Calderón E, de la Horra C, Medrano FJ, López-Suárez A, Montes-Cano MA, Respaldiza N, Varela JM (2004) *Pneumocystis jirovecii* isolates with dihydropteroate synthase mutations in patients with chronic bronchitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 23, pp. 545-549.
- Calderón EJ, de Armas Y, Panizo MM, Wissmann G. (2013) *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in Latin America. A public health problem? *Expert Rev Anti Infect Ther*. Jun;11(6):565-70
- Calderón EJ, Gutiérrez-Rivero S, Durand-Joly I, Dei-Cas E (2010) *Pneumocystis* infection in humans: diagnosis and treatment. *Expert Review Anti-Infective Therapy*, 8, pp. 683-701.
- Calderón-Sandubete EJ, Varela-Aguilar JM, Medrano-Ortega FJ, Nieto-Guerrero V, Respaldiza-Salas N, de la Horra-Padilla C, Dei-Cas E (2002) Historical perspective on *Pneumocystis carinii* infection. *Protist*. 2002, 153, pp. 303-310.
- Carini A (1910) Formas de eschizogonia do trypanosoma lewisi. *Bol Soc Med Cir Sao Paulo*, 18, pp. 204.
- Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for Prevention and Treatment of Opportunistic Infections in HIV-Infected Adults and Adolescents (2009) *MMWR*, 58, pp. 1-216
- Cissé OH, Pagni M, Hauser PM (2012) De novo assembly of the *Pneumocystis jirovecii* genome from a single bronchoalveolar lavage fluid specimen from a patient. *MBio*, 4, pp. e00428-12.
- Cisneros JM, Muñoz P, Torre-Cisneros J, Gurgui M, Rodríguez-Hernández MJ, Echaniz A (1998) Pneumonia after heart transplantation: a multiinstitutional study. *Clin Infect Dis*, 27, pp. 324-331.
- Cornelis LV (1999) Tumor necrosis factor gene polymorphisms as severity markers in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 58 (Suppl I), pp. I20-I26.

- Cushion MT, Keely SP (2013). Assembly and annotation of *Pneumocystis jirovecii* from the human lung microbiome. *MBio*, 4, pp. e00224.
- Chagas C (1909) Nova tripanozomiazaea humana. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1, pp. 159-218.
- Chabe M, Dei-Cas E, Creusy C, Fleurisse L, Respaldiza N, Camus D, Durand-Joly I (2004) Immunocompetent host as a reservoir of *Pneumocystis* organisms: Histological and RT-PCR data demonstrate active replication. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 23, pp. 89-97.
- Darnay BG, Aggarwal BB (1999) Signal transduction by tumor necrosis factor and tumor necrosis factor related ligands and their receptors. *Ann Rheum Dis*, 58 (Suppl I), pp. I2-I13.
- Daudén E (2010) Estructura química de etanercept, farmacocinética y mecanismo de acción. *Actas Dermosifiliogr*, 101 Supl. 1, pp. 1-4.
- Davis JL, Welsh DA, Beard CB, Jones JL, Lawrence GG, Fox MR, Crothers K, Morris A, Charbonnet D, Swartzman A, Huang L (2008) Pneumocystis colonization is common among hospitalized HIV-infected patients with non-Pneumocystis pneumonia. *Thorax*, 63, pp. 329-334.
- De Rycke L, Vandooren B, Kruithof E, De Keyser F, Veys EM, Baeten D (2005) Tumor necrosis factor alpha blockade treatment down-modulates the increased systemic and local expression of Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 in spondylarthropathy. *Arthritis Rheum*, 52, pp. 2146-2158.
- Dei-Cas E (2000) *Pneumocystis* infections: the iceberg? *Med Mycol*, 38(suppl 1), pp. 23-32.
- Dei-Cas E, Brun-Pascaud M, Bille-Hansen V, Allaert A, Aliouat EM (1998) Animal models of pneumocystosis. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 22, pp. 163-168.
- Dei-Cas E, Mazars E, Aliouat EM, Nevez G, Cailliez JC, Camus D (1998) The host-specificity of *Pneumocystis carinii*. *J Mycol Med*, 8, pp. 1-6.
- Delanöe P, Delanöe M (1912) Sur les rapports des kystes de carinii du poumon des rats avec le Trypanosoma lewisi. *CR Acad Sci (Paris)*, 155, pp. 658-660.
- Diaz-Lagares C, Perez-Álvarez R, García -Hernández FJ, Ayala - Gutiérrez MM, Callejas JL, Martínez-Berriotxo A,... Ramos-Casals M (2011) Rates of and risk factors for severe infections in patients with systemic autoimmune diseases receiving biological agents off-label. *Arthritis Res Ther*, 13, pp. R112.

- Dieterich, DT, Lew, EA, Bacon, DJ, Pearlman, KI, Scholes, JV (1992) Gastrointestinal pneumocystosis in HIV-infected patients on aerosolized pentamidine: report of five cases and literature review. *Am J Gastroenterol*, 87, pp. 1763-1770.
- Dinarello CA, Moldawer LL (1999) Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. A primer for clinicians. Thousand Oaks (CA, USA): Amgen.
- Edelstein H, McCabe RE (1990) Atypical presentations of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients receiving inhaled pentamidine prophylaxis. *Chest*, 98, pp. 1366-1369.
- Edman JC, Kovacs JA, Masur H, Santi DV, Elwood HJ, Sogin ML (1988) Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the Fungi. *Nature*, 334, pp. 519-522.
- Festic E, Gajic O, Limper AH, Aksamit TR (2005) Acute respiratory failure due to pneumocystis pneumonia in patients without human immunodeficiency virus infection: outcome and associated features. *Chest*, 128, pp. 573-579.
- Fragoso JM, Vargas Alarcón G, Jiménez Morales S, Reyes Hernández OD, Ramírez Bello J (2014) El factor de necrosis tumoral α (TNF- α) en las enfermedades autoinmunes (EA): biología molecular y genética. *Gac Med Mex*, 150, pp. 334-44.
- Friaza V, Morilla R, Respaldiza N, de la Horra C, Calderón EJ (2010). *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase gene mutations among colonized individuals and *Pneumocystis* pneumonia patients from Spain. *Postgrad Med*, 122, pp. 24-28.
- Fritzsche C, Riebold D, Munk-Hartig A, Klammt S, Neeck G, Reisinger E (2012) High prevalence of *Pneumocystis jirovecii* colonization among patients with autoimmune inflammatory diseases and corticosteroid therapy. *Scand J Rheumatol*, 41, pp. 208-213.
- Furst DE (2010) The risk of infections with Biologic Therapies for Rheumatoid Arthritis. *Semin Arthritis Rheum*, 39, pp. 327-346.
- García-Vidal C, Rodríguez-Fernández S, Teijón S, Esteve M, Rodríguez-Carballeira J, Lacasa JM, Salvador G, Garau J (2009) Risk factor for opportunistic infections in infliximab-treated patients: the important of screening in prevention. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 28, pp. 331-337.
- Green H, Paul M, Vidal L, Leibovici L (2007) Prophylaxis of *Pneumocystis* Pneumonia in immunocompromised Non-HIV-Infected Patients: Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Mayo Clin Proc*, 82, pp. 1052-1059.
- Grell M, Wajant H, Zimmermann G, Scheurich P (1998) The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, pp. 570-575.

- Gutiérrez S, Morilla R, León JA, Martín-Garrido I, Rivero L, Friaiza V, Respaldiza N, Montes-Cano MA, Terán R, de la Horra C (2011) High prevalence of *Pneumocystis jirovecii* colonization among young HIV-infected patients. *J Adolesc Health*, 48, pp. 103-105.
- Guttler R, Singer PA, Axline SG, Greaves TS, McGill JJ (1993) *Pneumocystis carinii* thyroiditis. Report of three cases and review of the literature. *Arch Intern Med*, 153, pp. 393-396.
- Haberthür C, Pless M, Tichelli A, Gratwohl A, Speck B, Betticher DC (1994) *Pneumocystis carinii* pneumonia during therapy with 2-chlorodeoxyadenosine (2-CDA). *Schweiz Med Wochenschr*, 124(1-2), pp. 73-78.
- Hardy AM, Wajszczuk CP, Suffredini AF, Hakala TR, Ho M (1984) *Pneumocystis carinii* pneumonia in renal-transplant recipients treated with cyclosporine and steroids. *J Infect Dis*, 149, pp. 143-147.
- Helweg-Larsen J, Jensen JS, Dohn B, Benfield TL, Lundgren B (2002) Detection of *Pneumocystis* DNA in samples from patients suspected of bacterial pneumonia—a case control study. *BMC Infect Dis*, 2, pp. 28
- Helweg-Larsen J (2004) *Pneumocystis jirovecii*. Applied molecular microbiology, epidemiology and diagnosis. *Dan Med Bull*, 51, pp. 251-273.
- Helweg-Larsen J, Jensen JS, Lundgren B (1997) Non-invasive diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia by PCR on oral washes. *Lancet*, 350, pp.1363.
- Hidalgo A, Falco V, Mauleon S, Andreu J, Crespo M, Ribera E, Pahissa A, Cáceres J (2003) Accuracy of high-resolution CT in distinguishing between *Pneumocystis carinii* pneumonia and non-*Pneumocystis carinii* pneumonia in AIDS patients. *Eur Radiol*, 13, pp. 1179-1184.
- Huang L (2005) Clinical presentation and diagnosis of *Pneumocystis pneumonia* in HIV- infected patients. In: Walzer P, editor. *Pneumocystis pneumonia*. 3^a ed. Pp, 349-406, New York: Marcel and Dekker.
- Huang L, Morris A, Limper AH, Beck JM (2006) An Official ATS Workshop Summary: Recent advances and future directions in pneumocystis pneumonia (PCP). *Proc Am Thorac Soc*, 3, pp. 655-664.
- Huggett JF, Taylor MS, Kocjan G, Evans HE, Morris-Jones S, Gant V,...Miller RF (2008) Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Pneumocystis jirovecii* DNA in bronchoalveolar lavage fluid of HIV-infected patients. *Thorax*, 63, pp. 154-159.
- Ibelgaufts H (1995) *Dictionary of cytokines*. Ed 5^a. New York, NY: Editorial VCH.

- Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra JD (2000) *Immunobiology: the immune system in health and disease*. 4th ed. Barcelona: Masson.
- Jasmer RM, Edinburgh KJ, Thompson A, Gotway MB, Creasman JM, Huang L (2000) Clinical and radiographic predictors of the etiology of pulmonary nodules in HIV- infected patients. *Chest*, 117, pp. 1023-1030.
- Juliano JJ, Barnett E, Parobek CM, Taylor SM, Meshnick SR, Stone S, Chang E, Fong S, Huang L (2015) Use of Oropharyngeal Washes to Diagnose and Genotype *Pneumocystis jirovecii*. *Open Forum Infect Dis*, 2, pp.ofv080.
- Kamel S, O'Connor S, Lee N, Filshie R, Nandurkar H, Tam CS (2010) High incidence of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients receiving biweekly Rituximab and cyclophosphamide, adriamycin, vincristine, and prednisone. *Leuk Lymphoma*, 51, pp. 797-801.
- Kaneko Y, Suwa A, Ikeda Y, Hirakata M (2006) *Pneumocystis jirovecii* pneumonia associated with low-dose methotrexate treatment for rheumatoid arthritis: report of two cases and review of the literature. *Mod Rheumatol*, 16, pp. 36-38.
- Kaur N, Mahl TC (2007) *Pneumocystis jirovecii* (carinii) pneumonia after infliximab therapy: a review of 84 cases. *Dig Dis Sci*, 52, pp. 1481-1484.
- Kay J, Fleischmann R, Keystone E, Hsia EC, Hsu B, Mack M, Goldstein N, Braun J, Kavanaugh A (2015) Golimumab 3-year safety update: an analysis of pooled data from the long-term extensions of randomised, double-blind, placebo-controlled trials conducted in patients with rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis or ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*, 74, pp. 538-546.
- Keely SP, Stringer JR (1997) Sequences of *Pneumocystis carinii* f. sp. hominis strains associated with recurrent pneumonia vary at multiple loci. *J Clin Microbiol*, 33, pp. 2745-2747.
- Keyser FD (2011) Choice of Biologic Therapy for Patients with Rheumatoid Arthritis: The Infection Perspective. *Curr Rheumatol Rev*, 7, pp. 77-87.
- Keystone E, Heijde Dv, Mason D Jr, Landewé R, Vollenhoven RV, Combe B, Emery P, Strand V, Mease P, Desai C, Pavelka K (2008). Certolizumab pegol plus methotrexate is significantly more effective than placebo plus methotrexate in active rheumatoid arthritis: findings of a fifty-two-week, phase III, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study. *Arthritis Rheum*, 58, pp. 3319-3329.
- Khalife S, Aliouat EM, Aliouat-Denis CM, Gantois N, Devos P, Mallat H,... Fréalle E (2015) First data on *Pneumocystis jirovecii* colonization in patients with respiratory diseases in North Lebanon. *New Microbes New Infect*, 6, pp. 11-14.

- Köhler G, Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256, pp. 495-497.
- Koike T, Harigai M, Inokuma S, Ishiguro N, Ryu J, Takeuchi T,... Suzukawa M. (2011) Postmarketing surveillance of safety and effectiveness of etanercept in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol*, 21, pp. 343-351.
- Kolliaas G, Douni E, Kassiootis G, Kontoyiannis D (1999) The function of tumor necrosis factor and receptors in models of multi-organs inflammation, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease. *Ann Rheum Dis*, 58 (Suppl I), pp. I32-I39.
- Komano Y, Harigai M, Koike R, Sugiyama H, Ogawa J, Saito K,... Miyasaka N (2009) *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with rheumatoid arthritis treated with infliximab: a retrospective review and case-control study of 21 patients. *Arthritis Rheum*, 61, pp. 305-312.
- Kopylov U, Afif W (2014) Risk of infections with biological agents. *Gastroenterol Clin North Am*, 43, pp. 509-524.
- Kottom TJ, Limper AH. Cell wall assembly by *Pneumocystis carinii*. Evidence for a unique gsc-1 subunit mediating beta-1,3-glucan deposition. *J Biol Chem* 2000;275:40628-34
- Kottom TJ, Köhler JR, Thomas CF Jr, Fink GR, Limper AH (2003). Lung epithelial cells and extracellular matrix components induce expression of *Pneumocystis carinii* STE20, a gene complementing the mating and pseudohyphal growth defects of STE20 mutant yeast. *Infect Immun*, 71, pp. 6463-6467.
- Laros-van Gorkom BA, Huisman CA, Wijermans PW, Schipperus MR (2007) Experience with alemtuzumab in treatment of chronic lymphocytic leukaemia in the Netherlands. *Neth J Med*, 65, pp. 333-338.
- Lawrance IC, Radford-Smith GL, Bampton PA, Andrews JM, Tan PK, Croft A,... Florin TH (2010) Serious infections in patients with inflammatory bowel disease receiving anti-tumor-necrosis-factor-alpha therapy: an Australian and New Zealand experience. *J Gastroenterol Hepatol*, 25, pp. 1732-1738.
- Lees CW, Ali AI, Thompson AI, Ho GT, Forsythe RO, Marquez L, Cochrane CJ,... Satsangi J (2009) The safety profile of anti-tumour necrosis factor therapy in inflammatory bowel disease in clinical practice: analysis of 620 patient-years follow-up. *Aliment Pharmacol Ther*, 29, pp. 286-297.
- Leigh TR, Wakefield AE, Peters SE, Hopkin JM, Collins JV (1992). Comparison of DNA amplification and immunofluorescence for detecting *Pneumocystis carinii* in patients receiving immunosuppressive therapy. *Transplantation*, 54, pp. 468-470.

- LeMense GP, Sahn SA (1994) Opportunistic infection during treatment with low dose methotrexate. *Am J Respir Crit Care Med*, 150, pp. 258-260.
- Li J, Yin Q, Wu H (2013) Structural basis of signal transduction in the TNF receptor superfamily. *Adv Immunol*, 119, pp. 135-153.
- Limper AH, Offord KP, Smith TF, Martin II WJ (1989) Pneumocystis carinii pneumonia. Differences in lung parasite number and inflammation in patients with and without AIDS. *Am Rev Respir Dis*, 140, pp. 1204-1209.
- Lipsky PE, Van der Heijde DM, St Clair EW, Furst DE, Breedveld FC, Kalden JR,...Maini RN (2000) Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. Anti-Tumor necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group. *N Engl J Med*, 343, pp. 1594-1602.
- Listing J, Strangfeld A, Kary S, Rau R, von Hinueber U, Stoyanova-Scholz M,... Zink A (2005) Infections in patients with rheumatoid arthritis treated with biologic agents. *Arthritis Rheum*, 52, pp. 3403-3412.
- Maini RN, Breedveld FC, Kalden JR, Smolen JS, Furst DE, Weisman MH,... Lipsky PE (2004) Sustained improvement over two years in physical function, structural damage, and signs and symptoms among patients with rheumatoid arthritis treated with infliximab and methotrexate. *Arthritis Rheum*, 50, 1051-1065.
- Martín Garrido I, González León R, Varela JM, Calderón EJ (2012) The Risk of Infection in Patients Treated with Infliximab. En Medrano Acevedo AD, Fajardo Gaiten M (editores), *Infliximab pharmacology, uses and limitations*, pp. 1-39. New York: Nova Science Publishers, Inc.
- Martinez A, Halliez MC, Aliouat el M, Chabé M, Standaert-Vitse A, Fréalle E, Gantois N, Pottier M, Pinon A, Dei-Cas E, Aliouat-Denis CM (2013) Growth and airborne transmission of cell-sorted life cycle stages of *Pneumocystis carinii*. *PLoS One*, 8, pp. e79958.
- Maskell NA, Waine DJ, Lindley A (2003) Asymptomatic carriage of *Pneumocystis jirovecii* in subjects undergoing bronchoscopy: a prospective study. *Thorax*, 58, pp. 594-597.
- Matsumoto Y, Yoshida Y (1984) Sporogony in *Pneumocystis carinii*: synaptonemal complexes and meiotic nuclear divisions observed in precysts. *J Protozool*, 31, pp. 420-428.
- Matsumura Y, Shindo Y, Inuma Y, Yamamoto M, Shirano M, Matsushima A,... Ichiyama S (2011) Clinical characteristics of *Pneumocystis pneumonia* in non-HIV patients and prognostic factors including microbiological genotypes. *BMC Infect Dis*, 11, pp.76.

- Martín Juan J, Gómez Izquierdo L, Jara L, Rodríguez Becerra E, de la Horra C, Montes-Cano MA, Respaldiza N, Calderón E (2008) Factores relacionados con la infección por *Pneumocystis jirovecii* en pacientes con enfermedad pulmonar intersticial difusa (EPID). *Neumosur*, 20, pp. 65-73.
- Medrano FJ, Montes-Cano M, Conde M, de la Horra C, Respaldiza N, Gasch A,... Calderon EJ (2005) *Pneumocystis jirovecii* in general population. *Emerg Infect Dis*, 11, pp. 245-250.
- Mekinian A, Durand-Joly I, Hatron PY, Moranne O, Denis G, Dei-Cas E,... Queyrel V (2011) *Pneumocystis jirovecii* colonization in patients with systemic autoimmune diseases: prevalence, risk factors of colonization and outcome. *Rheumatology (Oxford)*, 50, pp. 569-577.
- Michaud TL, Rho YH, Shamliyan T, Kuntz KM, Choi HK (2014). The comparative safety of tumor necrosis factor inhibitors in rheumatoid arthritis: a meta-analysis update of 44 trials. *Am J Med*, 127, pp. 1208-1232.
- Mofenson LM, Brady MT, Danner SP, Dominguez KL, Hazra R, Handelsman E,... American Academy of Pediatrics (2009) Guidelines for the Prevention and Treatment of Opportunistic Infections among HIV-exposed and HIV-infected children: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America, the Pediatric Infectious Diseases Society, and the American Academy of Pediatrics. *MMWR Recomm Rep*, 58 (RR-11), pp. 1-166.
- Montes-Cano MA, de la Horra C, Martin-Juan J, Varela JM, Torronteras R, Respaldiza N, Medrano FJ, Calderón EJ (2004) *Pneumocystis jirovecii* genotypes in the Spanish population. *Clin Infect Dis*, 39, pp. 123-128.
- Mori S, Cho I, Ichiyasu H, Sugimoto M (2008) Asymptomatic carriage of *Pneumocystis jirovecii* in elderly patients with rheumatoid arthritis in Japan: a possible association between colonization and development of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia during low-dose MTX therapy. *Mod Rheumatol*, 18, pp. 240-246.
- Mori S, Cho I, Sugimoto M (2009) A followup study of asymptomatic carriers of *Pneumocystis jirovecii* during immunosuppressive therapy for rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 36, pp. 1600-1605.
- Morris A, Lundgren JD, Masur H, Walzer PD, Hanson DL,... Kaplan JE (2004) Current epidemiology of *Pneumocystis pneumonia*. *Emerg Infect Dis*, 10, pp. 1713-1720.
- Morris A, Groner G, Lebedeva IP, Beard CB, Kingsley LA, Norris KA (2004) Prevalence and clinical predictors of *Pneumocystis carinii* colonization among human immunodeficiency virus infected men. *AIDS*, 18, pp. 793-798.

- Morris A, Sciurba FC, Norris KA (2008) Pneumocystis: a novel pathogen in chronic obstructive pulmonary disease? *COPD*, 5, pp. 43-51.
- Nakamura H, Tateyama M, Tasato D, Haranaga S, Yara S, Higa F, Ohtsuki Y, Fujita J (2009) Clinical utility of serum beta-D-glucan and KL-6 levels in *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Intern Med*, 48, 195-202.
- Ng VL, Yajko DM, Hadley WK (1997) Extrapulmonary pneumocystosis. *Clin Microbiol Rev*, 10, pp. 401-418.
- Nevez G, Chabé M, Rabodonirina M, Virmaux M, Dei-Cas E, Hauser PM, Totet A (2008) Nosocomial *Pneumocystis jirovecii* infections. *Parasite*, 15, pp. 359-365.
- Norris KA, Morris A. (2011) *Pneumocystis* infection and the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Immunol Res*, 50, pp.175-180.
- Obeid KM, Aguilar J, Szpunar S, Sharma M, Del Busto R, Al-Katib A, Johnson LB (2011) Risk Factors for *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia in Patients With Lymphoproliferative Disorders. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 12, pp. 66-69.
- Olsson M, Strålin K, Holmberg H (2001) Clinical significance of nested polymerase chain reaction and immunofluorescence for detection of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Clin Microbiol Infect*, 7, pp. 492-497.
- Opravil M, Marincek B, Fuchs WA, Weber R, Speich R, Battegay M, Russi EW, Lüthy R (1994) Shortcomings of chest radiography in detecting *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 7, pp. 39-45.
- Oz HS, Hughes WT (1999) DNA amplification of nasopharyngeal aspirates in rats: a procedure to detect *Pneumocystis carinii*. *Microb Pathog*, 27, pp. 119-121.
- Palframan R, Airey M, Moore A, Vugler A, Nesbitt A (2009) Use of biofluorescence imaging to compare the distribution of certolizumab pegol, adalimumab, and infliximab in the inflamed paws of mice with collagen-induced arthritis. *J Immunol Methods*, 348, pp. 36-41.
- Panel de expertos de Grupo de Estudio del Sida; Plan Nacional sobre el Sida. Prevención de las infecciones oportunistas en pacientes adultos y adolescentes infectados por el VIH en el año 2008. Recomendaciones del Grupo de Estudio del Sida (GESIDA)/Plan Nacional sobre el Sida (2008) *Enferm Infecc Microbiol Clin* ;26(7):437-64
- Panos GZ, Karydis I, Velakoulis SE, Falagas ME (2007) Multi-skeletal *Pneumocystis jirovecii* (*carinii*) in an HIV-seropositive patient. *Int J STD AIDS*, 18, pp. 134-137.

- Papadakis KA (2006) Adalimumab for the treatment of Crohn's disease. *Expert Rev Clin Immunol*, 2, pp. 11-15.
- Pereira RM, Müller AL, Zimerman RA, Antunes DB, Zinn VF, Friaiza V,... Wissmann G (2014) High prevalence of *Pneumocystis jirovecii* colonization among HIV-positive patients in southern Brazil. *Med Mycol*, 52, pp. 804-809.
- Pareja JG, Garland R, Koziel H (1998) Use of adjunctive corticosteroids in severe adult non-HIV *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Chest*, 113, pp.1215-1214.
- Pasut G (2014) Pegylation of biological molecules and potential benefits: pharmacological properties of certolizumab pegol. *BioDrugs*, 28 Suppl 1, pp. S15-23.
- Perruquet JL, Harrington TM, Davis DE (1983) *Pneumocystis carinii* pneumonia following methotrexate therapy for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 26, pp. 1291-1292.
- Pneumocystis* Workshop. Revised nomenclature for *Pneumocystis carinii*. (1994) *J Eukaryot Microbiol*, 41, pp. 121S-122S.
- Porter A (1915). The occurrence of *Pneumocystis carinii* in mice in England. *Parasitology*, 8, pp. 255.
- Puimège L, Libert C, Van Hauwermeiren F (2014) Regulation and dysregulation of tumor necrosis factor receptor-1. *Cytokine Growth Factor Rev*, 25, pp. 285-300.
- Redhead SA, Cushion M, Frenkel JK, Stringer JR (2006) *Pneumocystis* and *Trypanosoma cruzi*: Nomenclature and Typifications. *J Eukaryot Microbiol*, 53, pp. 2-11.
- Respaldiza N, Montes-Cano MA, Dapena FJ, de la Horra C, Mateos I, Medrano FJ, Calderon E, Varela JM (2005) Prevalence of colonization and genotypic characterisation of *Pneumocystis jirovecii* among cystic fibrosis patients in Spain. *Clin Microbiol Infect*, 11, pp. 1012-5.
- Respaldiza N, Montes-Cano MA, Friaiza V, Muñoz-Lobato F, Medrano FJ, Varela JM, Calderon E, De la Horra C (2006) Usefulness of Oropharyngeal Washings for Identifying *Pneumocystis jirovecii* Carriers. *J Eukaryot Microbiol*, 53, pp. S100-S101
- Ripamonti C, Orenstein A, Kutty G, Huang L, Schuegger R, Sing A,... Kovacs JA (2009) Restriction Fragment Length Polymorphism Typing Demonstrates Substantial Diversity among *Pneumocystis jirovecii* Isolates. *J Infect Dis*, 200, pp.1616-1622.
- Rivero L, de la Horra C, Montes-Cano MA, Rodríguez-Herrera A, Respaldiza N, Friaiza V,... Calderon EJ (2008) *Pneumocystis jirovecii* transmission from immunocompetent carriers to infant. *Emerg Infect Dis*, 14, pp. 1116-1118.

- Roblot F, Godet C, Le Moal G, Garo B, Faouzi Souala M,... Becq-Giraudon B (2002) Analysis of underlying diseases and prognosis factors associated with *Pneumocystis carinii* pneumonia in immunocompromised HIVnegative patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*, 21, pp. 523–531.
- Russian DA, Levine SJ (2001) *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients without HIV infection. *Am J Med Sci*, 321, pp. 56-65.
- Salliot C, Gossec A, Ruyssen-Witrand, Luc M, Duclos S, Guignard S, Dougados M (2007) Infections during tumour necrosis factor-alfa blocker therapy for rheumatic diseases in daily practice: a systematic retrospective study of 709 patients. *Rheumatology*, 46, pp. 327-334.
- Salmon-Ceron D, Tubach F, Lortholary O, Chosidow O, Bretagne S, Nicolas N,... RATIO group (2011) Drug-specific risk of non tuberculosis opportunistic infections in patients receiving anti-TNF therapy reported to the 3-year prospective French RATIO registry. *Ann Rheum Dis*, 70, pp. 616-623.
- Scallon BJ, Moore MA, Trinh H, Knight DM, Ghayeb J (1995) Chimeric anti-TNF-alpha monoclonal antibody cA2 binds recombinant transmembrana TNF-alpha and activates immune effector functions. *Cytokine*, 7, pp. 251-9
- Scott LJ (2014) Etanercept: a review of its use in autoimmune inflammatory diseases. *Drugs*, 74, pp. 1379-1410.
- Schneider P, Willen L, Smulski CR (2014) Tools and techniques to study ligand-receptor interactions and receptor activation by TNF superfamily members. *Methods Enzymol*, 545, pp. 103-125.
- Sepkowitz KA (2002) Opportunistic infections in patients with and patients without acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Infect Dis*, 34, pp.1098-1107.
- Sesterhenn TM, Slaven BE, Keely SP, Smulian AG, Lang BF, Cushion MT. (2010) Sequence and structure of the linear mitochondrial genome of *Pneumocystis carinii*. *Mol Genet Genomics*, 283, pp.63-72.
- Shimizu Y, Sunaga N, Dobashi K, Fueki M, Fueki N, Makino S, Mori M (2009) Serum markers in interstitial pneumonia with and without *Pneumocystis jirovecii* colonization: a prospective study. *BMC Infect Dis*, 9, pp. 47.
- St Clair EW, Van der Heijde DM, Smolen JS, Maini RN, Bathon JM, Emery P,... Baker D (2004) Combination of infliximab and methotrexate therapy for early rheumatoid arthritis: a randomized, controlled trial. *Arthritis Rheum*, 50, pp. 3432-3443.
- Stringer SL, Stringer JR, Blas MA (1989). *Pneumocystis carinii*: sequence from ribosome RNA implies a clear relationship with fungi. *Exp Parasitol*, 68, pp. 450-561.

- Suwannalai P, Auethavekiat P, Udomsubpayakul U, Janvitayanujit S (2009) The infectious profiles of anti-tumor necrosis factor agents in a Thai population: a retrospective study at the university-based hospital. *Int J Rheum Dis*, 12, pp. 118-1124.
- Tasaka S, Hasegawa N, Kobayashi S, Yamada W, Nishimura T, Takeuchi T, Ishizaka A (2007) Serum indicators for the diagnosis of *Pneumocystis pneumonia*. *Chest*, 131, pp. 1173-1180.
- Tasaka S, Kobayashi S, Kamata H, Kimizuka Y, Fujiwara H, Funatsu Y,... Hasegawa N (2010) Cytokine profiles of bronchoalveolar lavage fluid in patients with *Pneumocystis pneumonia*. *Microbiol Immunol*, 54, pp. 425-433.
- Takeuchi T, Tatsuki Y, Nogami Y, Ishiguro N, Tanaka Y, Yamanaka H,... Koike T (2008) Postmarketing surveillance of the safety PCP in RA Patients Treated With Infliximab 311 profile of infliximab in 5000 Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 67, pp. 189-194.
- Thomas CF Jr, Limper AH (2004) *Pneumocystis pneumonia*. *N Engl J Med*, 350, pp. 2487-2498.
- Tumeh SS, Belville JS, Pugatch R, McNeil BJ (1992) Ga-67 scintigraphy and computed tomography in the diagnosis of pneumocystis carinii pneumonia in patients with AIDS. A prospective comparison. *Clin Nucl Med*, 17, pp. 387-394.
- Van Dullemen HM, Van Deventer SJ, Hommes DW, Bijl HA, Jansen J, Tytgat GN, Woody J (1995) Treatment of Crohn's disease with anti-tumor necrosis factor chimeric monoclonal antibody (cA2). *Gastroenterology*, 109, pp. 129-135.
- Van der Meer G, Brug SL (1942) Infection a *Pneumocystis* chez l'homme et chez les animaux. *Ann Soc Belg Med Trop*, 22, pp. 301-307.
- Vanêk J, Jírovec O, Lukes J (1953) Interstitial plasma cell pneumonia in infants. *Ann Pediatr*, 180, pp. 1-21.
- Vananuvat P, Suwannalai P, Sungkanuparph S, Limsuwan T, Ngamjanyaporn P, Janwityanujit S (2011) Primary prophylaxis for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with connective tissue diseases. *Semin Arthritis Rheum*, 41, pp. 497-502.
- Vargas SL, Pizarro P, López-Vieyra M, Neira-Avilés P, Bustamante R, Ponce CA (2010) *Pneumocystis* colonization in older adults and diagnostic yield of single versus paired noninvasive respiratory sampling. *Clin Infect Dis*, 50, pp. e19-21.
- Verweij CI (1999) Tumor necrosis factor gene polymorphisms as severity markers in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 58, pp. 120-126.

- Vidal S, de la Horra C, Martín J, Montes-Cano MA, Rodríguez E, Respaldiza N, Calderón EJ (2006) *Pneumocystis jirovecii* colonisation in patients with interstitial lung disease. *Clin Microbiol Infect*, 12, pp. 231-235.
- Voulgari PV (2010) Golimumab: a new anti-TNF-alpha agent for rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis and ankylosing spondylitis. *Expert Rev Clin Immunol*, 6, pp. 721-733.
- Wakefield AE, Pixley FJ, Banerji S, Sinclair K, Miller RF, Moxon ER, Hopkin JM (1990) Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. *Lancet*, 336, pp. 451-453.
- Wakefield AE, Stringer JR, Tamburrini E, Dei-Cas E (1998) Genetics, metabolism and host specificity of *Pneumocystis carinii*. *Med Mycol*, 36 Suppl 1, pp. 183-193.
- Walzer PD, Perl DP, Krogstead DJ, Rawson P, Schultz MG (1974) *Pneumocystis carinii* pneumonia in the United States. Epidemiologic, diagnostic, and clinical features. *Ann Intern Med*, 80, pp. 83-93.
- Ward MM, Donald F (1999) *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with connective tissue diseases: the role of hospital experience in diagnosis and mortality. *Arthritis Rheum*, 4, pp. 780-789.
- Westhovens R, Yocum D, Han J, Berman A, Strusberg I, Geusens P, Rahman MU. (STAR study group). (2006) The safety of infliximab, combined with background treatments, among patients with Rheumatoid Arthritis and various comorbidities. *Arthritis Rheum*, 54, pp. 1075-1086.
- Willrich MA, Murray DL, Snyder MR (2015) Tumor necrosis factor inhibitors: clinical utility in autoimmune diseases. *Transl Res*, 165, pp. 270-282.
- Wissmann G, Varela JM, Calderón EJ (2008) Prevention of *Pneumocystis* pneumonia in patients with inflammatory bowel disease based on the detection of *Pneumocystis* colonization. *Inflamm Bowel Dis*, 14, pp. 1751-1752.
- Wissmann G, Morilla R, Friaza V, Calderón E, Varela JM (2010). El ser humano como reservorio de *Pneumocystis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 28, pp. 38-43.
- Yale SH, Limper AH (1996) *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients without acquired immunodeficiency syndrome: associated illness and prior corticosteroid therapy. *Mayo Clin Proc*, 71, pp. 5-13.
- Zhuang H, Alavi A (2002) 18-fluorodeoxyglucose positron emission tomographic imaging in the detection and monitoring of infection and inflammation. *Semin Nucl Med*, 32, pp. 47-59.