

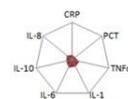
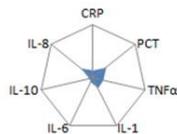
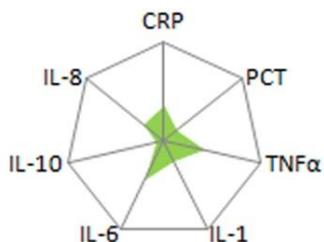
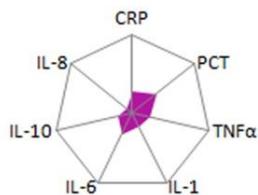
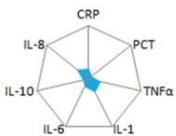
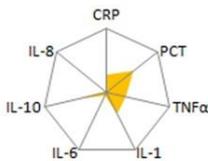
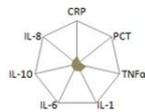
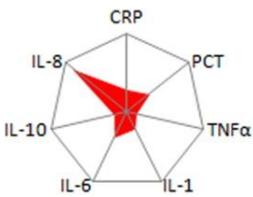
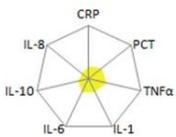
# INTERACCIONES ENTRE ENFERMO Y BACTERIAS INFECCIOSAS CAUSANTES DE NEUMONÍA

Programa de Doctorado de Medicina

José Miguel Sahuquillo Arce

Directora de la Tesis:  
Dra. Rosario Menéndez Villanueva  
Hospital Universitario y Politécnico La Fe

Valencia, septiembre 2022





A todos los que han hecho llegar hasta aquí a este nefelibata

# Agradecimientos

Me gustaría expresar mi especial agradecimiento a la Dra. **Rosario Menéndez Villanueva** por haberme incluido en su grupo de investigación y confiar en mí durante todos estos años.

A los miembros del grupo de investigación de infecciones respiratorias del Instituto de Investigación del Hospital La Fe, sin su esfuerzo nada de esto habría sido posible.

A la gente del servicio de Microbiología del Hospital la Fe. Especialmente a **Miguel Gobernado Serrano** y **María Santos Durántez**, con ellos empezó todo; a **Carmen Pérez Bellés** por hacerme amar la microbiología *per se*; a **Beatriz Acosta Boga** porque digámoslo, yo soy Bea; a **Geli** y **Conchín**, las hermanas **Briones**, por enseñarme lo que es el trabajo; a los **tenores** por cantar cuando estaba afónico; a **Gluti** por ser, alma joven, alma vieja; a **José Luis López Hontangas** por haberme soportado todos estos años, y a tantos más que mencionarlos a todos llenaría mil páginas...

A **Eugenio** y **Pepita**, ¡mirad lo que habéis hecho!

A **Gema** y **Eugenio**, porque hablamos el mismo idioma.

A **Lucía** y **Diego**, sin ellos no habría nada.

And **Barbara**, you are always on my mind.

A todos, muchas gracias.

# ÍNDICE

Presentación.....	7
Introducción .....	10
Justificación y objetivos de los artículos .....	13
Estudio 1: Cytokine activation patterns and biomarkers are influenced by microorganisms in community-acquired pneumonia.....	13
Estudio 2: Age-related risk factors for bacterial aetiology in community-acquired pneumonia. ....	15
Estudio 3: Influence of environmental conditions and pollution on the incidence of <i>Streptococcus pneumoniae</i> infections.....	17
Resultados.....	19
Figura 1. Patrones inflamatorios.....	20
Figura 2. Patrones inflamatorios comparados en pacientes con y sin bacteriemia. ...	20
Figura 3. Patrones inflamatorios comparados en pacientes con NAC con etiología conocida en función de la toma de antibióticos. ....	21
Figura 4A. MultiDimensional Scaling en dos dimensiones de los patrones inflamatorios de los diferentes microorganismos.....	21
Figura 4B. MultiDimensional Scaling en tres dimensiones de los patrones inflamatorios de los diferentes microorganismos.....	22
Estudio 1: Cytokine activation patterns and biomarkers are influenced by microorganisms in community-acquired pneumonia.....	23
Tabla 1. Datos demográficos, comorbilidades, Clasificación de Fine y mortalidad según etiología. ....	26
Tabla 2. Resultados de PCR, PCT and Citocinas según la presencia de un agente etiológico o bacteriemia.....	26
Tabla 3. Resultados de PCR, PCT y Citocinas según el agente etiológico.....	27
Tabla 4. Biomarcadores y citocinas según agente etiológico y estado de sepsis. .	28
Tabla 5. Compación de los principales grupos de patógenos y puntos de corte diagnósticos.....	29
Tabla 6. Efecto del tratamiento antimicrobiano previo .....	29
Estudio 2: Age-related risk factors for bacterial aetiology in community-acquired pneumonia. ....	30
Tabla 1. Características demográficas, comorbilidades, PSI inicial y pruebas diagnósticas por grupos de edad .....	33
Tabla 2. Etiología por grupos de edad.....	34
Tabla 3. Pruebas diagnósticas realizadas por grupo de edad .....	35

Tabla 4. Etiología (%) en función de la edad y las comorbilidades .....	36
Tabla 5. Modelos de regresión múltiple para predecir el microorganismo causal en función de las comorbilidades y grupo de edad. ....	37
Estudio 3: Influence of environmental conditions and pollution on the incidence of <i>Streptococcus pneumoniae</i> infections.....	38
Tabla 1. Modelos matemáticos .....	39
Discusión .....	40
Estudio 1: Cytokine activation patterns and biomarkers are influenced by microorganisms in community-acquired pneumonia.....	40
Estudio 2: Age-related risk factors for bacterial aetiology in community-acquired pneumonia. ....	45
Estudio 3: Influence of environmental conditions and pollution on the incidence of <i>Streptococcus pneumoniae</i> infections.....	48
Bibliografía .....	51
Estudio 1: Cytokine activation patterns and biomarkers are influenced by microorganisms in community-acquired pneumonia.....	51
Estudio 2: Age-related risk factors for bacterial aetiology in community-acquired pneumonia. ....	55
Estudio 3: Influence of environmental conditions and pollution on the incidence of <i>Streptococcus pneumoniae</i> infections.....	61
Conclusiones .....	63
Anexo: Artículos incluidos en la presente tesis.....	65

# Presentación

La presente tesis sigue las directrices para la presentación de tesis doctorales como compendio de publicaciones divulgadas por la Comisión de la Escuela de Doctorado en Ciencias Sociales de la Universitat de València el 31 enero de 2019.

Los estudios que forman parte de esta Tesis Doctoral pertenecen a una misma línea de investigación. El presente trabajo está dirigido a conocer las interacciones que existen en los procesos infecciosos pulmonares entre el paciente y su respuesta inflamatoria, las patologías que padece y el medio ambiente. El conocimiento de la respuesta de un determinado paciente a una neumonía es fundamental para restablecer su estado de salud lo antes posible; además, nos puede mostrar la identidad del patógeno asociado y así, instaurar un tratamiento antimicrobiano adecuado con prontitud. Por otro lado, saber a qué microorganismos están asociados a las patologías propias del paciente antes de la infección nos ayudará a instaurar un tratamiento antimicrobiano dirigido y temprano, incluso preventivo. Por último, saber en qué momentos es más frecuente la aparición de una neumonía adquirida en la comunidad (NAC) y por qué, nos sitúa un paso por delante de la enfermedad, dándonos la oportunidad de proteger al paciente.

Los resultados de los estudios incluidos han aportado información relevante y, por desgracia, de rabiosa actualidad en estos momentos de pandemia global por la COVID-19, durante la cual mucho se ha hablado de las comorbilidades relacionadas con la muerte de los pacientes infectados, la respuesta inflamatoria desencadenada o del efecto que tendría el cambio de estación a la

expansión del virus SARS-CoV-2. Los resultados están recopilados en tres artículos originales, publicados en revistas de amplia difusión internacional en el campo de la neumología, con un factor de impacto global de 13,696 puntos.

Esta tesis supone una aportación original desde el punto de vista clínico a la búsqueda de medidas eficaces en el tratamiento de pacientes con NAC.



# Introducción

La vía respiratoria está expuesta continuamente a agentes ambientales y microorganismos potencialmente patógenos. El epitelio ciliado, los mucopolisacáridos y los macrófagos alveolares son capaces de destruir y expulsar del espacio aéreo a los agentes patógenos y evitar la progresión a una invasión tisular. Cuando dichas medidas son superadas aparece una infección que activa una serie de citocinas y marcadores inflamatorios, cuyo objetivo es instaurar una respuesta inmunitaria que elimine al patógeno. Esta reacción no se limita únicamente al pulmón, también existe una respuesta sistémica que tendrá repercusiones en el desarrollo del proceso, pronóstico y resultado final.

Una vez superados los preceptos de Henle-Koch-Loeffler, que exigen que un patógeno sea aislado en cultivos puros del foco de infección y que estos mismos cultivos sean capaces de producir un cuadro similar al ser inoculados en animales de experimentación, la ciencia está buscando nuevas definiciones para los patógenos infecciosos encontrados en infecciones que expliquen que es un “agente infeccioso”, para los nuevos como los virus o priones, pero también para los clásicos como el neumococo. Los estudios, y también la práctica clínica diaria, nos enseñan que el paciente y sus circunstancias son vitales para la instauración de un determinado proceso infeccioso, para la sintomatología que presenta y sobre todo, para su evolución. Y lo que en principio sería una respuesta inmunitaria frente a una infección acaba abarcando un espectro de manifestaciones que varían desde el cuadro más simple hasta el más catastrófico que puede llevar incluso a la muerte.

Características propias del paciente como la edad, hábitos tóxicos o enfermedades de base, pueden modificar la calidad y cantidad de esta respuesta; pero, también el propio agente infeccioso puede determinarla con factores intrínsecos como la presencia de una capsula, los lipopolisacaridos de la pared celular, los factores de virulencia propios de cada especie, sus componentes antigénicos, la velocidad infectiva o el *quorum sensing*.

A pesar de las variaciones en la incidencia de la NAC entre diferentes regiones y estudios, su mayor prevalencia se encuentra en pacientes de 65 años o más, pero también en aquellos con enfermedades crónicas concomitantes, independientemente de la edad.

Conocer la respuesta del organismo ante los diferentes patógenos es fundamental para entender la evolución de la enfermedad y poder modificar su evolución. Además, entender que enfermedades o hábitos tóxicos favorecen la aparición de determinados microorganismos es clave para instaurar medidas profilácticas adecuadas, como pueden ser las vacunas, e iniciar prontamente un tratamiento adecuado.

Además, el medio ambiente juega un papel importante, muchas veces ignorado o asumido como “lo normal”, pero pocas veces estudiado en complejidad para intentar explicar en qué consiste dicha “normalidad”. ¿Por qué hay un aumento de NAC cuando llega el frío? ¿Qué efecto puede tener la contaminación ambiental en la instauración de una infección pulmonar? ¿O los rayos UVA?.

Es por ello que este compendio de artículos incide en la importancia del paciente, del microorganismo causante y de su entorno, aportando una visión

global de la enfermedad y mostrando como todos los factores interactúan para instaurar un proceso infeccioso.

Este compendio de artículos incluye:

1- Menéndez R, Sahuquillo-Arce JM, Reyes S, Martínez R, Polverino E, Cillóniz C, Córdoba JG, Montull B, Torres A. **Cytokine activation patterns and biomarkers are influenced by microorganisms in community-acquired pneumonia**. Chest. 2012 Jun;141(6):1537-1545. doi: 10.1378/chest.11-1446.

2- Sahuquillo-Arce JM, Menéndez R, Méndez R, Amara-Elori I, Zalacain R, Capelastegui A, Aspa J, Borderías L, Martín-Villasclaras JJ, Bello S, Alfageme I, de Castro FR, Rello J, Molinos L, Ruiz-Manzano J, Torres A. **Age-related risk factors for bacterial aetiology in community-acquired pneumonia**. Respirology. 2016 Nov;21(8):1472-1479. doi: 10.1111/resp.12851.

3- Sahuquillo-Arce JM, Ibáñez-Martínez E, Hernández-Cabezas A, Ruiz-Gaitán A, Falomir-Salcedo P, Menéndez R, López-Hontangas JL. **Influence of environmental conditions and pollution on the incidence of *Streptococcus pneumoniae* infections**. ERJ Open Res. 2017 Dec 1;3(4). pii: 00014-2017. doi: 10.1183/23120541.00014-2017. eCollection 2017 Oct.

# Justificación y objetivos de los artículos

## **Estudio 1: Cytokine activation patterns and biomarkers are influenced by microorganisms in community-acquired pneumonia.**

### **Justificación y objetivos**

El tracto respiratorio está expuesto constantemente a agresiones a su integridad por diversos microorganismos. Para prevenir las infecciones, existen una serie de respuestas innatas – epitelio ciliar, macrófagos y neutrófilos alveolares–que previenen la progresión de los microorganismos y el establecimiento de un proceso infeccioso.<sup>1,2</sup> Una vez superadas estas barreras, se establece una respuesta inflamatoria destinada a eliminar a los patógenos causantes del daño tisular, y esta respuesta puede ser tanto local como sistémica, estableciéndose una neumonía que es la principal causa de mortalidad por infección en países desarrollados.<sup>1,3-5</sup> La originalidad de este trabajo radica en que hasta la publicación de este artículo existían distintos estudios en los que se observaban alteraciones variables en la producción de citocinas en los procesos infecciosos pulmonares, pero estos patrones no se relacionaban con los microorganismos causantes ni con la gravedad de la infección.<sup>6</sup> Nuestra hipótesis de trabajo era que las respuestas inflamatorias desencadenadas durante un proceso infeccioso pulmonar estaban condicionadas por el agente causante; ya que cada microorganismo posee unas características propias en cuanto a su composición, sus factores de virulencia y la forma de establecer dicho proceso infeccioso.

Los objetivos de este estudio eran:

1. Investigar los patrones de respuesta inflamatoria sistémica de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (PCR).
2. Asociar dichos patrones a los microorganismos causantes y a la gravedad de la infección.
3. Estudiar la utilidad de los niveles de los biomarcadores PCT y PCR para el diagnóstico de bacteriemia.

### **Metodología**

La población del estudio consistió en pacientes ingresados por presentar Neumonía adquirida en la comunidad. Dicha población fue definida en función de sus características (sexo, edad), enfermedades crónicas que presentaban (diabetes, insuficiencia cardiaca, insuficiencia renal, enfermedad digestiva crónica, cirrosis hepática, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y enfermedad neurológica crónica), hábitos tóxicos (tabaco y alcohol), gravedad de la infección en función de la escala de Fine, presencia y gravedad de la sepsis, hipoxemia, necesidad de ventilación mecánica, muerte, toma de antimicrobianos antes de acudir al hospital y finalmente, por el microorganismo causante de la infección.

Las citocinas fueron medidas en plasma obtenido al ingreso del paciente. Para el diagnóstico etiológico se recogieron muestras respiratorias (esputo, lavado broncoalveolar o aspirado traqueal) para su cultivo y para realizar técnicas de biología molecular para la detección de virus, líquidos orgánicos para cultivo (sangre y líquido pleural), orina para la detección de antígenos urinarios, suero para determinaciones de serología de bacterias atípicas.

## **Estudio 2: Age-related risk factors for bacterial aetiology in community-acquired pneumonia.**

### **Justificación y Objetivos**

La NAC es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad<sup>1-3</sup> en los seres humanos y afectan a todos los grupos de edad, existiendo una mayor incidencia en pacientes mayores de 65 años, y especialmente, en pacientes con comorbilidades asociadas.

La edad es un factor significativo y tiene mucho peso en la incidencia de las infecciones pulmonares por diversos motivos. En primer lugar, los cambios fisiológicos producidos por el envejecimiento del parénquima pulmonar favorecen la retención de aire y una reducción o pérdida de efectividad del aclaramiento mucociliar; a esto hay que asociarle una respuesta inmune con una anergia fisiológica relativa y, por último, la presencia de comorbilidades.<sup>4-6</sup>

La originalidad de este trabajo radica en que hasta la fecha, existían estudios en los que se asociaban la etiología de la Neumonía adquirida en la comunidad con la presencia de comorbilidades en pacientes mayores de 65 años, pero no existían estudios en los que se intentara relacionar estas comorbilidades con etiologías específicas más allá de las asociaciones descritas previamente de *Legionella pneumophila* con el tabaco, o de *Pseudomonas aeruginosa* con la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC).<sup>7-8</sup>

Los objetivos de este estudio eran:

- 1- Identificar factores de riesgo para diferentes agentes infecciosos bacterianos.
- 2- Identificar factores de riesgo para cada grupo de edad.

- 3- Estudiar la etiología de las NAC en adultos menores de 65 años ya que la literatura científica específica sobre este grupo de pacientes es escasa.

### **Metodología**

En este estudio multicéntrico llevado a cabo en 13 hospitales españoles, la población consistió en pacientes ingresados por presentar NAC.<sup>9</sup> Los pacientes fueron clasificados en función de sus características (sexo, edad), enfermedades crónicas que presentaban (diabetes, insuficiencia cardiaca, insuficiencia renal, enfermedad digestiva crónica, cirrosis hepática, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y enfermedad neurológica crónica), hábitos tóxicos (tabaco y alcohol), gravedad de la infección al ingreso en función de su PSI (Pneumonia Severity Index), y finalmente, por el microorganismo causante de la infección. Además, los pacientes fueron divididos en tres grupos según su edad: jóvenes adultos <45 años, adultos entre 45 y 65 años, y >65 años.

## **Estudio 3: Influence of environmental conditions and pollution on the incidence of *Streptococcus pneumoniae* infections.**

### **Justificación y Objetivos**

*Streptococcus pneumoniae* es el patógeno bacteriano por excelencia a nivel pulmonar, sin embargo, se encuentra colonizando a un alto porcentaje de personas y las infecciones que produce presentan mucha variabilidad estacional y geográfica. La contaminación ambiental por productos derivados de la combustión de combustibles fósiles es un agente lesivo conocido a nivel pulmonar<sup>1</sup> por lo que nuestra hipótesis de trabajo era que este tipo de agresión sobre el tejido pulmonar debería de tener un reflejo en la aparición de NAC. Por ello, elegimos *S. pneumoniae* como patógeno a estudiar ya que es frecuente y disponíamos de abundantes datos. La originalidad de este estudio radica en que hasta la fecha, no existían estudios en los que se intentara asociar la incidencia en humanos de un patógeno específico con las condiciones medioambientales.

Los objetivos de este estudio eran:

- 1- Analizar la influencia de las condiciones ambientales en la incidencia de NAC por *S. pneumoniae* e infección neumocócica invasiva.
- 2- Analizar la influencia de la polución en la incidencia de NAC por *S. pneumoniae* e infección neumocócica invasiva.

### **Metodología**

Para ello se estudió la incidencia de NAC por *S. pneumoniae* e infección neumocócica invasiva en pacientes residentes en el área sanitaria del Hospital

Universitari i Politècnic La Fe durante dos años y se cotejaron con las condiciones ambientales (temperatura, humedad, radiación solar y nivel de ruido), con los niveles de gases atmosféricos (óxidos de nitrógeno, ozono, dióxido de azufre y monóxido de carbono) y con los niveles de partículas (PM) de 10  $\mu\text{m}$ , 2.5  $\mu\text{m}$  y 1  $\mu\text{m}$  de diámetro (datos obtenidos del Servicio de Calidad, Análisis Medioambiental y Contaminación Acústica del Ayuntamiento de Valencia). Los datos fueron agrupados por semanas y estudiados mediante una regresión logística lineal.

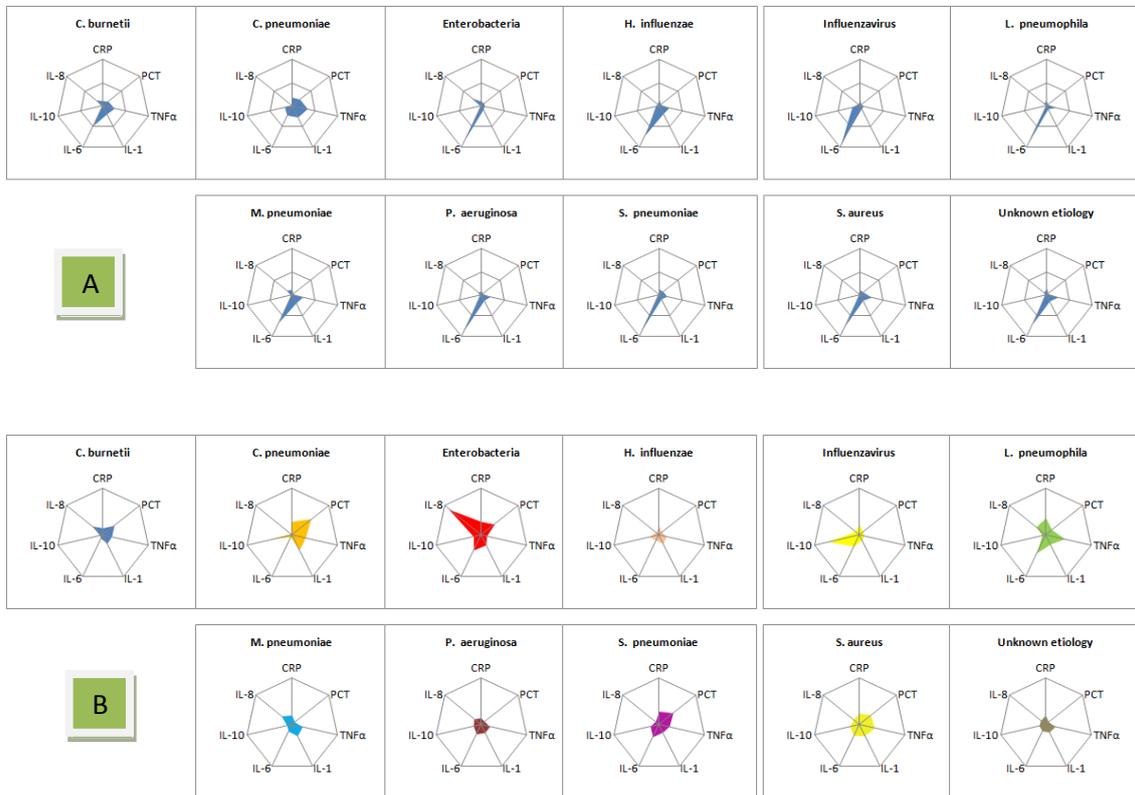
# Resultados

El primer estudio nos permitió definir los patrones inflamatorios inducidos por cada microorganismo (figura 1), y ver como estos pueden verse alterados en función de la gravedad del cuadro producido y de la toma previa de antibióticos (figuras 2 y 3). Con estos datos construimos un modelo multivariado de distancias euclídeas en el que las diferencias cualitativas de los patrones inflamatorios son representadas como distancias en un mapa, siendo las NAC por *S. pneumoniae*, Enterobacterias y *L. pneumophila* las que presentaban patrones más distintivos (Figuras 4A y 4B).

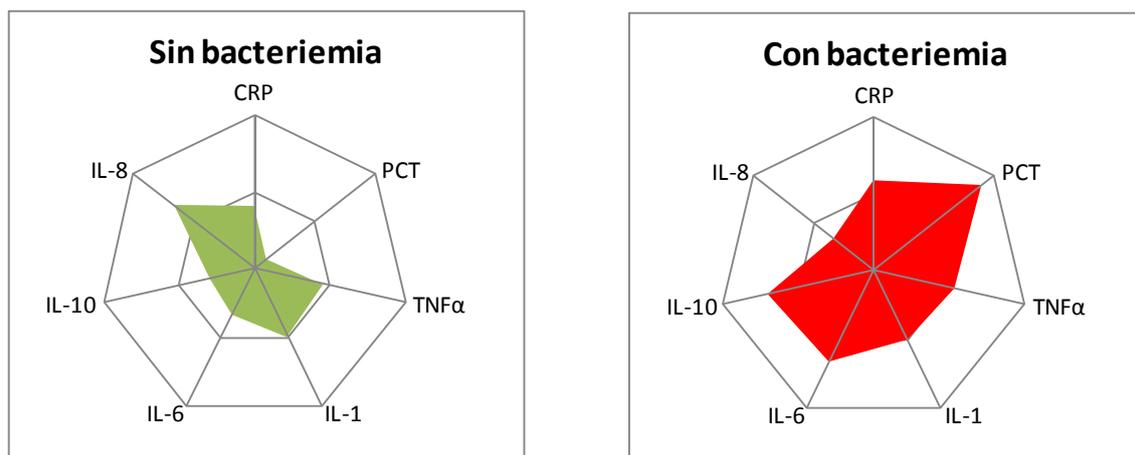
El segundo estudio nos permitió asociar patologías específicas, grupos de edad y hábitos tóxicos a microorganismos concretos. Esto permite definir mejor factores de riesgo individualizados, así como un mejor abordaje diagnóstico y terapéutico.

Por último, el tercer estudio nos permitió cuantificar el efecto del medio ambiente y de diversos gases tóxicos derivados del uso de combustibles fósiles en las NAC por *S. pneumoniae* e infección neumocócica invasiva producidas en el área de salud del Hospital Universitari i Politècnic La Fe de Valencia. Esto nos ayudó a crear un modelo matemático que ponía de relieve los agentes productores de efectos nocivos que facilitarían las infecciones por *S. pneumoniae*. Este modelo podría ser comparado con modelos de otras regiones para entender mejor las interacciones entre el efecto global del medio ambiente, la polución, los humanos y el poder patógeno de *S. pneumoniae*. Así mismo, podría ayudar a construir modelos similares para otros microorganismos.

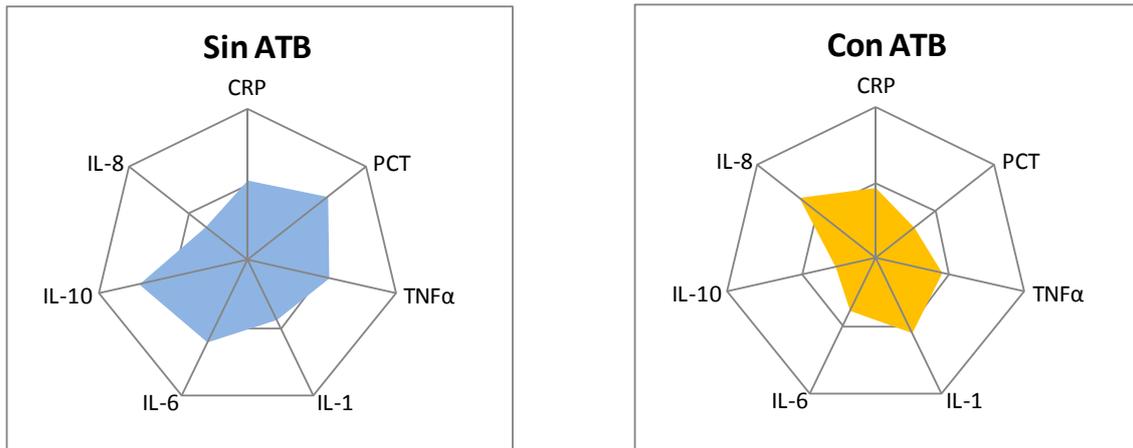
**Figura 1.** Patrones inflamatorios normalizados (A; relación interna entre marcadores inflamatorios de un mismo microorganismo) y comparados (B; relación de los marcadores inflamatorios entre los distintos patógenos).



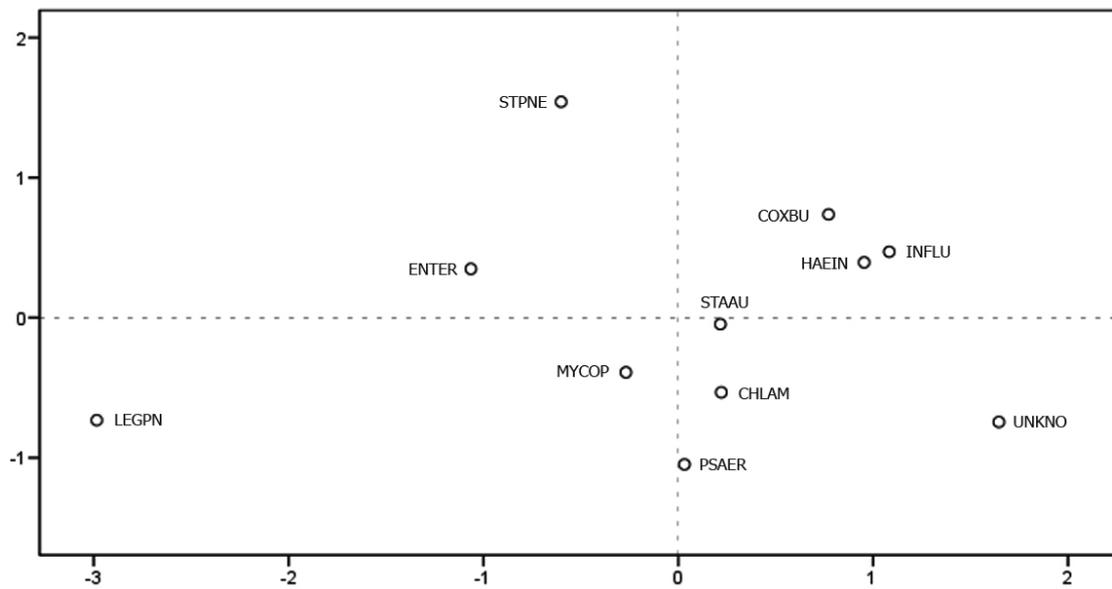
**Figura 2.** Patrones inflamatorios comparados en pacientes con y sin bacteriemia.



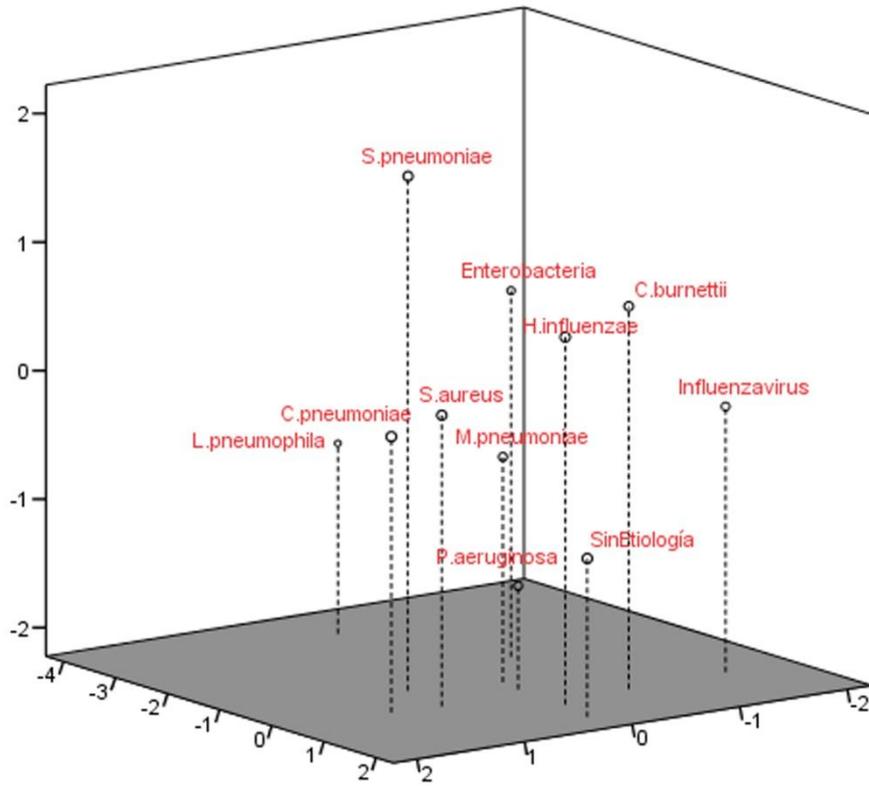
**Figura 3.** Patrones inflamatorios comparados en pacientes con NAC con etiología conocida en función de la toma de antibióticos.



**Figura 4A.** MultiDimensional Scaling en dos dimensiones de los patrones inflamatorios de los diferentes microorganismos.



**Figura 4B.** MultiDimensional Scaling en tres dimensiones de los patrones inflamatorios de los diferentes microorganismos.



## **Estudio 1: Cytokine activation patterns and biomarkers are influenced by microorganisms in community-acquired pneumonia.**

Se incluyeron 685 pacientes y en 295 (43%) se llegó a un diagnóstico causal (Tabla 1): 118 *S. pneumoniae* (17.2%), 24 *L. pneumophila* (3.5%), 18 *Pseudomonas aeruginosa* (2.6%), 14 *Haemophilus influenzae* (2%), 13 *Staphylococcus aureus* (1.9%), 13 *M. pneumoniae* (1.9%), 13 *Enterobacteriaceae* (1.9%), 12 virus (1.8%) (incluidos 9 virus de la gripe) , 8 *C. burnetii* (1.2%), tres *C. pneumoniae* (0.4%) y 35 infecciones mixtas (5%). Los grupos etiológicos fueron 390 sin causa (56.9%), 134 cocos Gram positivo (CGP) (19.6%), 69 bacilo Gram negativo (GNB) (10.1%), 24 bacterias atípicas (3.5%) y 12 virus (1.8%) (tabla1).

Se encontró bacteriemia en 48 casos (7%): 36 *S. pneumoniae*, siete *Enterobacteriaceae*, tres *H. influenzae*, cuatro *S. aureus*, tres *P. aeruginosa*, un *Streptococcus pyogenes* y un *Acinetobacter baumannii*. Seis de los casos fueron infecciones mixtas por varias bacterias, principalmente *S. pneumoniae*.

### **PCR y PCT**

Los pacientes con un diagnóstico etiológico mostraron una mayor PCR y PCT en comparación con los que no lo tenían (Tabla 2), y los niveles más altos se encontraron en aquellos con bacteriemia. El valor diagnóstico de PCT ( $\geq 0,36$ ) para predecir la bacteriemia fue el siguiente: sensibilidad del 85%, especificidad del 42% y valor predictivo negativo (VPN) del 98%.

Los niveles más altos de PCR y PCT se encontraron en la NAC causada por *L. pneumophila*, *Enterobacteriaceae* y *S. pneumoniae*. PCT también estaba elevada en *S. aureus*. La PCR y la PCT fueron más altas en la sepsis en aquellos con GPC y GNB en comparación con aquellos con causa desconocida y, después de la estratificación en función de hipoxemia o ventilación mecánica, las medianas fueron más altas en el GNB.

### **Citocinas**

Los pacientes con un diagnóstico etiológico presentaron una IL-6 más alta que los que no lo tenían, mientras que aquellos con bacteriemia mostraron la IL-6 y el TNF- $\alpha$  más altos (Tabla 2). Los microorganismos causales exhibieron diferentes patrones de citoquinas (Figura 1): *L. pneumophila* y *S. aureus* presentaron los TNF- $\alpha$  más elevados, y el primero también tenía una IL-6 elevada; Las enterobacterias tuvieron mayor IL-8, mientras que las NAC por el virus de la influenza mostraron mayor IL-10 (en comparación con las bacterias,  $p=0.03$ ) y un menor TNF- $\alpha$  (Tabla 3). Con respecto al estado de sepsis, la IL-6 fue mayor en la sepsis grave en aquellos con GPC y GNB en comparación con aquellos con causa desconocida (tabla 4). En los pacientes estratificados por hipoxemia y ventilación mecánica, los pacientes con GPC y GNB tuvieron mayor IL-6 (e IL-8 en GNB) en comparación con los de causa desconocida (tabla 5).

### **Antibióticos previos y marcadores inflamatorios.**

Doscientos treinta y tres pacientes (34%) habían recibido antibióticos antes del ingreso (Tabla 6) y tenían los niveles más bajos de PCT ( $p = 0.01$ ), IL-6 ( $p = 0.03$ ) e IL-10 ( $p = 0.01$ ), y más altos de IL- 8 ( $p=0.05$ ). La PCT fue mayor en

aqueños con causa conocida que no tomaron antibióticos previamente en comparación con los que lo hicieron ( $p=0.02$ ).

### **Modelo multivariado de distancia euclídea**

Las diferencias estadísticas entre citoquinas y biomarcadores en microorganismos convertidos en distancias en un espacio euclídeo bidimensional se muestran en la Figura 2. Encontramos tres microorganismos con distancias mayores: *L. pneumophila*, *S. pneumoniae* y *Enterobacteriaceae*; un grupo cercano de bacterias (*S. aureus*, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *C. burnetii* y *H. influenza*, junto con el virus Influenza); y un tercer grupo cercano a este último grupo, NAC de causa desconocida.

**Tabla 1.** Datos demográficos, comorbilidades, clasificación de Fine y mortalidad según etiología.

n(%)	Sin etiología (n=390)	Cocos Gram Positivo (n=134)	Bacilos Gram Negativo (n=69)	Atípicas (n=24)	Virus (n=12)
Sexo (H/M)	252/138 (64,6/35,4)	78/56 (58,2/41,8)	54/15 (78,3/21,7)	14/10 (58,3/41,7)	9/3 (75/25)
Edad media	67,2 ±17,2	66,6 ±17,8	68,8 ±13,9	53,9 ±22,3	62,1 ±16,9
Diabetes	77 (19,8)	29 (21,8)	9 (13)	1 (4,2)	2 (16,7)
Insuficiencia Cardíaca	77 (19,8)	21 (15,7)	16 (23,5)	3 (13)	1 (8,3)
Insuficiencia Renal Crónica	22 (5,6)	5 (3,7)	5 (7,2)	1 (4,2)	0 (0)
Enfermedad Tracto digestivo	58 (14,9)	32 (23,9)	17 (24,6)	5 (20,8)	1 (8,3)
Cirrosis	11 (2,8)	5 (3,7)	3 (4,3)	1 (4,2)	1 (8,3)
EPOC	80 (20,5)	20 (14,9)	22 (31,9)	3 (12,5)	0 (0)
Enfermedad Neurológica	87 (22,4)	28 (21,1)	17 (24,6)	1 (4,2)	1 (8,3)
Tabaquismo	75 (19,3)	36 (27,1)	26 (37,7)	9 (37,5)	5 (41,7)
Consumo de alcohol	27 (7)	17 (12,8)	9 (13)	2 (8,3)	1 (8,3)
Fine I-III	194 (49,7)	70 (52,2)	27 (39,1)	17 (70,8)	11 (91,7)
Fine IV-V	196 (50,3)	64 (47,8)	42 (60,9)	7 (29,2)	1 (8,3)
SIRS	267 (68,5)	96 (71,6)	53 (76,8)	13 (54,2)	7 (58,3)
Shock	41 (10,5)	17 (12,8)	8 (11,6)	5 (20,8)	1 (8,3)
Shock Grave	7 (2,7)	8 (8,2)	6 (11,5)	0 (0)	0 (0)
Disfunción Renal (Creat>1,4)	53 (13,7)	20 (14,9)	12 (17,6)	0 (0)	1 (8,3)
Hipoxemia	151 (42,1)	66 (52)	35 (52,2)	1 (4,3)	5 (45,5)
Ventilación Mecánica	14 (3,6)	11 (8,2)	11 (15,9)	1 (4,2)	0 (0)
Muerte	19 (4,9)	6 (4,5)	10 (14,5)	0 (0)	0 (0)

**Tabla 2.** Resultados de PCR, PCT y citocinas según la presencia de un agente etiológico o bacteriemia.

	Etiología			Bacteriemia		
	no (n=390)	sí (n=295)	P value	no (n=527)	sí (n=48)	P
<b>PCR, mg/dL</b>	13,7 (6,95-21,85)	18,1 (9,7-27,3)	<0,0001	16,1 (8,8-24,1)	23,3 (14,9-35,1)	0,002 <sup>a</sup>
<b>PCT, ng/mL</b>	0,37 (0,15-1,56)	0,86 (0,27-4,12)	<0,00001	0,51 (0,18-2,24)	4,54 (0,49-11,16)	<0,00001 <sup>b</sup>
<b>TNFα, pg/mL</b>	25 (15-41)	27 (15-48)	NS*	26 (15-45)	30,5 (18-67)	0,04 <sup>c</sup>
<b>IL-1, pg/mL</b>	15 (3-33)	16 (4-32)	NS	16 (4-33)	16,5 (3-33)	NS
<b>IL-6, pg/mL</b>	71 (25-175)	105 (42-300)	<0,0001	95 (34-235)	192 (79,5-568,5)	0,004 <sup>d</sup>
<b>IL-10, pg/mL</b>	5 (0-15)	6 (0-19)	NS	5 (0-17)	12 (1-38,5)	NS
<b>IL-8, pg/mL</b>	8 (2-17)	9 (3-22)	NS	10 (3-20)	5 (2-30,5)	NS

\*NS; no significativo

<sup>a</sup> Área bajo al curva (AUC) 0,7 (0,6-0,8); p<0,001

<sup>b</sup> AUC 0,7 (0,6-0,8); p<0,0001

<sup>c</sup> AUC 0,6 (0,5-0,7); p=0,03

<sup>d</sup> AUC 0,7 (0,6-0,7); p<0,001

**Tabla 3.** Resultados de PCR, PCT y citocinas según el agente etiológico

	PCR, mg/dL	PCT, ng/mL	TNF $\alpha$ , pg/mL	IL-1, pg/mL	IL-6, pg/mL	IL-10, pg/mL	IL-8, pg/mL
<b>Sin etiología</b> (n=390)	13,7 (6,95-21,9)	0,37 (0,15-1,56)	25 (15-41)	15 (3-33)	71 (25-175)	5 (0-15)	8 (2-17)
<b>Grampositivo</b>							
<i>S. pneumoniae</i> (n=118)	19,85 (10,3-28,4)	1,71 (0,48-7,37)	27 (16-47)	16 (4-30)	144 (38-305)	7 (0-21)	6 (2-19)
<i>S. aureus</i> (n=13)	16,4 (5,6-24,8)	1,37 (0,3-7,86)	40,5 (22-48)	22 (0-47,5)	125 (63-204,5)	7,5 (0-32,5)	10 (3,5-16,5)
<b>Gramnegativo</b>							
<i>L. pneumophila</i> (n=24)	24,9 (21,3-33,5)	0,71 (0,5-3,15)	49 (40-72)	19 (5-35)	202 (69-1548)	3 (0-12)	16 (11-35)
<i>. influenzae</i> (n=14)	12,5 (2,7-17,4)	0,36 (0,215-1,37)	19,5 (11-33,5)	17,5 (0-37)	63,5 (6-155)	7,5 (6-35,5)	5 (1-9)
<i>P. aeruginosa</i> (n=18)	10 (7,4-13,8)	0,44 (0,14-0,62)	23 (15-42)	16 (4-29)	105 (22-223)	6 (3-12)	12 (8-20)
Enterobacteria (n=13)	20,1 (12,6-31,5)	1,59 (0,56-8,99)	14,5 (11,5-68)	20 (8,5-41)	168,5 (58-339,5)	6 (0-25,5)	54,5 (13,5-79,5)
<b>Bacterias atípicas</b>							
<i>M. pneumoniae</i> (n=13)	13,9 (7,6-24,6)	0,34 (0,1-0,62)	27,5 (15-128)	23 (4-54)	77 (28-98)	4 (0-14)	17,5 (7-24)
<i>C. pneumoniae</i> (n=3)	19 (0,2-24,3)	0,23 (0,1-0,36)	36 (23-39)	31 (22-35)	26 (8-59)	17 (10-23)	1 (0-12)
<i>C. burnetii</i> (n=8)	9,45 (5,5-25,3)	0,13 (0,09-0,19)	22 (21-38)	17 (6,5-30,5)	41,5 (25-122,5)	2,5 (0,5-13)	17 (8,5-24)
<b>Virus</b>							
Influenzavirus (n=9)	15,4 (12-21,6)	0,36 (0,09-0,47)	11,5 (8-22)	10 (2-18)	129 (39-405)	24,5 (18-33)	7 (3-16)

**Tabla 4.** Biomarcadores y citocinas según agente etiológico y estado de sepsis.

Biomarcadores y Sepsis	Sin etiología	Grampositivos	Gramnegativos	Atípicas	Virus	p
<b>CRP</b>						
No sepsis	13.5 (6–20)	17.6 (5.1–30.2)	13.8 (9.8–23.7)	12.7 (7.6–19.1)	4.9 (0.7–12.9)	NS
Sepsis	12 (6.5–22.7)	20.3 (12.2–28.2)	18.5 (12.6–24.9)	13.8 (7.5–24.3)	12 (8.9–29.5)	< .05
Sepsis grave/shock	15.5 (8.4–23.4)	20 (11.1–28.1)	23.5 (10–32.8)	11.3 (4–33.6)	17.8 (14–21.6)	NS
<b>PCT</b>						
No sepsis	0.2 (0.1–0.6)	0.7 (0.2–4.5)	0.3 (0.1–1.1)	0.2 (0.1–0.3)	0.3 (0.2–0.4)	.004
Sepsis	0.3 (0.1–1.2)	1.9 (0.7–4.1)	0.6 (0.4–2.8)	0.2 (0.1–0.5)	0.1 (0.1–0.5)	< .0001
Sepsis grave/shock	0.8 (0.3–2.7)	2.4 (0.8–9.1)	0.7 (0.4–6)	0.2 (0.2–0.6)	1.2 (0.2–2.2)	.2
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>						
No sepsis	23 (13–41)	35 (18–48)	20 (11–58)	23 (21–35)	26.5 (18–35.5)	NS
Sepsis	24 (14–34.5)	29 (18–43)	37 (13–52)	26.5 (21–39)	8 (8–13)	NS
Sepsis grave/shock	29 (18–45)	26 (16–48)	37 (17–72)	40 (36–128)	18.5 (10–27)	NS
<b>IL-1</b>						
No sepsis	10 (3–27)	14 (3–34)	12 (4–46)	33 (5–50)	14 (9–18)	NS
Sepsis	17 (4–35)	6.5 (2–19)	22 (3–29)	15.5 (4–26)	2 (0–7)	NS
Sepsis grave/shock	17 (2–37)	18 (5–35)	17.5 (6–36)	22 (9–24)	15.5 (13–18)	NS
<b>IL- 6</b>						
No sepsis	66 (23–146)	97 (29–225)	71 (22–144)	27.5 (17–77)	54.5 (21–137.5)	NS
Sepsis	65.5 (24.5–165.5)	185 (92–380)	79 (22–324)	49.5 (39–79)	39 (30–1549)	.005
Sepsis grave/shock	93 (30–273)	150 (47–253)	197 (69–1.288)	166 (77–460)	235.5 (66–405)	NS
<b>IL-10</b>						
No sepsis	3 (0–9)	2 (0–16)	6 (0–9)	7.5 (1–14)	12 (1–28)	NS
Sepsis	5 (0–12)	2.5 (0–14)	4 (0–15)	1 (0–15)	18 (0–27)	NS
Sepsis grave/shock	8.5 (0–22)	13 (1–31)	6.5 (0–19)	9 (3–14)	29 (22–36)	NS
<b>IL- 8</b>						
No sepsis	10 (4–18)	10 (5–22)	16 (12–35)	16.5 (10–23)	2 (0–4)	.006
Sepsis	7 (2–15)	7 (3–18)	10 (4–34)	11 (5–19)	5 (3–16)	NS
Sepsis grave/shock	6 (2–19)	5 (2–16)	14 (5–61)	13 (1–27)	24 (9–39)	NS

**Tabla 5.** Compación de los principales grupos de patógenos y puntos de corte diagnósticos.

	Bacteria vs. Atípicas	Bacteria vs. Virus	Gramnegativo vs. Grampositivo	Gramnegativo vs. Atípicas	<i>Legionella</i> vs. <i>S. pneumoniae</i>
PCR	NS*	NS	NS	NS	24,9 vs 19,9 <sup>e</sup> (p=0,01)
PCT	1,12 vs 0,19 <sup>a</sup> (p<0,0001)	1,12 vs 0,2 <sup>c</sup> (p=0,003)	0,62 vs 1,67 (p=0,02)	0,62 vs 0,19 (p=0,002)	NS
TNFα	NS	29 vs 14 <sup>d</sup> (p=0,03)	NS	NS	49 vs 27 <sup>f</sup> (p=0,0002)
IL-6	144 vs 43 <sup>b</sup> (p=0,01)	NS	NS	116 vs 43 (p=0,04)	NS
IL-8	NS	NS	13 vs 6,5 (p=0,003)	NS	16 vs 6 <sup>g</sup> (p=0,003)

\*NS; no significativo

a; PCT ≤0,5 mg/dL como punto de corte para comparar Bacteria vs, Atípicas: S 81%, E 68%, VPP 22% and VPN 97%

b; IL-6 ≤100 pg/mL como punto de corte para comparar Bacteria vs, Atípicas: S 81%, E 56%, VPP 17% and VPN 96%

c; PCT ≤0,5mg/dL como punto de corte para comparar Bacteria vs, virus: S 89%, E 68%, VPP12% and VPN 99%,

d; TNFα ≤27 pg/mL como punto de corte para comparar Virus vs, Bacteria: S 78%, E 51%, VPP 7% and VPN 98%

e; PCR ≥22 mg/dL como punto de corte para comparar *L. pneumophila* vs. *S. pneumoniae*: S 70%, E 59%, VPP 27% and VPN 90%

f; TNFα ≥30 pg/mL como punto de corte para comparar *L. pneumophila* vs. *S. pneumoniae*: S 88%, E 57%, VPP 39% and VPN 94%

g; IL-8 ≥15 pg/mL como punto de corte para comparar *L. pneumophila* vs. *S. pneumoniae*: S 57%, E 69%, VPP 27% and VPN 89%

**Tabla 6.** Efecto del tratamiento antimicrobiano previo

	Tratamiento antimicrobiano previo					
	no			sí		
	Diagnóstico etiológico		p	Diagnóstico etiológico		p
no (n=256)	sí (n=196)	no (n=134)		sí (n=99)		
<b>PCR mg/dL</b>	13.5 (7-21.6)	19.1 (10-28.3)	<0.0001	15.3 (6.4-22,7)	17 (8.7-26)	NS
<b>PCT ng/mL</b>	0.41 (0.16-1.86)	1.11 (0.3-5.28)	<0.0001	0.32 (0.14-0.9)	0.54(0.2-2.28)	0.017
<b>TNFα pg/mL</b>	26 (16-40)	29 (15-49)	NS <sup>†</sup>	23 (15-44)	24 (14-44)	NS
<b>IL-1 pg/mL</b>	16 (3-34)	15 (4-30)	NS	13.5 (4-31)	19 (3-35)	NS
<b>IL-6 pg/mL</b>	81 (25-197)	122 (43-352)	<0.001	60 (24-149)	79 (29-235)	0.036
<b>IL-10 pg/mL</b>	6 (0-19)	8 (0-23)	NS	3 (0-9)	3 (0-13)	NS
<b>IL-8 pg/mL</b>	7 (2-16)	6.5 (2-21)	NS	10 (5-19)	12 (5-24)	NS

\*NS; no significativo

## **Estudio 2: Age-related risk factors for bacterial aetiology in community-acquired pneumonia.**

### **Pacientes**

De la cohorte de 4304 pacientes, 2807 (65.2%) eran hombres y 1497 (34.8%) eran mujeres. Las características de la población en relación con la edad (Tabla 1) mostraron que las enfermedades cardiovasculares, renales y neurológicas, y la diabetes melitus (DM) fueron más frecuentes en los pacientes ancianos junto con un PSI inicial más elevado. El tabaquismo y el abuso del alcohol fueron mayores entre los pacientes menores de 65 años. Los adultos mayores tuvieron una mayor proporción de hombres, pacientes institucionalizados, y mayores tasas de vacunación, pero se a este grupo se le realizaron menos procedimientos de diagnóstico.

### **Etiología**

Se encontró etiología bacteriana en 1522 pacientes (35,4%) (Tabla 2):

933 (21.7%) *S. pneumoniae*, 110 (2.6%) *L. pneumophila*, 50 (1.2%) *P. aeruginosa*, 42 (0.98%) *H. influenzae*, 41 (0.95%) *S. aureus*, 51 (1.2%) *M. pneumoniae*, 31 (0.7%) *Enterobacteriaceae*, 51 (1.2%) *C. burnetii*, 50 (1,2%) *C. pneumoniae*, 9 (0,2%) *C. psittaci* y 71 (1,6%) infecciones mixtas (66% de ellas eran combinaciones de *S. pneumoniae* más otro patógeno, siendo las bacterias atípicas los microorganismos más frecuentemente asociados).

Un mayor porcentaje de etiología desconocida y *P. aeruginosa* se encontró en los adultos mayores. Los adultos jóvenes tuvieron un mayor porcentaje de *C. burnetii* y *M. pneumoniae*, mientras que *L. pneumophila* fue más frecuente en

adultos. Los pacientes con etiología desconocida fueron sometidos a menos pruebas de diagnóstico (Tabla 3).

### **Etiología por comorbilidades.**

#### **Análisis univariado**

Se compararon los porcentajes de microorganismos causales entre pacientes con o sin la comorbilidad en cada grupo de edad mediante las pruebas de  $\chi^2$  y Test de Fisher, mostrando que la distribución de los agentes etiológicos variaba según el grupo de edad y las comorbilidades (Tabla 4):

- *S. pneumoniae* fue significativamente mayor en adultos jóvenes con DM.
- *S. aureus* fue mayor entre adultos y adultos jóvenes con DM.
- *H. influenzae* fue mayor en adultos con EPOC y en adultos mayores con enfermedad hepática.
- *P. aeruginosa* fue mayor en personas mayores con EPOC
- *Enterobacteriaceae* fue mayor en aquellos con enfermedad hepática.

#### **Análisis de regresión logística multivariante**

Identificamos factores de riesgo según el grupo de edad y sus comorbilidades (Tabla 5):

- Entre los adultos jóvenes, la enfermedad renal fue un factor de riesgo para *M. pneumoniae* y la DM fue un factor de riesgo para *S. aureus*.
- En adultos, la EPOC fue un factor de riesgo para *H. influenzae*, la DM fue un factor de riesgo para cocos Gram positivo (*S. pneumoniae* y *S. aureus*), y la residencia en hogares de ancianos fue un factor de riesgo para *S. aureus* e infecciones mixtas.

- En las personas mayores, la EPOC fue un factor de riesgo para *S. aureus* y *P. aeruginosa*, los trastornos neurológicos fueron un factor de riesgo para *S. aureus*, y la enfermedad hepática fue un factor de riesgo para *H. influenzae* y *Enterobacteriaceae*.

### **Tabaquismo y abuso del alcohol**

Fumar fue un factor de riesgo independiente para *L. pneumophila* en todos los grupos de edad, para *C. burnetii* en adultos jóvenes y para infecciones mixtas en adultos. El abuso del alcohol fue un factor de riesgo para *S. pneumoniae* en adultos jóvenes. Además, el abuso del alcohol fue un factor de riesgo para *C. burnetii* e infecciones mixtas en personas mayores.

**Tabla 1.** Características demográficas, comorbilidades, PSI inicial y pruebas diagnósticas por grupos de edad, n (%).

	<45	45-64	>=65	p
<b>Sexo</b>				
hombre	370 (58,1)	616 (67,2)	1819 (66,2)	<b>&lt; 0,001</b>
Mujer	267 (41,9)	300 (32,8)	928 (33,8)	
<b>Tabaco</b>				
no	285 (44,7)	268 (29,3)	1262 (45,9)	<b>&lt; 0,001</b>
sí	285 (44,7)	378 (41,3)	248 (9,0)	
ex	67 (10,5)	270 (29,5)	1237 (45,0)	
<b>Alcohol</b>				
no	541 (84,9)	660 (72,1)	2397 (87,3)	<b>&lt; 0,001</b>
sí	91 (14,3)	194 (21,2)	182 (6,6)	<b>&lt; 0,001</b>
ex	5 (0,8)	62 (6,8)	168 (6,1)	<b>&lt; 0,001</b>
<b>Residencia</b>				
	8 (1,3)	17 (1,9)	208 (7,6)	<b>&lt; 0,001</b>
<b>Vacunación</b>				
<i>S. pneumoniae</i>	8 (1,3)	42 (5,1)	373 (16,8)	<b>&lt; 0,001</b>
Influenza virus	43 (7,1)	189 (23,2)	1615 (71,5)	<b>&lt; 0,001</b>
<b>Comorbilidades</b>				
Diabetes mellitus	19 (3,0)	183 (20,0)	729 (26,6)	<b>&lt; 0,001</b>
Enf. hepática	20 (3,1)	61 (6,7)	84 (3,1)	<b>&lt; 0,001</b>
Enf. cardiovascular	9 (1,4)	62 (6,8)	564 (20,5)	<b>&lt; 0,001</b>
Enf. Renal	8 (1,3)	37 (4,0)	250 (9,1)	<b>&lt; 0,001</b>
Enf. Neurológica	18 (2,8)	39 (4,3)	440 (16,0)	<b>&lt; 0,001</b>
EPOC	11 (1,7)	162 (17,7)	863 (31,4)	<b>&lt; 0,001</b>
<b>PSI</b>				
I-III	606 (95,1)	687 (75,0)	929 (33,8)	<b>&lt; 0,001</b>
IV-V	31 (4,9)	229 (25,0)	1818 (66,2)	
<b>Pruebas diagnósticas</b>				
Cultivo de esputo	260 (40,8)	438 (47,8)	1112 (40,5)	<b>&lt; 0,001</b>
Hemocultivo	437 (68,6)	620 (67,7)	1611 (58,6)	<b>&lt; 0,001</b>
Cultivo de líquido pleural	90 (14,1)	89 (9,7)	101 (3,7)	<b>&lt; 0,001</b>
Cultivo de BAS	49 (7,7)	99 (10,8)	138 (5,0)	<b>&lt; 0,001</b>
Cultivo de BAL	25 (3,9)	49 (5,3)	39 (1,4)	<b>&lt; 0,001</b>
Cultivo de cepillo bronquial	18 (2,8)	14 (1,5)	28 (1,0)	<b>0,002</b>
PAAF	3 (0,5)	9 (1,0)	11 (0,4)	0,1
Serología	342 (53,7)	449 (49,0)	1185 (43,1)	<b>&lt; 0,001</b>
<i>S. pneumoniae</i> ag urinario	589 (92,5)	849 (92,7)	2380 (86,6)	<b>&lt; 0,001</b>
<i>L. pneumophila</i> ag urinario	588 (92,3)	851 (92,9)	2361 (85,9)	<b>&lt; 0,001</b>

**Tabla 2.** Etiología por grupos de edad n(%)

	<b>&lt;45</b>	<b>45-64</b>	<b>&gt;=65</b>	<b>p</b>
<b>Desconocida</b>	355 (55,7)	553 (60,4)	1870 (68,1)	<b>&lt;0,001</b>
<b>Grampositivos</b>				
<i>S. pneumoniae</i>	153 (24,0)	212 (23,1)	568 (20,7)	0,09
<i>S. aureus</i>	3 (0,5)	14 (1,5)	24 (0,9)	0,08
<b>Gramnegativos</b>				
<i>P. aeruginosa</i>	2 (0,3)	6 (0,7)	42 (1,5)	<b>0,01</b>
<i>H. influenzae</i>	4 (0,6)	12 (1,3)	26 (0,9)	0,4
<i>Enterobacteriaceae</i>	3 (0,5)	3 (0,3)	25 (0,9)	0,1
<b>Bacterias atípicas</b>				
<i>L. pneumophila</i>	17 (2,7)	51 (5,6)	42 (1,5)	<b>&lt;0,001</b>
<i>C. pneumoniae</i>	10 (1,6)	7 (0,8)	33 (1,2)	0,3
<i>C. burnetii</i>	22 (3,5)	14 (1,5)	15 (0,5)	<b>&lt;0,001</b>
<i>M. pneumoniae</i>	35 (5,5)	7 (0,8)	9 (0,3)	<b>&lt;0,001</b>
<i>C. psittaci</i>	2 (0,3)	2 (0,2)	5 (0,2)	0,8
<b>Infection mixta</b>	13 (2,0)	18 (2,0)	40 (1,5)	0,4

**Tabla 3.** Pruebas diagnósticas realizadas por grupo de edad

	<45			45-64			>=65		
	Etiología conocida			Etiología conocida			Etiología conocida		
	sí	no	p	sí	no	p	sí	no	p
<b>Cultivo de esputo</b>	126 (44,7)	134 (37,7)	0,06	195 (53,7)	243 (43,9)	<b>0,004</b>	434 (49,5)	678 (36,3)	<b>&lt; 0,001</b>
<b>Hemocultivo</b>	206 (73,0)	231 (65,1)	<b>0,03</b>	278 (76,6)	342 (61,8)	<b>&lt; 0,001</b>	591 (67,4)	1020 (54,5)	<b>&lt; 0,001</b>
<b>Cultivo de líquido pleural</b>	49 (17,4)	41 (11,5)	<b>0,04</b>	40 (11,0)	49 (8,9)	0,3	45 (5,1)	56 (3,0)	<b>0,006</b>
<b>Cultivo de BAS</b>	22 (7,8)	27 (7,6)	0,9	48 (13,2)	51 (9,2)	0,06	56 (6,4)	82 (4,4)	<b>0,03</b>
<b>Cultivo de BAL</b>	7 (2,5)	18 (5,1)	0,09	21 (5,8)	28 (5,1)	0,6	19 (2,2)	20 (1,1)	<b>0,02</b>
<b>Cultivo de cepillo bronquial</b>	10 (3,5)	8 (2,3)	0,3	5 (1,4)	9 (1,6)	0,8	16 (1,8)	12 (0,6)	<b>0,004</b>
<b>PAAF</b>	0 (0,0)	3 (0,8)	0,3	2 (0,6)	7 (1,3)	0,5	6 (0,7)	5 (0,3)	0,1
<b>Serología</b>	178 (63,1)	164 (46,2)	<b>&lt; 0,001</b>	214 (59,0)	235 (42,5)	<b>&lt; 0,001</b>	443 (50,5)	742 (39,7)	<b>&lt; 0,001</b>
<b><i>S. pneumoniae</i> ag urinario</b>	273 (96,8)	316 (89,0)	<b>&lt; 0,001</b>	346 (95,3)	503 (91,0)	<b>0,01</b>	836 (95,3)	1544 (82,6)	<b>&lt; 0,001</b>
<b><i>L. pneumophila</i> ag urinario</b>	273 (96,8)	315 (88,7)	<b>&lt; 0,001</b>	348 (95,9)	503 (91,0)	<b>0,005</b>	832 (94,9)	1529 (81,8)	<b>&lt; 0,001</b>

**Tabla 4.** Etiología (%) en función de la edad y las comorbilidades

	<u>Diabetes mellitus</u>			<u>Enf. Hepática</u>			<u>Enf. Cardiovascular</u>			<u>Enf. Renal</u>			<u>Enf. Neurológica</u>			<u>EPOC</u>		
	<45	45-64	>=65	<45	45-64	>=65	<45	45-64	>=65	<45	45-64	>=65	<45	45-64	>=65	<45	45-64	>=65
<b>Desconocida</b>	42	53,0*	70,5	60	59	54,8*	56	67,7	72,2 †	38	64,9	72,8	67	66,7	69,1	-	61,7	66,9
<b>Grampositivos</b>																		
<i>S. pneumoniae</i>	42	29,5 †	18,9	25	29,5	26,2	33	19,4	16,1*	25	13,5	16,4	22	20,5	19,1	-	25,9	19,8
<i>S. aureus</i>	5,3	3,3 †	1	-	1,6	2,4	-	3,2	0,9	-	-	1,2	-	2,6	1,6	-	0,6	1,5 †
<b>Gramnegativos</b>																		
<i>P. aeruginosa</i>	-	0,5	1,4	-	-	1,2	-	-	1,8	-	2,7	1,2	-	-	1,4	-	1,2	2,7 †
<i>H. influenzae</i>	-	1,1	1	-	1,6	4,8 †	-	1,6	1,2	-	2,7	0,4	-	2,6	0,7	-	3,1 †	1
<i>Enterobacteriaceae</i>	-	0,5	1,2	-	-	3,6 †	-	1,6	0,4	-	-	0,4	-	-	1,1	-	-	0,9
<b>Bacterias atípicas</b>																		
<i>L. pneumophila</i>	-	4,4	1,8	-	3,3	2,4	-	1,6	1,4	13	8,1	2,4	-	-	1,4	-	3,7	1,2
<i>C. pneumoniae</i>	-	-	1,1	-	-	1,2	-	-	0,5	-	-	1,2	-	-	1,1	-	0,6	0,9
<i>C. burnetii</i>	-	2,7	0,5	-	1,6	-	-	-	0,4	-	-	-	-	-	0,5	-	-	0,3
<i>M. pneumoniae</i>	-	1,1	0,1	5	-	-	-	-	0,2	25	-	-	5,6	2,6	0,2	-	0,6	0,1
<i>C. psittaci</i>	-	-	0,1	-	-	-	-	-	0,5	-	-	0,4	-	2,6	0,2	-	-	0,1
<b>Infección mixta</b>	-	2,2	0,8	5	3,3	1,2	-	1,6	2,1	-	5,4	2	-	-	1,6	-	1,2	1,9

\*Significativamente inferior o †superior que en pacientes sin comorbilidad (p < 0.05)

**Tabla 5.** Modelos de regresión múltiple para predecir el microorganismo causal en función de las comorbilidades y grupo de edad.

	<45		45-65		>65	
	OR (95% IC)	p	OR (95% IC)	p	OR (95% IC)	p
<b>Grampositivos</b>						
<b><i>S. pneumoniae</i></b>						
Alcohol	1,69 (1,05-2,74)	0,03				
Diabetes mellitus			1,52 (1,06-2,19)	0,02		
Enf. Cardiovascular					0,69 (0,54-0,88)	0,003
<b><i>S. aureus</i></b>						
Diabetes mellitus	17,11 (1,48-197,45)	0,02	3,04 (1,03-8,97)	0,04		
Residencia			9,69 (1,95-48,20)	0,01		
Enf. Neurológica					2,43 (0,99-5,94)	0,05
EPOC					2,80 (1,24-6,30)	0,01
<b>Gramnegativos</b>						
<b><i>P. aeruginosa</i></b>						
EPOC					2,69 (1,46-4,97)	0,002
<b><i>H. influenzae</i></b>						
EPOC			3,39 (1,06-10,83)	0,04		
Enf. Hepática					5,99 (2,02-17,78)	0,001
<b><i>Enterobacteriaceae</i></b>						
Enf. Hepática					4,44 (1,30-15,12)	0,02
<b>Bacterias atípicas</b>						
<b><i>L. pneumophila</i></b>						
Tabaco	6,01 (1,71-21,12)	0,01	2,31 (1,30-4,12)	0	5,29 (2,75-10,19)	<0,0001
<b><i>M. pneumoniae</i></b>						
Enf. Hepática	6,02 (1,17-30,98)	0,03				
<b><i>C. burnetii</i></b>						
Tabaco	2,74 (1,10-6,81)	0,03				
Alcohol					5,21 (1,64-16,51)	0,005
<b>Infección mixta</b>						
Tabaco			4,09 (1,43-11,75)	0,01		
Residencia			9,31 (1,86-46,55)	0,01		
Alcohol					2,53 (1,05-6,11)	0,04

### **Estudio 3: Influence of environmental conditions and pollution on the incidence of *Streptococcus pneumoniae* infections.**

Se incluyeron 619 NAC neumocócicas (58.8% hombres, 41.2% mujeres) de las cuales 117 (18.9%) fueron invasivas (59.2% hombres, 40.8% mujeres). La edad presentó una distribución bimodal con dos máximos locales a los 0 años y 65 años. En pacientes adultos, las comorbilidades fueron enfermedad pulmonar obstructiva crónica (33,9%), enfermedad cardiovascular crónica (22,0%), insuficiencia renal crónica (11,7%), diabetes melitus (21,8%), cirrosis (2,3%) y enfermedad neurológica crónica (25,5%). Un 9,6% de los pacientes fueron fumadores y un 2,5% consumidores de alcohol.

Se observó un patrón estacional con una mayor incidencia de enfermedad en invierno, cuando las temperaturas son menores y se consume más combustible fósil, mientras que la menor incidencia fue en verano (prueba ANOVA,  $p < 0,001$ ).

Este estudio encontró que los niveles de  $SO_2$ ,  $NO_x$ ,  $NO_2$ ,  $NO$  y  $CO$  tenían una relación positiva significativa con el número de NAC neumocócicas en el análisis univariado, mientras que la temperatura, la radiación solar, la humedad relativa,  $PM_{2.5}$ ,  $PM_1$ ,  $PM_{10}$  y  $O_3$  mostraron una relación negativa. En cuanto a las infecciones neumocócicas invasivas, sólo los niveles de  $SO_2$ , el  $NO_x$  y el  $NO$  mostraron una relación positiva significativa, mientras que la temperatura y la radiación solar presentaron una relación negativa (Tabla 1).

El modelo multivariado que mejor se ajustó a los datos para la infección neumocócica incluyó la temperatura,  $SO_2$ ,  $NO$  y la humedad relativa, y fue capaz de explicar el 61% de la variación observada ( $R^2=0.61$ ; estadístico F p

<0.001). Para la infección invasiva, sólo se incluyeron la temperatura y el SO<sub>2</sub> (R<sup>2</sup>=0.17; F estadística p <0.001) (Tabla 1). Vale la pena mencionar que aunque el modelo para la infección invasiva fue significativo, el SO<sub>2</sub> tuvo un intervalo de confianza del 95% que apenas sobrepasó el cero, probablemente debido a la escasez de datos.

**Tabla 1.** Modelos matemáticos

Univariado	Infección neumocócica		Infección neumocócica invasiva	
	Coefficiente (95% CI)	p	Coefficiente (95% CI)	p
SO <sub>2</sub>	1.411 (0.940-1.881)	<0.0001	0.243 (0.088-0.398)	0.002
CO	9.303 (0.956-17.651)	0.03		
O <sub>3</sub>	-0.080 (-0.115--0.044)	<0.0001		
NO <sub>x</sub>	0.103 (0.078-0.127)	<0.0001	0.009 (0.0003-0.018)	0.04
NO	0.261 (0.198-0.323)	<0.0001	0.025 (0.002-0.048)	0.04
NO <sub>2</sub>	0.208 (0.152-0.265)	<0.0001		
PM1	-0.146 (-0.247--0.045)	0.005		
PM2.5	-0.122 (-0.200--0.044)	0.002		
PM10	-0.121 (-0.201--0.040)	0.004		
humedad	-0.119 (-0.189--0.050)	0.001		
T <sup>a</sup>	-0.456 (-0.546--0.367)	<0.0001	-0.073 (-0.108--0.038)	<0.0001
Radiación	-0.029 (-0.039--0.019)	<0.0001	-0.004 (-0.008--0.001)	0.008
<b>Multivariado</b>				
SO <sub>2</sub>	0.732 (0.342-1.121)	0.0003	0.158 (-0.005-0.322)	0.058
T <sup>a</sup>	-0.196 (-0.326--0.065)	0.003	-0.052 (-0.090--0.014)	0.008
humedad	-0.054 (-0.105--0.002)	0.04		
NO	0.139 (0.065-0.212)	0.0003		
Constante	9.419 (5.401-13.437)	<0.0001	1.726 (0.738-2.713)	0.0008

# Discusión

## **Estudio 1: Cytokine activation patterns and biomarkers are influenced by microorganisms in community-acquired pneumonia.**

El estudio de los perfiles inflamatorios en NAC puede aportarnos un mejor conocimiento de las interacciones entre paciente y microorganismo, y puede ser útil para el diagnóstico etiológico. La capacidad diagnóstica en NAC de PCT, PCR y en menor grado las citocinas fueron estudiadas en este trabajo.<sup>3,7,10</sup> Interesantemente, los biomarcadores junto con IL-6 fueron significativamente más bajos cuando no se encontró la causa etiológica de la NAC, incluso considerando el estado de sepsis; esto podría reflejar una carga menor de patógenos o una menor virulencia. Por otro lado, los biomarcadores y la IL-6 estaban significativamente más elevados, indicando una mayor diseminación de la infección,<sup>11</sup> lo que podría ser útil para detectar antes pacientes con mayor riesgo de infección grave.<sup>7,12</sup> Müller *et al*<sup>12</sup> encontraron que una PCT >0.25 ng/mL permitió una reducción del 37% en la toma de hemocultivos, con una alta especificidad. Nosotros elegimos un punto de corte ligeramente más alto (0.36 ng/mL) con un alto VPN porque un valor más bajo podría incluir NAC por bacterias atípicas y NAC sin agente etiológico detectado.

El papel de las citocinas para predecir bacteriemia es menos conocido. Nosotros encontramos que una IL-6 mayor de 150 pg/mL tenía un excelente VPN (96%). A pesar del interés en conocer la influencia de los microorganismos para desencadenar diferentes patrones inflamatorios, existen pocas

publicaciones sobre el tema. Masiá *et al*<sup>13</sup> encontraron menores niveles de PCT y PCR en bacterias atípicas comparadas con otras bacterias, aunque ninguno de ellos fue útil para predecir el agente etiológico. Hedlum y Hansson también encontraron niveles más bajos de PCT en bacterias atípicas y virus, pero ninguna diferencia en PCR. Nuestros datos confirman que una PCT >0.5 tiene una alta sensibilidad y un alto VPN para las NAC víricas o por bacterias atípicas. Kruger *et al*<sup>14</sup> usaron un punto de corte más bajo (0.1) para diferenciar *S. pneumoniae* de NAC víricas o por bacterias atípicas y obtuvieron un OR alto (8.3). Sin embargo, el considerable solapamiento entre los diversos microorganismo debería hacernos actuar con cautela y evitar prescribir una insuficiente cantidad de antibióticos.

El uso de PCR y PCT para distinguir la causa bacteriana tiene limitaciones; además, Méndez *et al*<sup>15</sup> demostraron que dichos biomarcadores presentan una evolución diferente, por lo que el tiempo desde el inicio de los síntomas es importante para interpretar correctamente el estado inflamatorio del paciente. García-Vázquez *et al*<sup>7</sup> encontraron que la PCR (0.25 mg/L) puede ser útil para diagnosticar *L. pneumophila* con un alto VPN (94%). Nosotros encontramos que niveles elevados de TNF- $\alpha$  e IL-6 en *L. pneumophila* tenían un alto VPN respecto a *S. pneumoniae*.

PCT e IL-8 mostraron diferentes patrones entre bacterias: niveles elevados de IL-8 y bajos de PCT en bacterias Gram negativo frente a Gram positivo. Sin embargo, la relevancia clínica de estos hallazgos debe ser confirmada y es posible que, con fines diagnósticos, se necesiten varios marcadores.<sup>16</sup>

El uso previo de antibióticos redujo los niveles de PCT e interleucinas, principalmente IL-6 e IL-10, sugiriendo que la actividad inflamatoria estaba siendo atenuada.<sup>10,17</sup> Consideramos por ello, que el uso de PCT como guía para el tratamiento antimicrobiano requiere extrema precaución en pacientes con toma previa de antibióticos, ya que se podría subestimar la etiología bacteriana.<sup>8,9</sup> Además, en estos pacientes el VPN de la PCT parece insuficiente para descartar infección bacteriana.

Por otro lado, IL-8 estaba elevada, tal y como se ha demostrado en experimentos *in vitro*,<sup>18</sup> probablemente por una estimulación en la secreción de citocinas secundaria a la destrucción de la pared celular bacteriana. De hecho, los niveles de IL-8 estaban elevados en los pacientes que habían tomado  $\beta$ -lactámicos antes de su ingreso (12 vs 8.5, P=0.06).

Nuestros hallazgos ponen de manifiesto las diferencias en la activación de las citocinas inflamatorias, tal y como se ve en el modelo de distancias euclídeas. El escenario con menor inflamación era en el que no se encontró un agente etiológico, mientras que el que tenía mayor elevación de marcadores era el de las NAC por *L. pneumophila*, *S. pneumoniae* y enterobacterias. Estas diferencias en el perfil inflamatorio se deben probablemente a variaciones en los factores de virulencia y al reconocimiento de moléculas específicas que activan diferentes vías inflamatorias adaptativas e innatas, como los receptores Toll-like (RTL) 9 en el caso de *L. pneumophila*, RTL-4 en el caso de las bacterias Gram negativo y RTL-2 en las Gram positivo.<sup>19-21</sup> Las enterobacterias presentaron una elevación de IL-8,<sup>22</sup> tal y como ha sido descrito en infecciones urinarias.<sup>23</sup>

Sorprendentemente, *P. aeruginosa* presentó un patrón cercano al de la NAC sin agente etiológico. Este microorganismo colonizador, que se asocia a pacientes ancianos o con patologías graves, podría comportarse como un oportunista en función de la situación del enfermo, pero esta inflamación contenida también podría deberse a que también se asoció a pacientes que tomaban corticoides inhalados y EPOC, o con menor respuesta por su patología concomitante.

Los virus de la gripe se asociaron con una elevación de IL-10<sup>24</sup> y un TNF- $\alpha$  bajo. Este patrón de respuesta perjudica al paciente tal y como se ha demostrado en modelos experimentales en animales.<sup>25</sup> De hecho, pese a que IL-10 activa a los linfocitos NK e incrementa la cantidad de antígeno disponible para estimular al sistema inmune,<sup>26</sup> se ha demostrado que un aumento de IL-6 y TNF- $\alpha$  protegen frente a la neumonía por virus de la gripe<sup>27</sup> mediante una activación más robusta del sistema inmune innato de la mucosa pulmonar y de la activación vigorosa de genes relacionados con la producción de interferón tipos I y II que provocarán un mayor aclaramiento y destrucción del virus.

Nuestros hallazgos sugieren que una correcta interpretación de la cascada de activación de las citocinas debería tener en consideración no sólo el estado de sepsis y las características del paciente, sino también el agente etiológico, la bacteriemia y la toma previa de antimicrobianos. Estudios diseñados a modular la respuesta de las citocinas en la NAC deberían considerar el patrón específico producido por cada microorganismo. Los fallos observados en estudios anticitocina previos podrían estar justificados por las diferencias que hemos observado en nuestro estudio. Este último punto era importante para entender cómo se activan las cascadas inflamatorias y cómo detenerlas, y se

ha convertido en un tema de vital importancia en el tratamiento de la COVID-19.

## **Estudio 2: Age-related risk factors for bacterial aetiology in community-acquired pneumonia.**

Las comorbilidades y los hábitos tóxicos tuvieron influencia sobre la etiología de la NAC en función de la edad.

Tal y como se ha descrito en múltiples estudios, *S. pneumoniae* fue el patógeno más frecuentemente identificado independientemente de la edad o de las comorbilidades, mientras que *P. aeruginosa* y las enterobacterias fueron aislados en ancianos principalmente, y las bacterias atípicas se asociaron a NAC en pacientes más jóvenes.<sup>12,13</sup> Sin embargo, en nuestro estudio la edad y las comorbilidades modularon el riesgo para agentes etiológicos específicos. Evaluamos el efecto independiente de cada comorbilidad y hábito tóxico usando un estudio multivariable, considerando que un paciente puede presentar varios factores de riesgo al mismo tiempo.

Como era de esperar, los pacientes ancianos tuvieron mayor número de comorbilidades, haciendo a esta población más vulnerable a la NAC, y la distribución de agentes etiológicos fue consistente con estudios previos sobre NAC en España.<sup>12-16</sup> En estos pacientes se realizaron menos pruebas diagnósticas, bien por el empleo de un diagnóstico microbiológico más conservador, bien por presentar mayores dificultades a la hora de obtener muestras; esto justificaría que en este grupo existiera un menor porcentaje de diagnósticos etiológicos.

Sin embargo, los pacientes ancianos presentaron un mayor número de NAC por bacterias Gram negativo. La EPOC se asoció con mayor riesgo de *P. aeruginosa* y *S. aureus*, en relación con una mayor progresión de su

enfermedad y mayor deterioro funcional.<sup>17,18</sup> Cillonioz *et al* publicaron un estudio en el que estos microorganismos se aislaban casi exclusivamente en pacientes con comorbilidades.<sup>6</sup> Nuestro estudio aporta información adicional, *S. aureus* fue también más frecuente en pacientes con patología crónica neurológica, y la patología hepática se asoció a mayor riesgo de NAC por *H. influenzae* y enterobacterias, probablemente por el déficit inmunológico sistémico asociado.<sup>4,19</sup>

En adultos, DM presentó mayor riesgo de infección por cocos Gram positivo (*S. aureus* y *S. pneumoniae*). Estudios previos han detectado una mayor colonización de la vía respiratoria alta por *S. aureus*, así como una menor efectividad del sistema inmune en pacientes con esta patología sin tener en cuenta la edad.<sup>20,21</sup> La EPOC se asoció con un mayor riesgo de NAC por *H. influenzae*, un patógeno frecuente de la vía respiratoria baja de estos pacientes incluso en las fases estables, donde induce una respuesta inflamatoria continua.<sup>22,23</sup>

En adultos jóvenes, la enfermedad renal se relacionó con *M. pneumoniae*, un patógeno asociado con glomerulonefritis en niños.<sup>24</sup> Notablemente, las comorbilidades en pacientes jóvenes no fueron factores de riesgo independientes para NAC por bacterias Gram negativo como ocurre en los ancianos, posiblemente por estar estas patologías crónicas en un menor grado de evolución o por una mejor respuesta inmune en los jóvenes.

Encontramos la ya conocida asociación entre el tabaco y *L. pneumophila* en todos los grupos de edad,<sup>7</sup> aunque su efecto era mayor en los grupos de jóvenes y ancianos. Interesantemente, también se observó una asociación

entre tabaco y *C. burnetti* en jóvenes del norte de España,<sup>25</sup> similar a lo descrito en dos estudios epidemiológicos en el Reino Unido y los Países Bajos en jóvenes fumadores hospitalizados por NAC.<sup>26-28</sup> Ambos microorganismos pertenecen al orden Legionellales, están relacionados filogenéticamente y presentan ciclos infectivos intramacrofágicos similares. El mal funcionamiento de la actividad macrofágica en fumadores podría justificar estas asociaciones.<sup>29,30</sup>

El consumo de alcohol fue un factor de riesgo independiente de NAC por *S. pneumoniae* en jóvenes y de NAC mixtas y por *C. burnetti* en ancianos. El alcohol altera las respuestas inmunológicas innata y adquirida y altera los procesos de fagocitosis, haciendo a estos pacientes más susceptibles a la infección.<sup>31-33</sup>

Finalmente, se encontró una asociación negativa inexplicable entre *S. pneumoniae* y patología crónica cardiovascular, similar a la descrita por Jover *et al* entre insuficiencia cardiaca y bacteriemia por *S. pneumoniae*.<sup>34</sup>

### **Estudio 3: Influence of environmental conditions and pollution on the incidence of *Streptococcus pneumoniae* infections.**

El análisis univariado encontró múltiples factores relacionados con las NAC por *S. pneumoniae* y, tras realizar, un análisis multivariable se construyó un modelo robusto con tan sólo cuatro variables. Esta reducción se explica fácilmente por las interacciones entre los distintos gases y actores atmosféricos. El análisis univariado que hicieron Kim *et al*<sup>1</sup> encontró asociación de las NAC por *S. pneumoniae* con SO<sub>2</sub> y O<sub>3</sub>, pero en este estudio, se uso SO<sub>2</sub> como representante de otros gases de polución ambiental, mientras que en nuestro caso, se estudio cada gas individualmente.

En nuestro estudio, los gases derivados de combustibles fósiles incrementaron la incidencia de NAC por *S. pneumoniae*. Este hecho podría ser explicado en base al daño tisular que estos químicos ejercen sobre el epitelio respiratorio y al efecto deletéreo sobre la función ciliar.<sup>3-6</sup>

Sorprendentemente, nuestros datos sugerían que las partículas en suspensión ejercían un efecto protector frente a *S. pneumoniae*. Un estudio reciente ha vinculado estas partículas con un aumento de ingresos por neumonía en personas ancianas y con insuficiencia cardíaca, aunque no los relacionan con ninguna etiología concreta.<sup>7</sup> Zhou *et al*<sup>8</sup> han publicado un artículo en el que argumentan que las partículas de 2.5 micras de diámetro favorecen la adhesión de *S. pneumoniae* a los macrófagos alveolares, pero inhiben su fagocitosis, posiblemente imposibilitando el establecimiento de una infección. En cualquier caso, este tema debe ser estudiado en mayor profundidad.

De acuerdo con otros estudios,<sup>1,9,10</sup> la radiación solar, el aumento de la temperatura y de la humedad reducen el número de NAC por *S. pneumoniae*. El frío tiene un efecto inmunomodulador sobre la mucosa respiratoria y sobre la composición de la microbiota; tal y como ha sido descrito por Bogaert *et al*<sup>11</sup> que descubrieron alteraciones estacionales en la nasofaringe de niños, con una microbiota menos equilibrada en otoño e invierno. Sin embargo, la enfermedad neumocócica no aumenta necesariamente en regiones más frías y la densidad de población también puede jugar un papel importante.<sup>12</sup> Igualmente, el descenso de la humedad puede afectar a la composición del moco, rico en agua, y alterar su composición y actividad protectora. En consecuencia, el estrés provocado por el frío y por el descenso de la humedad favorecería la infección.

Por último, la exposición crónica a distintos contaminantes atmosféricos así como las interacciones entre ellos deben ser más estudiados. Más allá del daño local e inmediato, De Jong *et al*<sup>13</sup> han encontrado una asociación entre la exposición crónica al aire contaminado y el desarrollo de patrones de ventilación restrictivos que favorecen la infección pulmonar. En este contexto, O<sub>3</sub> ilustra perfectamente la interacción entre las condiciones atmosféricas y la polución. Pese a que el ozono tiene un reconocido efecto negativo sobre el tracto respiratorio, en nuestro estudio parecía actuar como un protector. Una posible explicación es que el ozono se produce por la radiación solar, alcanzando su máxima concentración en primavera y verano; por otro lado, O<sub>3</sub> y NO<sub>x</sub> están inversamente relacionados.<sup>14</sup> Por lo tanto, los mayores niveles de ozono se alcanzan cuando existen niveles altos de un protector (radiación solar) y niveles bajos de gases tóxicos (NO<sub>x</sub>). Los subanálisis realizados en

nuestros datos demostraron que los niveles atmosféricos de  $O_3$  dependían, efectivamente, de los niveles de radiación solar y  $NO_x$ . Por lo tanto, pese a que el  $O_3$  es tóxico y tiene un efecto deletéreo sobre el parénquima respiratorio, su medición a nivel atmosférico no es válida para demostrar su presencia ya que se ve encubierta por otros factores. Esto hace que sean necesarias mediciones más locales y puntuales para demostrar su presencia en niveles elevados.

# Bibliografía

## Estudio 1: Cytokine activation patterns and biomarkers are influenced by microorganisms in community-acquired pneumonia.

1. Deng JC, Standiford TJ. The systemic response to lung infection. *Clin Chest Med.* 2005;26(1):1-9.
2. Bals R , Hiemstra PS. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur Respir J.* 2004;23(2):327-333.
3. Hedlund J , Hansson LO. Procalcitonin and C-reactive protein levels in community-acquired pneumonia: correlation with etiology and prognosis. *Infection.* 2000;28(2):68-73.
4. Menéndez R, Martínez R, Reyes S, et al. Biomarkers improve mortality prediction by prognostic scales in communityacquired pneumonia. *Thorax.* 2009;64(7):587-591.
5. Woodhead M. The European vision of community-acquired pneumonia. *Semin Respir Crit Care Med.* 2009; 30( 2):136- 145.
6. Kellum JA , Kong L , Fink MP , et al; GenIMS Investigators. Understanding the inflammatory cytokine response in pneumonia and sepsis: results of the Genetic and Inflammatory Markers of Sepsis (GenIMS) Study. *Arch Intern Med.* 2007 ;167(15):1655-1663.
7. García Vázquez E , Martínez JA , Mensa J , et al. C-reactive protein levels in community-acquired pneumonia. *Eur Respir J.* 2003;21(4):702-705.

8. Christ-Crain M , Jaccard-Stolz D , Bingisser R , et al. Effect of procalcitonin-guided treatment on antibiotic use and outcome in lower respiratory tract infections: cluster-randomised, singleblinded intervention trial. *Lancet*. 2004;363(9409):600-607.
9. Christ-Crain M , Stolz D , Bingisser R , et al. Procalcitonin guidance of antibiotic therapy in community-acquired pneumonia: a randomized trial. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174(1):84-93.
10. Bruns AH, Oosterheert JJ, Hak E, Hoepelman AI. Usefulness of consecutive C-reactive protein measurements in follow-up of severe community-acquired pneumonia. *Eur Respir J*. 2008; 32(3):726-732.
11. Martínez R , Menéndez R , Reyes S , et al. Factors associated with inflammatory cytokine patterns in community-acquired pneumonia. *Eur Respir J*. 2011;37(2):393-399.
12. Müller F , Christ-Crain M, Bregenzer T , et al; ProHOSP Study Group. Procalcitonin levels predict bacteremia in patients with community-acquired pneumonia: a prospective cohort trial. *Chest*. 2010;138(1):121-129.
13. Masiá M , Gutiérrez F , Padilla S , et al. Clinical characterisation of pneumonia caused by atypical pathogens combining classic and novel predictors. *Clin Microbiol Infect*. 2007; 13( 2):153-161.
14. Krüger S , Ewig S , Papassotiriou J et al; CAPNETZ Study Group. Inflammatory parameters predict etiologic patterns but do not allow for individual prediction of etiology in patients with CAP: results from the German competence network CAPNETZ. *Respir Res*. 2009;10 :65.

15. Méndez R, Aldás I, Menéndez R. Biomarkers in Community-Acquired Pneumonia (Cardiac and Non-Cardiac). *J Clin Med*. 2020;9(2):549.
16. Christ-Crain M , Opal SM. Clinical review: the role of biomarkers in the diagnosis and management of communityacquired pneumonia. *Crit Care*. 2010;14(1):203.
17. Padrones S , Garcia-Vidal C , Fernández-Serrano S , et al. Impact of antibiotic therapy on systemic cytokine expression in pneumococcal pneumonia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010;29(10):1243-1251.
18. van Langevelde P , Ravensbergen E, Grashoff P , Beekhuizen H, Groeneveld PH , van Dissel JT. Antibiotic-induced cell wall fragments of *Staphylococcus aureus* increase endothelial chemokine secretion and adhesiveness for granulocytes. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43(12):2984-2989.
19. Strieter RM , Belperio JA , Keane MP. Host innate defenses in the lung: the role of cytokines. *Curr Opin Infect Dis*. 2003;16(3):193-198.
20. Hoogerwerf JJ , de Vos AF , Bresser P , et al. Lung inflammation induced by lipoteichoic acid or lipopolysaccharide in humans. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;178(1):34-41.
21. Opitz B , van Laak V , Eitel J , Suttorp N. Innate immune recognition in infectious and noninfectious diseases of the lung. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181(12):1294-1309.
22. Sémiramoth N , Gleizes A , Turbica I , et al. *Escherichia coli* type 1 pili trigger late IL-8 production by neutrophil-like differentiated PLB-985 cells through a Src family kinase- and MAPK-dependent mechanism. *J Leukoc Biol*. 2009;85(2):310-321.

23. Zaki Mel S. Interleukin 8 is a surrogate marker for rapid diagnosis of bacteriuria. *Immunol Invest.* 2008;37(7):694-703.
24. Bermejo-Martin JF , Martin-Loeches I , Rello J , et al. Host adaptive immunity deficiency in severe pandemic influenza. *Crit Care.* 2010;14(5):R167.
25. Sun K , Torres L , Metzger DW. A detrimental effect of interleukin-10 on protective pulmonary humoral immunity during primary influenza A virus infection. *J Virol.* 2010;84(10):5007-5014.
26. Mocellin S, Panelli MC, Wang E, Nagorsen D, Marincola FM. The dual role of IL-10. *Trends Immunol.* 2003;24(1):36-43.
27. Tuvim MJ , Evans SE , Clement CG , Dickey BF , Gilbert BE. Augmented lung inflammation protects against influenza A pneumonia. *PLoS ONE.* 2009;4(1):e4176.

## Estudio 2: Age-related risk factors for bacterial aetiology in community-acquired pneumonia.

1. Bartolomé M, Almirall J, Morera J, Pera G, Ortún V, Bassa J, Bolibar I, Balanzó X, Verdaguer A, Maresme Community-Acquired Pneumonia Study Group (GEMPAC). A population-based study of the costs of care for community-acquired pneumonia. *Eur. Respir. J.* 2004; **23**: 610–6.
2. Woodhead M. The European vision of community-acquired pneumonia. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2009; **30**: 136–45.
3. Welte T, Torres A, Nathwani D. Clinical and economic burden of community-acquired pneumonia among adults in Europe. *Thorax* 2012; **67**: 71–9.
4. van Vught LA, Endeman H, Meijvis SC, Zwinderman AH, Scicluna BP, Biesma DH, van der Poll T. The effect of age on the systemic inflammatory response in patients with community-acquired pneumonia. *Clin. Microbiol. Infect.* 2014; **20**: 1183–8.
5. Kothe H, Bauer T, Marre R, Suttorp N, Welte T, Dalhoff K, Competence Network for Community-Acquired Pneumonia study group. Outcome of community-acquired pneumonia: influence of age, residence status and antimicrobial treatment. *Eur. Respir. J.* 2008; **32**: 139–46.
6. Cillóniz C, Polverino E, Ewig S, Aliberti S, Gabarrús A, Menéndez R, Mensa J, Blasi F, Torres A. Impact of age and comorbidity on cause and outcome in community-acquired pneumonia. *Chest* 2013; **144**: 999–1007.
7. Ruiz M, Ewig S, Marcos MA, Martínez JA, Arancibia F, Mensa J, Torres A. Etiology of community-acquired pneumonia: impact of age, co-

- morbidity, and severity. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1999; **160**: 397–405.
8. Domenech A, Puig C, Martí S, Santos S, Fernández A, Calatayud L, Dorca J, Ardanuy C, Liñares J. Infectious etiology of acute exacerbations in severe COPD patients. *J. Infect.* 2013; **67**: 516–23.
  9. Menéndez R, Torres A, Reyes S, Zalacain R, Capelastegui A, Aspa J, Borderías L, Martín-Villasclaras JJ, Bello S, Alfageme I, de Castro FR, Rello J, Molinos L, Ruiz-Manzano J. Initial management of pneumonia and sepsis: factors associated with improved outcome. *Eur. Respir. J.* 2012;**39**:156–62..
  10. Menéndez R, Sahuquillo-Arce JM, Reyes S, Martínez R, Polverino E, Cillóniz C, Córdoba JG, Montull B, Torres A. Cytokine activation patterns and biomarkers are influenced by microorganisms in community-acquired pneumonia. *Chest* 2012; **141**: 1537–45.
  11. Cillóniz C, Civljak R, Nicolini N, Torres A. Polymicrobial community-acquired pneumonia: an emerging entity. *Respirology* 2016; **21**: 65–75.
  12. Cillóniz C, Ewig S, Polverino E, Marcos MA, Prina E, Sellares J, Ferrer M, Ortega M, Gabarrús A, Mensa J *et al.* Communityacquired pneumonia in outpatients: etiology and outcomes. *Eur. Respir. J.* 2012; **40**: 931–8.
  13. Gutiérrez F, Masiá M, Rodríguez JC, Mirete C, Soldán B, Padilla S, Hernández I, De Ory F, Royo G, Hidalgo AM. Epidemiology of community-acquired pneumonia in adult patients at the dawn of the 21st century: a prospective study on the Mediterranean coast of Spain. *Clin. Microbiol. Infect.* 2005; **11**: 788–800.

14. Zalacain R, Torres A, Celis R, Blanquer J, Aspa J, Esteban L, Menendez R, Blanquer R, Borderias L, on behalf of the "Pneumonia in the elderly" working group, Area de Tuberculosis e Infecciones Respiratorias. Community-acquired pneumonia in the elderly: Spanish multicentre study. *Eur. Respir. J.* 2003; **21**: 294–302.
15. Polverino E, Torres A, Menendez R, Cillóniz C, Valles JM, Capelastegui A, Marcos MA, Alfageme I, Zalacain R, Almirall J *et al.* HCAP Study investigators. Microbial aetiology of healthcare associated pneumonia in Spain: a prospective, multicentre, casecontrol study. *Thorax* 2013; **68**: 1007–14.
16. Woodhead M. Community-acquired pneumonia in Europe: causative pathogens and resistance patterns. *Eur. Respir. J.* 2002; **20** (Suppl. 36): 20s–7.
17. Martínez-Solano L, Macia MD, Fajardo A, Oliver A, Martinez JL. Chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in chronic obstructive pulmonary disease. *Clin. Infect. Dis.* 2008; **47**: 1526–33.
18. Albertson TE, Louie S, Chan AL. The diagnosis and treatment of elderly patients with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease and chronic bronchitis. *J. Am. Geriatr. Soc.* 2010; **58**: 570–9.
19. Bonnel AR, Bunchorntavakul C, Reddy KR. Immune dysfunction and infections in patients with cirrhosis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2011; **9**: 727–38.
20. Koziel H, Koziel MJ. Pulmonary complications of diabetes mellitus. Pneumonia. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 1995; **9**: 65–96.

21. Garnett JP, Baker EH, Naik S, Lindsay JA, Knight GM, Gill S, Tregoning JS, Baines DL. Metformin reduces airway glucose permeability and hyperglycaemia-induced *Staphylococcus aureus* load independently of effects on blood glucose. *Thorax* 2013; **68**: 835–45.
22. Bandi V, Apicella MA, Mason E, Murphy TF, Siddiqi A, Atmar RL, Greenberg SB. Nontypeable *Haemophilus influenzae* in the lower respiratory tract of patients with chronic bronchitis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001; **164**: 2114–9.
23. Clemans DL, Bauer RJ, Hanson JA, Hobbs MV, St Geme JW 3rd, Marrs CF, Gilsdorf JR. Induction of proinflammatory cytokines from human respiratory epithelial cells after stimulation by nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* 2000; **68**: 4430–40.
24. Saïd MH, Layani MP, Colon S, Faraj G, Glastre C, Cochat P. *Mycoplasma pneumoniae*-associated nephritis in children. *Pediatr. Nephrol.* 1999; **13**: 39–44.
25. Capelastegui A, España PP, Bilbao A, Gamazo J, Medel F, Salgado J, Gorostiaga I, Lopez de Goicoechea MJ, Gorordo I, Esteban C *et al.* Poblational Study of Pneumonia (PSoP) Group. Etiology of community-acquired pneumonia in a population-based study: link between etiology and patients characteristics, process-of-care, clinical evolution and outcomes. *BMC Infect. Dis.* 2012; **12**: 134.
26. Karagiannis I, Schimmer B, Van Lier A, Timen A, Schneeberger P, Van Rotterdam B, De Bruin A, Wijkmans C, Rietveld A, Van Duynhoven Y. Investigation of a Q fever outbreak in a rural area of The Netherlands. *Epidemiol. Infect.* 2009; **137**: 1283–94.

27. Orr HJ, Christensen H, Smyth B, Dance DA, Carrington D, Paul I, Stuart JM, South West Q Fever Project Group. Case-control study for risk factors for Q fever in southwest England and Northern Ireland. *Euro Surveill.* 2006; **11**: 260–2.
28. Wielders CC, Wuister AM, de Visser VL, de Jager-Leclercq MG, Groot CA, Dijkstra F, van Gageldonk-Lafeber AB, van Leuken JP, Wever PC, van der Hoek W *et al.* Characteristics of hospitalized acute Q fever patients during a large epidemic. The Netherlands. *PLoS One* 2014; **9**: e91764.
29. Yang SR, Chida AS, Bauter MR, Shafiq N, Seweryniak K, Maggirwar SB, Kilty I, Rahman I. Cigarette smoke induces proinflammatory cytokine release by activation of NF-kappaB and posttranslational modifications of histone deacetylase in macrophages. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2006; **29**: L46–57.
30. Thomassen MJ, Barna BP, Wiedemann HP, Farmer M, Ahmad M. Human alveolar macrophage function: differences between smokers and nonsmokers. *J. Leukoc. Biol.* 1988; **44**: 313–8.
31. Bhatta M, Pruett SB, Swiatlo E, Nanduri B. Alcohol abuse and *Streptococcus pneumoniae* infections: consideration of virulence factors and impaired immune responses. *Alcohol* 2011; **45**: 523–39.
32. Ghare S, Patil M, Hote P, Suttles J, McClain C, Barve S, Joshi- Barve S. Ethanol inhibits lipid raft-mediated TCR signaling and IL-2 expression: potential mechanism of alcohol-induced immune suppression. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2011; **35**: 1435–44.

33. Janssen WJ. Alveolar macrophage dysfunction and chronic alcohol use. Time to think about zinc. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2013; **188**: 635–6.
34. Jover F, Cuadrado JM, Andreu L, Martínez S, Cañizares R, de la Tabla VO, Martín C, Roig P, Merino J. A comparative study of bacteremic and non-bacteremic pneumococcal pneumonia. *Eur. J. Intern. Med.* 2008; **19**: 15–21.

### **Estudio 3: Influence of environmental conditions and pollution on the incidence of *Streptococcus pneumoniae* infections.**

1. Kim PE, Musher DM, Glezen WP, et al. Association of invasive pneumococcal disease with season, atmospheric conditions, air pollution, and the isolation of respiratory viruses. *Clin Infect Dis* 1996; 22: 100–106.
2. Statistics Office of Valencia City Council. Population density by district, 2001-2016.  
[www.valencia.es/ayuntamiento/catalogo.nsf/IndiceAnuario?readForm&language=1&capitulo=2&tema=1&bdOrigen=ayuntamiento/estadistica.nsf&idApooyo=58FB3C7A3D56E414C1257DD40057EB6C](http://www.valencia.es/ayuntamiento/catalogo.nsf/IndiceAnuario?readForm&language=1&capitulo=2&tema=1&bdOrigen=ayuntamiento/estadistica.nsf&idApooyo=58FB3C7A3D56E414C1257DD40057EB6C). Date last accessed: August 2017.
3. Wolff RK. Effects of airborne pollutants on mucociliary clearance. *Environ Health Perspect* 1986; 66: 223–237.
4. Bailey KL, Robinson JE, Sisson JH, et al. Alcohol decreases RhoA activity through a nitric oxide (NO)/cyclic GMP(cGMP)/protein kinase G (PKG)-dependent pathway in the airway epithelium. *Alcohol Clin Exp Res* 2011; 35:1277–1281.
5. Kienast K, Riechelmann H, Knorst M, et al. Combined exposures of human ciliated cells to different concentrations of sulfur dioxide and nitrogen dioxide. *Eur J Med Res* 1996; 1: 533–536.
6. Riechelmann H, Maurer J, Kienast K, et al. Respiratory epithelium exposed to sulfur dioxide--functional and ultrastructural alterations. *Laryngoscope* 1995; 295–299.

7. Vodonos A, Kloog I, Boehm L, et al. The impact of exposure to particulate air pollution from non-anthropogenic sources on hospital admissions due to pneumonia. *Eur Respir J* 2016; 48: 1791–1794.
8. Zhou H, Kobzik L. Effect of concentrated ambient particles on macrophage phagocytosis and killing of *Streptococcus pneumoniae*. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 36: 460–465.
9. Ciruela P, Broner S, Izquierdo C, et al. Invasive pneumococcal disease rates linked to meteorological factors and respiratory virus circulation (Catalonia, 2006–2012). *BMC Public Health*; 2016; 16: 400.
10. Liu Y, Liu J, Chen F, et al. Impact of meteorological factors on lower respiratory tract infections in children. *J Int Med Res* 2016; 44: 30–41.
11. Bogaert D, Keijser B, Huse S, et al. Variability and diversity of nasopharyngeal microbiota in children: A metagenomic analysis. *PLoS One* 2011; 6: e17035.
12. Feemster KA, Li Y, Localio AR, et al. Risk of invasive pneumococcal disease varies by neighbourhood characteristics: implications for prevention policies. *Epidemiol Infect* 2013; 141: 1679–1689.
13. De Jong K, Vonk JM, Zijlema WL, et al. Air pollution exposure is associated with restrictive ventilatory patterns. *Eur Respir J* 2016; 48: 1221–1224.
14. Clapp LJ, Jenkin ME. Analysis of the relationship between ambient levels of O<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub> and NO as a function of NO<sub>x</sub> in the UK. *Atmos Environ* 2001; 35: 6391–6405

# Conclusiones

## Estudio 1:

Los hallazgos más significativos de este estudio fueron:

1. Los niveles más altos de citocinas, PCR y PCT se encontraron en pacientes con bacteriemia, y los más bajos en aquellos en los que no se encontró etiología y en NAC por virus.
2. Los distintos microorganismos causales presentaron patrones inflamatorios diferenciados.
3. Un punto de corte de PCT  $>0,5$  para diferenciar bacterias atípicas y virus frente al resto de bacterias presentó una sensibilidad de 89/81%, una especificidad de 68%, un valor predictivo positivo de 12-22% y un valor predictivo negativo de 99-97%
4. PCT $>0,36$  tuvo un excelente VPN de 98% para predecir hemocultivos positivos, con una sensibilidad del 85% y una especificidad del 45%.
5. La NAC por *L. pneumophila* presentó niveles más elevados de IL-8 y TNF- $\alpha$  que *S. pneumoniae*, con un VPN de 89% y 94% respectivamente

## Estudio 2:

1. En ancianos, la EPOC fue un factor de riesgo para *P. aeruginosa* y *S. aureus*, las patologías hepáticas para *H. influenzae* y enterobacterias, y el abuso de alcohol para infecciones mixtas.
2. En adultos, la DM se asoció con NAC por *S. aureus* y *S. pneumoniae*, y el tabaquismo con infecciones mixtas.
3. En adultos jóvenes, la DM se asoció con NAC por *S. aureus* y el abuso del alcohol con *S. pneumoniae*.

### **Estudio 3:**

1. Una mayor radiación solar y el aumento de la temperatura y de la humedad se asociaron con un menor número de NAC por *S. pneumoniae*, en infecciones profundas la asociación fue con mayor radiación solar y el aumento de la temperatura.
2. El aumento de gases derivados de combustibles fósiles se asoció con una mayor incidencia de NAC por *S. pneumoniae*, mientras que en infecciones profundas, NO<sub>x</sub> y SO<sub>2</sub> fueron los gases implicados.

### **Conclusión final**

Los resultados de esta tesis ponen de manifiesto que la patología infecciosa pulmonar supera con creces el axioma del siglo XIX microorganismo/infección. En su lugar, vemos un baile de factores propios del microorganismo patógeno, del paciente y del lugar en el que reside. Factores que harán que aparezca una NAC, que favorecerán a unos microorganismos sobre otros y que presentarán manifestaciones concretas y específicas. Todo esto tiene una aplicación directa en la búsqueda de nuevos planteamientos diagnósticos y terapéuticos más individualizados.

## Anexo: Artículos incluidos en la presente tesis

1- Menéndez R, Sahuquillo-Arce JM, Reyes S, Martínez R, Polverino E, Cillóniz C, Córdoba JG, Montull B, Torres A. **Cytokine activation patterns and biomarkers are influenced by microorganisms in community-acquired pneumonia.** Chest. 2012 Jun;141(6):1537-1545. doi: 10.1378/chest.11-1446.

2- Sahuquillo-Arce JM, Menéndez R, Méndez R, Amara-Elori I, Zalacain R, Capelastegui A, Aspa J, Borderías L, Martín-Villasclaras JJ, Bello S, Alfageme I, de Castro FR, Rello J, Molinos L, Ruiz-Manzano J, Torres A. **Age-related risk factors for bacterial aetiology in community-acquired pneumonia.** Respirology. 2016 Nov;21(8):1472-1479. doi: 10.1111/resp.12851.

3- Sahuquillo-Arce JM, Ibáñez-Martínez E, Hernández-Cabezas A, Ruiz-Gaitán A, Falomir-Salcedo P, Menéndez R, López-Hontangas JL. **Influence of environmental conditions and pollution on the incidence of *Streptococcus pneumoniae* infections.** ERJ Open Res. 2017 Dec 1;3(4). pii: 00014-2017. doi: 10.1183/23120541.00014-2017. eCollection 2017 Oct.