



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS  
DE GRAN CANARIA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICAS Y QUIRÚRGICAS

# **Tesis Doctoral**

**Papel de los receptores Fcgamma en la  
susceptibilidad, gravedad y pronóstico de la  
neumonía adquirida en la comunidad**

**José Alberto Marcos y Ramos**

**Las Palmas de Gran Canaria, enero de 2016**



*Dedicado a mis padres:*  
*Servando († 2010), el hombre bueno e íntegro*  
*y Rosita, una fuerza de la Naturaleza.*



## **AGRADECIMIENTOS.**



## **AGRADECIMIENTOS.**

Por suerte o por desgracia, soy médico. Médico clínico. Y eso a pesar de pequeñas incursiones en otros campos de la Medicina, tremendamente interesantes, pero que no dejan de ser pequeños desvíos en un camino que elegí hace ya bastantes años.

Esto es importante porque, visto con esta perspectiva, no es que esté agradecido: es que estoy realmente en deuda con aquellos que, siendo sólo un residente recién llegado a Las Palmas, decidieron darme un voto de confianza y me permitieron participar, no en un estudio sino más bien en un proyecto de vida que se salía del ámbito normal de la profesión que había decidido ejercer. Estoy en deuda y estoy orgulloso. Porque desde el pedestal en que muchas veces la Sociedad y nuestros propios colegas colocan a nuestra honrosa profesión, muchas veces es difícil caer en la cuenta de lo enriquecedor que es el intercambio científico directo, de primera mano, con aquellos que se dedican a la parte más oculta, menos conocida, con menos oropeles de las Ciencias Biológicas y de la Salud.

Mi más sincero agradecimiento a mis tres codirectores de Tesis: sólo con que figuren sus nombres en los títulos de crédito se engrandece cualquier escrito. Jordi Solé Violán es un auténtico maestro en mi especialidad y de él se puede aprender tanto por lo que dice y hace, como por lo que calla y voluntariamente omite: la pena del desencanto es que hay quien no aprovecha la sabiduría del que la tiene. Mi relación con él ha sido fructífera, no sólo en el ámbito científico-médico, sino también en el ámbito personal: siempre ha sabido mostrar y transmitir entereza y gallardía y me ha demostrado que, a pesar de los tropiezos, siempre hay que seguir adelante. Amigo de sus amigos hasta sus últimas consecuencias, estoy un tanto sesgado a la hora de valorarlo: es un amigo. Felipe Rodríguez de Castro es el docente que se describe en los libros clásicos, de esos de los que van quedando pocos: pausado, metódico, conciliador pero a la vez exigente. Siempre ha sabido poner el contrapunto sensato a cualquier debate que se generase en el desarrollo de un proyecto científico... o de

una charla entre amigos. Y, además, aporta calidez y cercanía cuando todo parece ponerse en contra. Carlos Rodríguez Gallego encarna al científico que todo el mundo reconoce por las películas: incansable, chispeante y rápido en sus juicios, con tintes de genialidad y con un orden absolutamente propio... agotador pero fantástico. Echo de menos las conversaciones sobre lo divino y sobre lo humano que manteníamos entre discusiones puramente científicas. Muchas gracias a los tres.

Mi relación con el personal del Servicio de Inmunología del Hospital Universitario Dr. Negrín de Gran Canaria ha hecho que mis miras se ensanchen y, por tanto, que mi labor como médico mejore. Son ya muchos años de relación, que han hecho que considere amigos a aquellos con los que he trabajado. El listado sería muy extenso, pero no puedo dejar de citar a las “siames”, Nerida González Quevedo y Yanira Florido Ortega, a Ana Domínguez Acosta, a Estefanía Herrera Ramos (recien doctorada), a Ithaisa Sologuren Marrero (en el mismo mar que yo, pero en distinto barco), a Ayoze García Saavedra y a M<sup>a</sup> Carmen Quintana. Siempre me han brindado un apoyo incondicional a pesar de los vaivenes que el Destino ha querido imponer a mi relación directa con ellos.

Y no puedo negar mi más absoluta admiración por M<sup>a</sup> Isabel García Laorden. Ella es el trabajo personificado sin buscar recompensa. Y el aguante, y la paciencia, y la sensatez. Cuando todo falla, ahí está Isabel con un saco de soluciones; cuando todo se derrumba, aparece Isabel con un casco; cuando parece que nada puede enderezar una situación, Isabel tira de los dos extremos de la cuerda aunque tenga que pelear con el mundo. Sin ella, esta Tesis nunca hubiera podido ver la luz. Millones de gracias.

Muchas más personas han contribuido, profesionalmente, para que esta Tesis saliese adelante. Del Hospital Universitario Doctor Negrín de Gran Canaria: el personal del Archivo de Historias Clínicas, y como máximo exponente Mapi, siempre me ha brindado su más absoluta colaboración; mis compañeros residentes de la UMI durante los años de formación, personalizados en José María Ferrer Agüero, Leonor González Morales y



Paco Álvarez Salgado; el personal de enfermería que siempre colaboró de buen grado y sin contrapartidas en la extracción de las muestras, y que es el soporte más cercano de nuestros pacientes; Juan Verona, del Servicio de Ilustración, que siempre tuvo un hueco para poder atender mis locuras. Y la figura casi paternal del Dr. José Antonio Bolaños Guerra que, por encima de todo y de todos, siempre nos inculcó que el paciente es lo primero y que la sensatez acaba imponiéndose. Del Hospital Doctor José Molina Orosa de Lanzarote: a mis compañeros de la UMI, que han tenido que soportar durante todos estos años “al loco de playa” que estaba haciendo la Tesis y que me han apoyado en este camino, sobre todo desde el pasado 10 de septiembre; al personal directivo que aprobó, sin atisbo de duda, mis permisos acumulados para que el empujón final de este trabajo pudiera verse reflejado en el actual documento. Y, aunque pueda parecer extraño, gracias a aquellos que en determinado momento decidieron no seguir confiando en mí, porque gracias a ellos pude dedicar todas las energías que ya creía perdidas en revertir el estado de atasco en que se encontraba este proyecto, y en culminar y presentar esta Tesis. Gracias a todos.

Por último, pero no menos importante, agradecer el apoyo incondicional de mi familia aunque sea desde la distancia: ese nexo, ese cordón umbilical invisible es el que, cuando todo camina “patas arriba”, te mantiene pegado al suelo y te da fuerzas para seguir adelante. Y claro, a Gema, que durante todos estos años ha soportado mis idas y mis venidas, mis alegrías y mis malhumores, mis agobios y mis (escasas) explosiones de dicha; y siempre ha estado ahí, oyendo hablar de los receptores de las inmunoglobulinas, de las bases de datos y de la “gente del Negrín”, sin interferir y sin dejar de mantenerse en su sitio para poder hacer que yo me mantuviese en el mío. Millones de gracias.

Si el agradecimiento fuese dinero, yo sería multimillonario.



## **ABREVIATURAS.**



## **ABREVIATURAS.**

- ACE: enzima convertora de la angiotensina (*angiotensin converter enzyme*)
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- AI: aurícula izquierda
- ARN: ácido ribonucleico
- ARNm: ácido ribonucleico mensajero
- APACHE: *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation*
- ATS: Sociedad Americana del Tórax (*American Thoracic Society*)
- BPI: proteína permeabilizadora bactericida (*bactericidal/permeability increasing protein*)
- BUN: nitrógeno ureico en sangre (*blood urea nitrogen*)
- C: sistema del complemento
- CARS: síndrome de respuesta anti-inflamatoria compensadora (*compensatory anti-inflammatory response syndrome*)
- CD14: glicoproteína de membrana (*cluster of differentiation*) 14
- CMBD: conjunto mínimo básico de datos
- CpG: dinucleótido citosina-fosfato-guanina
- CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono
- dL: decilitro
- DAMP: patrón molecular asociado a daño o lesión celular (*damage associated molecular pattern*)
- dNTP: desoxirribonucleotido trifosfato
- DS: desviación estándar
- EDTA: ácido etilendiaminotetracético
- EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica
- FC: frecuencia cardiaca
- Fc: fragmento cristizable de la inmunoglobulina
- FcR: receptor del fragmento Fc de las inmunoglobulinas
- FcγR: receptor del fragmento Fc de la inmunoglobulina G
- FiO<sub>2</sub>: fracción inspiratoria de oxígeno

## **FcyR y NAC**

- FRnA: insuficiencia/fracaso renal agudo
- h: hora
- HMGB-1: proteínas nucleares de alta movilidad (electroforética) box1 (*High Mobility Group Box1 Protein*)
- HSPs: proteínas del shock térmico (*heat-shock proteins*)
- H<sub>2</sub>O: agua
- IC95%: intervalo de confianza al 95%
- IDP: inmunodeficiencia primaria
- IDSA: Sociedad Americana de enfermedades infecciosas (*Infectious Diseases Society of America*)
- IFN: interferón
- IgG: inmunoglobulina de clase G
- IL: interleuquina
- INR: relación normalizada internacional del tiempo de protrombina (*International Normalized Ratio*)
- IRpA: insuficiencia respiratoria aguda
- Kg: kilogramos
- L: litro
- LBP: proteína de unión al lipopolisacárido (*lipopolysaccharide binding protein*)
- LES: lupus eritematosos sistémico
- LPS: lipopolisacárido
- LTA: linfotóxina alfa
- m<sup>2</sup>: metro cuadrado
- mg: miligramos
- min: minuto
- mL: mililitro
- mm<sup>3</sup>: milímetro cúbico = microlitro
- mmHg: milímetros de mercurio
- M: molar
- M': marcador de peso molecular
- MBL: lectina de unión a manosa (*mannose binding lectin*)

- $\text{MgCl}_2$ : cloruro magnésico
- $\mu\text{L}$ : microlitro = milímetro cúbico
- N: número de individuos
- NaCl: cloruro sódico
- NAC: neumonía adquirida en la comunidad
- NK: [células] *natural killer*
- NNAC: neumonía neumocócica adquirida en la comunidad
- NnNAC: neumonía no neumocócica adquirida en la comunidad
- NNAC-B: neumonía neumocócica bacteriémica adquirida en la comunidad
- NNAC-NB: neumonía neumocócica no bacteriémica adquirida en la comunidad
- NF $\kappa$ B: factor de transcripción nuclear  $\kappa\text{B}$
- NLR: receptor similar al dominio de oligomerización de nucleótido
- $^{\circ}\text{C}$ : grados centígrados
- $\text{O}_2$ : oxígeno
- OR: *odds ratio*
- P: probabilidad
- $\text{PaO}_2$ : presión arterial de oxígeno
- $\text{PaCO}_2$ : presión arterial de dióxido de carbono
- PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1
- PAM: presión arterial media
- PAS: presión arterial sistólica
- pb: pares de bases
- PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*)
- PCR-SSP: reacción en cadena de la polimerasa con *primers*/cebadores específicos de secuencia (*sequence specific primer-polymerase chain reaction*)
- P"CR: proteína C reactiva
- PAMP: patrón molecular asociado a patógenos (*pathogen associated molecular pattern*)
- PEP: presión de enclavamiento pulmonar

- PHC: planta de hospitalización convencional
- PSI: índice de severidad de la neumonía (*pneumonia severity index*)
- PRR: receptores reconocedores de patrones (*pattern recognition receptors*)
- RFLP: polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (*restriction fragment length polymorphism*)
- S.: *Streptococcus*
- SDRA: síndrome de distrés respiratorio agudo
- SDMO: síndrome de disfunción multiorgánica
- seg: segundos
- SEPAR: Sociedad española de Neumología y Cirugía Torácica
- SNP: polimorfismo de un único nucleótido (*single-nucleotide polymorphism*)
- SP: proteínas del surfactante (*surfactant proteins*)
- SvO<sub>2</sub>: saturación venosa de oxígeno
- T<sup>a</sup>: temperatura
- TE: tris-EDTA
- TLR: receptor similar al Toll o tipo Toll (*Toll-like receptor*)
- TNF: factor de necrosis tumoral (*tumoral necrosis factor*)
- TTPa: tiempo de tromboplastina parcial activado
- ufc: unidades formadoras de colonias
- UMI: Unidad/Servicio de Medicina Intensiva
- VIH: virus de la inmunodeficiencia humana
- vs: contra (*versus*)
- x': por minuto



## **ÍNDICES.**

- 1. General.**
- 2. De tablas.**
- 3. De figuras.**



**ÍNDICE GENERAL.**

	<b>Pág.</b>
<b><u>1.- INTRODUCCIÓN.</u></b>	<b>1</b>
<u>1.1.- Justificación de los estudios genéticos en las enfermedades infecciosas.</u>	6
<u>1.2.- Definiciones y conceptos previos.</u>	8
1.2.1.- Polimorfismo genético.	8
1.2.2.- Desequilibrio de ligamiento.	8
1.2.3.- Tipos de estudios en genética y enfermedad.	8
1.2.4.- Defensa frente a las infecciones: inmunidad innata y adaptativa.	9
<u>1.3.- Polimorfismos implicados en la respuesta a la infección.</u>	12
1.3.1.- Polimorfismos en el reconocimiento del microorganismo.	12
a) LBP/BPI.	13
b) CD14.	14
c) TLR.	14
d) MBL.	15
e) FcγR.	15
1.3.2.- Polimorfismos implicados en la respuesta inflamatoria.	17
a) TNFα.	17
b) IL-1.	17
c) IL6.	18
d) Proteínas del shock térmico.	18
1.3.3.- Polimorfismos implicados en la respuesta anti-inflamatoria.	18
a) Antagonistas de los receptores de IL-1.	19
b) IL-10.	19
c) Receptores del TNFα.	19
1.3.4.- Otros polimorfismos de interés.	20
a) Enzima convertidora de la angiotensina.	20
b) Proteínas del surfactante.	20
c) Proteínas de la coagulación.	21

1.4.- Justificación del estudio del gen <i>FCGR2A</i> en la neumonía adquirida en la comunidad.	21
2.- HIPÓTESIS.	25
3.- OBJETIVOS.	29
4.- MATERIAL Y MÉTODOS.	33
4.1.- Tipo de estudio.	35
4.2.- Población.	35
4.2.1.- Casos.	35
a) Criterios de inclusión.	35
b) Criterios de exclusión.	35
4.2.2.- Controles.	36
a) Controles sanos de la población general.	36
b) Controles pacientes.	36
4.3.- Definiciones.	36
4.3.1.- Etiología de la neumonía.	36
a) De presunción.	36
b) Definitiva.	36
4.3.2.- Neumonía neumocócica no bacteriémica.	37
4.3.3.- Neumonía neumocócica bacteriémica.	37
4.3.4.- NAC grave.	38
4.3.5.- Sepsis.	39
4.3.6.- Sepsis grave.	39
4.3.7.- Shock séptico.	40
4.3.8.- Síndrome de distrés respiratorio agudo.	40
4.3.9.- Insuficiencia respiratoria aguda.	40
4.3.10.- Insuficiencia/fracaso renal agudo.	41
4.4.- Recogida de datos.	41
4.5.- Estudio genético.	43
4.5.1.- Determinaciones genéticas.	43

4.5.2.- Extracción del ADN genómico.	43
4.5.3.- Genotipado.	44
a) Tipaje del gen <i>FCGR2A</i> .	45
b) Tipaje del gen <i>FCGR3A</i> .	47
c) Tipaje del gen <i>FCGR3B</i> .	49
<u>4.6.- Aspectos éticos.</u>	53
<u>4.7.- Tamaño muestral.</u>	53
<u>4.8.- Análisis estadístico.</u>	54
<u>5.- RESULTADOS.</u>	55
<u>5.1.- Estudio clínico-demográfico.</u>	57
5.1.1.- Poblaciones control.	57
5.1.2.- Grupo de pacientes.	57
a) Distribución demográfica.	57
b) Características clínicas previas.	57
c) Microbiología.	60
d) Estratificación por gravedad.	63
1. Escala P.S.I.	67
2. Escala APACHE II.	67
3. Bacteriemia.	67
4. Estratificación de la sepsis.	68
5. Insuficiencia/fracaso renal agudo.	70
6. Síndrome de distrés respiratorio agudo.	71
7. Disfunción multiorgánica.	72
8. Mortalidad.	73
<u>5.2.- Estudio genético.</u>	74
5.2.1.- Caracterización genética de la población control sana.	74
5.2.2.- Caracterización genética de la población con neumonía.	75
a) Neumonía adquirida en la comunidad.	75
b) Neumonía neumocócica adquirida en la comunidad.	76
5.2.3.- Estudio de susceptibilidad.	78
c) Neumonía adquirida en la comunidad.	78

d) Neumonía neumocócica adquirida en la comunidad.	80
5.2.4.- Estudio de gravedad y pronóstico.	83
a) Neumonía adquirida en la comunidad.	83
1. Escala P.S.I.	83
2. Escala APACHE II.	84
3. Bacteriemia.	85
4. Estratificación de la sepsis.	85
5. Insuficiencia renal aguda.	85
6. Síndrome de distrés respiratorio agudo.	87
7. Disfunción multiorgánica.	87
8. Mortalidad.	87
b) Neumonía neumocócica adquirida en la comunidad.	88
1. Escala P.S.I.	88
2. Escala APACHE II.	89
3. Bacteriemia.	89
4. Estratificación de la sepsis.	91
5. Insuficiencia/fracaso renal agudo.	92
6. Síndrome de distrés respiratorio agudo.	92
7. Disfunción multiorgánica.	92
8. Mortalidad.	92
 <u>6.- DISCUSIÓN.</u>	 95
 <u>7.- CONCLUSIONES.</u>	 107
 <u>8.- BIBLIOGRAFÍA.</u>	 111

**INDICE DE TABLAS.****Pág.**

Tabla 1.- Moléculas patrón de reconocimiento y moléculas receptoras.	13
Tabla 2.- Características clínico-demográficas de los pacientes con NAC.	58
Tabla 3.- Características clínico-demográficas de los distintos subgrupos de pacientes con NAC.	59
Tabla 4.- Características microbiológicas de los pacientes con NAC.	61
Tabla 5.- Características microbiológicas de los pacientes con NNAC.	62
Tabla 6.- Características clínicas de los pacientes con NAC.	64
Tabla 7.- Características clínicas de los pacientes con NNAC.	65
Tabla 8.- Asociación entre la NNAC-B y la NNAC-NB con la gravedad del proceso.	66
Tabla 9.- Comparativa de los valores de las escalas de Fine y APACHE-II en los distintos subgrupos de pacientes con NAC.	68
Tabla 10.- Distribución de los distintos grados de sepsis en pacientes con NAC y subgrupos de NNAC.	69
Tabla 11.- Comparativa del desarrollo de FRnA en pacientes con NAC y subgrupos de NNAC.	70
Tabla 12.- Comparativa del desarrollo de SDRA en pacientes con NAC y subgrupos de NNAC.	71
Tabla 13.- Comparativa del desarrollo de SDMO en pacientes con NAC y subgrupos de NNAC.	72
Tabla 14.- Comparativa de la mortalidad en pacientes con NAC y subgrupos de NNAC.	73
Tabla 15.- Frecuencias de los genotipos de los SNPs <i>FCGR2A</i> -H131R, <i>FCGR3A</i> -V158F y <i>FCGR3B</i> -NA1/NA2 en población control sana.	74
Tabla 16.- Frecuencias de los genotipos de los SNPs <i>FCGR2A</i> -H131R, <i>FCGR3A</i> -V158F y <i>FCGR3B</i> -NA1/NA2 en pacientes con NAC.	75

Tabla 17.- Frecuencias de los genotipos de los SNPs <i>FCGR2A</i> -H131R, <i>FCGR3A</i> -V158F y <i>FCGR3B</i> -NA1/NA2 en el subgrupo de pacientes con NNAC.	76
Tabla 18.- Características clínico-demográficas del subgrupo de pacientes con NNAC, estratificadas por el genotipo <i>FCGR2A</i> -H131R.	77
Tabla 19.- Frecuencias de los genotipos de los SNPs <i>FCGR2A</i> -H131R, <i>FCGR3A</i> -V158F y <i>FCGR3B</i> -NA1/NA2 en pacientes y controles.	79
Tabla 20.- Frecuencias de los genotipos de los SNPs <i>FCGR2A</i> -H131R, <i>FCGR3A</i> -V158F y <i>FCGR3B</i> -NA1/NA2 en pacientes con NNAC y controles.	81
Tabla 21.- Frecuencias de los genotipos de los SNPs <i>FCGR2A</i> -H131R, <i>FCGR3A</i> -V158F y <i>FCGR3B</i> -NA1/NA2 en pacientes con NNAC-B y controles.	82
Tabla 22.- Características de gravedad de los pacientes con NAC, estratificados por los genotipos del SNP <i>FCGR2A</i> -H131R.	84
Tabla 23.- Presentaciones clínicas de gravedad de la NAC en función de los genotipos del SNP <i>FCGR2A</i> -H131R.	86
Tabla 24.- Características de gravedad de los pacientes con NNAC, estratificados por los genotipos del SNP <i>FCGR2A</i> -H131R.	89
Tabla 25.- Frecuencias de los genotipos del SNP <i>FCGR2A</i> -H131R en pacientes con NNAC-B y NNAC-NB.	90
Tabla 26.- Presentaciones clínicas de gravedad de la NNAC en función de los genotipos del SNP <i>FCGR2A</i> -H131R.	91
Tabla 27.- Mortalidad de los pacientes con NNAC, estratificados por los genotipos del SNP <i>FCGR2A</i> -H131R.	93
Tabla 28.- Comparativa de la gravedad entre los subgrupos de NAC (NNAC y NnNAC) en función de la homocigosidad del alelo <i>FCGR2A</i> -H131.	94



**INDICE DE FIGURAS.****Pág.**

Figura 1.- Esquema del mecanismo de actuación de los receptores FcγRIIa y de la MBL como reconocedores de patrones moleculares asociados a patógenos.	10
Figura 2.- Opsonización y fagocitosis de patógenos por la IgG y la MBL.	11
Figura 3.- Esquematización de la funcionalidad de las diferentes isoformas del receptor FcγRIIa en cuanto a su afinidad por la IgG <sub>2</sub> .	22
Figura 4.- Gel de electroforesis para el tipaje del gen <i>FCGR2A</i> .	47
Figura 5.- Gráfica de distribución de alelos en el tipaje del gen <i>FCGR3A</i> .	49
Figura 6.- Gel de electroforesis para el análisis de NA1 en el tipaje del gen <i>FCGR3B</i> .	51
Figura 7.- Gel de electroforesis para el análisis de NA2 en el tipaje del gen <i>FCGR3B</i> .	51
Figura 8.- Gel de electroforesis para el análisis de SH en el tipaje del gen <i>FCGR3B</i> .	53
Figura 9.- Esquematización de las preferencias en la unión de la P <sup>n</sup> C <sup>n</sup> R con las isoformas de los receptores FcγRIIa.	102



## **1.- INTRODUCCIÓN.**

- 1. Justificación de los estudios genéticos.**
- 2. Definiciones y conceptos previos.**
- 3. Polimorfismos implicados.**
- 4. Justificación del estudio del gen *FCGR2A* en la NAC.**



## **1.- INTRODUCCIÓN.**

De todas las enfermedades infecciosas que pueden requerir hospitalización, la neumonía adquirida en la comunidad (NAC) es la que más frecuentemente provoca ingreso hospitalario en los países desarrollados. Su incidencia varía entre 1.6 y 16/1000 adultos/año <sup>1</sup> y en un estudio español publicado en 2010 (ajustado a nuestras características geográficas) era de 3.1/1000 adultos/año <sup>2</sup>. A pesar de los programas de vacunación antineumocócica en adultos, de los progresos en el tratamiento antibiótico, del mejor manejo del paciente ingresado y del mayor conocimiento que tenemos de los mecanismos fisiopatológicos de la sepsis, la NAC sigue siendo una enfermedad con una mortalidad y morbilidad significativas en niños menores de cinco años y en pacientes por encima de sesenta y cinco años. Su mortalidad a corto plazo es elevada y oscila entre el 4% y el 9.1%, de acuerdo con los resultados obtenidos en un estudio español de 2010 <sup>2</sup>. Y, en un estudio publicado en 2015 que analiza una gran cohorte internacional de pacientes con NAC, se llegan a aportar cifras de mortalidad intrahospitalaria de hasta el 19.8% en Europa y hasta el 30.6% en América latina durante los años 2008 a 2013 <sup>3</sup>. Por supuesto, en aquellos pacientes con NAC grave o que requirieron ingreso en una Unidad de Medicina Intensiva (UMI), el pronóstico fue claramente más sombrío <sup>4</sup>. En el estudio de 2015 anteriormente referenciado se obtuvieron datos de que, al comparar tres periodos de tiempo consecutivos (2001-2004, 2004-2008 y 2008-2013), la mortalidad intrahospitalaria por NAC no sólo no disminuía sino que aumentaba significativamente en el tiempo y que, además, el periodo temporal con mayor mortalidad a nivel global (2008-2013, 24.3%) se correlacionaba con el que tenía pacientes significativamente más jóvenes <sup>3</sup>. Parte de esa mortalidad podría ser explicada por el aumento de comorbilidades de los pacientes al haberse modificado la pirámide poblacional de los países industrializados, así como por los tratamientos antibióticos inapropiados, por la mayor virulencia de los microorganismos o por la especialidad del servicio médico responsable del paciente <sup>5 6</sup>. Sin

embargo, estas hipótesis no sólo no explican el estancamiento en los resultados positivos frente a esta enfermedad, sino que tampoco explican los múltiples casos de pacientes sin comorbilidades conocidas que desarrollan mala evolución clínica a pesar de tratamientos antibióticos adecuados.

Diferentes microorganismos pueden ser agentes etiológicos de la NAC, aunque la causa más frecuente es el *Streptococcus (S.) pneumoniae*<sup>7</sup> estimándolo en un 19.3% en un amplio metanálisis de estudios europeos<sup>1</sup> y en un 24.6% en un reciente estudio holandés<sup>8</sup>, que además lo relaciona con una mayor estancia hospitalaria, mayor necesidad de ingreso en UMI y mayor mortalidad al cabo de un año. Es llamativo que los costes del tratamiento farmacológico son bajos y es fundamentalmente el coste estructural y de personal lo que encarece el tratamiento. En otro reciente y amplísimo estudio holandés que analiza 195372 episodios de NAC introducidos en una base de datos común, similar al “conjunto mínimo básico de datos” español (CMBD), los autores estiman que el coste anual atribuido a la NAC supone el 51% del presupuesto anual asignado al tratamiento y prevención de las enfermedades infecciosas<sup>1</sup>. Está claro que estamos hablando de una enfermedad frecuente, que supone un alto coste económico y social y que, a pesar de los avances de los últimos años, sigue manteniéndose en un destacado puesto en cuanto a importancia en pérdida de salud.

Una de las posibilidades que podría explicar, al menos en parte, este comportamiento de la NAC con respecto a sus resultados en salud es que exista una variabilidad genética individual y poblacional que explique estos resultados tan poco lógicos. Desde hace años se están realizando múltiples aproximaciones a este tema: desde el análisis de la respuesta inflamatoria que podría subyacer en los resultados finales de la enfermedad<sup>9</sup> hasta el análisis de polimorfismos de distintos genes, capaces de producir efectos primarios o secundarios en los pacientes afectados de NAC y que pertenezcan a cada uno de los subgrupos conformados por dichos polimorfismos. A pesar de que la NAC es una enfermedad que

forzosamente debe comportarse como poligénica, ¿sería posible que existiese un marcador capaz de orientarnos respecto de la posible evolución clínica de un paciente recién ingresado? De existir, debería ser rápido, fiable y de resultados contrastados y reproducibles; y además, preferiblemente, de coste reducido.

Los pacientes de UMI son tremendamente dinámicos: en pocos minutos pueden pasar de una relativa estabilidad a una situación catastrófica desde la que se evoluciona al fracaso multiorgánico en el plazo de minutos. Y pacientes de similares características físicas, de edad comparable, de la misma localización geográfica y con el mismo microorganismo aislado evolucionan de forma totalmente distinta y sus resultados finales no son, en absoluto, superponibles.

Uno de los primeros problemas con los que nos encontramos a la hora de analizar esta enfermedad es saber si todos los estudios realizados están hablando del mismo proceso nosológico. Tan es así que, en un estudio español publicado en 2012, la neumonía era la segunda causa de discrepancias entre el diagnóstico clínico y el anatomopatológico <sup>10</sup> e incluso entre los propios patólogos puede haber grandes discrepancias al comparar los diagnósticos macro y microscópicos frente a los diagnósticos clínicos, y estas discrepancias son, a veces, irresolubles <sup>11</sup>. En la literatura encontramos múltiples estudios en los que se intentaba llegar a un diagnóstico unívoco (ó, al menos, común) de la NAC. La conclusión soterrada, y a veces explícita, en todos ellos es que es complicado llegar a definir ese concepto universal. Así pues, hay que llegar a un acuerdo “de mínimos” que permita enlazar la clínica que presenta el paciente con lo que conocemos de la enfermedad y que, a su vez, nos permita comparar y compartir nuestros resultados con los del resto de clínicos e investigadores. Al fin y al cabo, eso es lo que hace definir a la NAC.

### **1.1.- Justificación de los estudios genéticos en las enfermedades infecciosas.**

La variabilidad interindividual, observada tanto en la susceptibilidad a sufrir una infección pulmonar como en la evolución de la misma, es un hecho ampliamente reconocido. La morbilidad de una infección viene determinada por el resultado de una compleja interacción entre elementos del microorganismo (virulencia, carga bacteriana, serotipo, infecciones previas o acompañantes...), la intervención terapéutica (cobertura, posología, dosificación, precocidad, combinación, vía de administración...) y, muy especialmente, factores ligados al huésped (edad, comorbilidades, inmunodepresión...). No obstante, en la práctica clínica seguimos observando muertes por neumonía en sujetos sin factores de riesgo ni enfermedades subyacentes, a pesar de recibir un tratamiento antimicrobiano adecuado. También comprobamos que más de la mitad de los fallecimientos por neumonía neumocócica bacteriémica se producen en pacientes menores de 65 años; y que la infección por una cepa idéntica de *S. pneumoniae* puede causar shock séptico, SDRA y muerte en un determinado paciente, o una infección banal y autolimitada en otro. Lo que conocemos en la actualidad de la fisiopatología de las infecciones respiratorias explica muchas de las manifestaciones clínicas específicas que observamos en la práctica, pero no aclara suficientemente por qué sólo algunos pacientes sufren este tipo de evolución o ciertas manifestaciones y complicaciones. La configuración genética de cada paciente puede justificar la variabilidad interindividual en la susceptibilidad y en la evolución de las infecciones en general y de la neumonía en particular.

La variabilidad genética afecta a la respuesta del huésped y puede desempeñar un importante papel en estos pacientes. En humanos, las inmunodeficiencias primarias (IDP) que predisponen a la enfermedad neumocócica invasiva tienen afectadas la opsonización bacteriana o la fagocitosis esplénica y tienen defectos en la activación del NF- $\kappa$ B<sup>12</sup>. Los defectos en la opsonización se pueden observar fundamentalmente en las



IDP asociadas a la producción alterada de anticuerpos, así como en las deficiencias de componentes precoces de la vía clásica del complemento y la deficiencia de C3.

Es de sobra conocida la relación existente entre determinadas enfermedades y las alteraciones genéticas que las provocan. En la mayoría de los casos se trata de alteraciones de un único gen o monogénicas y su transmisión sigue una clara herencia mendeliana. Este sería el caso de la fibrosis quística, de la hemocromatosis hereditaria, del déficit de  $\alpha$ 1-antitripsina o de la neurofibromatosis <sup>13</sup>. Sin embargo, el camino que lleva al conocimiento de esta relación con las enfermedades infecciosas es más complejo. Existen circunstancias que nos pueden hacer sospechar la existencia de raras enfermedades del sistema inmune, como podría ser la recurrencia de infecciones respiratorias y la agammaglobulinemia; sin embargo, ¿están realmente relacionados determinados polimorfismos genéticos con determinadas maneras de enfermar en población que se comporta como basalmente sana? El clásico estudio de Sorensen sobre causas de muerte prematura en individuos adoptados <sup>14</sup> abrió la puerta para pensar en ello: el riesgo de dichos individuos de morir por causa infecciosa si sus padres biológicos habían fallecido por una infección antes de los 50 años era casi 6 veces superior, cosa que no sucedía en caso de que los que fallecieran por dicha causa fueran los padres adoptivos.

Por otro lado, no es sólo la infección sino también su posible tratamiento quien está influido por la genética: los estudios genéticos pueden permitir caracterizar las bases moleculares de la respuesta a determinados fármacos, con lo que se podría hacer más eficaz dicha respuesta a los mismos y, por tanto, mejorar el pronóstico de las infecciones <sup>15</sup>. Además, la respuesta del individuo a la infección también se ve afectada por la carga genética del mismo; sin embargo, esta respuesta no es tan simple y directa como en las enfermedades monogénicas sino que normalmente implica a múltiples genes, que se modulan entre sí y que se expresan como múltiples polimorfismos <sup>16</sup>.

## **1.2.- Definiciones y conceptos previos.**

**1.2.1.- Polimorfismo genético:** variaciones estables en la secuencia del ADN que ocurren en, al menos, el 1% de la población; quedarían excluidas, por tanto, las mutaciones espontáneas individuales <sup>17</sup>. Pueden ocurrir en los intrones (los más frecuentes), o en los exones y en las regiones promotoras (los menos frecuentes) y puede alterarse una secuencia corta de nucleótidos (siempre la misma) o un solo nucleótido. Éste último caso es lo que se denomina “polimorfismo de un único nucleótido” o SNP (del inglés “*single nucleotide polymorphism*”) y se trata de la variación genética más frecuente. La alteración podría ser la sustitución de una base por otra, la inserción de una base nueva o la delección de una base original <sup>18</sup>. La relevancia del SNP será mayor cuando genere un cambio en el aminoácido producido o cuando afecte al procesamiento del ARNm <sup>15</sup>.

**1.2.2.- Desequilibrio de ligamiento:** se produce cuando dos alelos localizados en *loci* cercanos, pero distintos, se transmiten juntos con una frecuencia mayor de la esperada aleatoriamente. Esto hace que el efecto producido por el polimorfismo de un gen se vea alterado por el efecto producido por el otro gen al que va asociado; por ello es importante conocer si dos genes se encuentran en desequilibrio de ligamiento a la hora de sacar conclusiones sobre estudios poblacionales.

### **1.2.3.- Tipos de estudios en genética y enfermedad:**

**Estudios familiares:** sobre todo para enfermedades monogénicas. Se llevan a cabo por medio de árboles genealógicos.

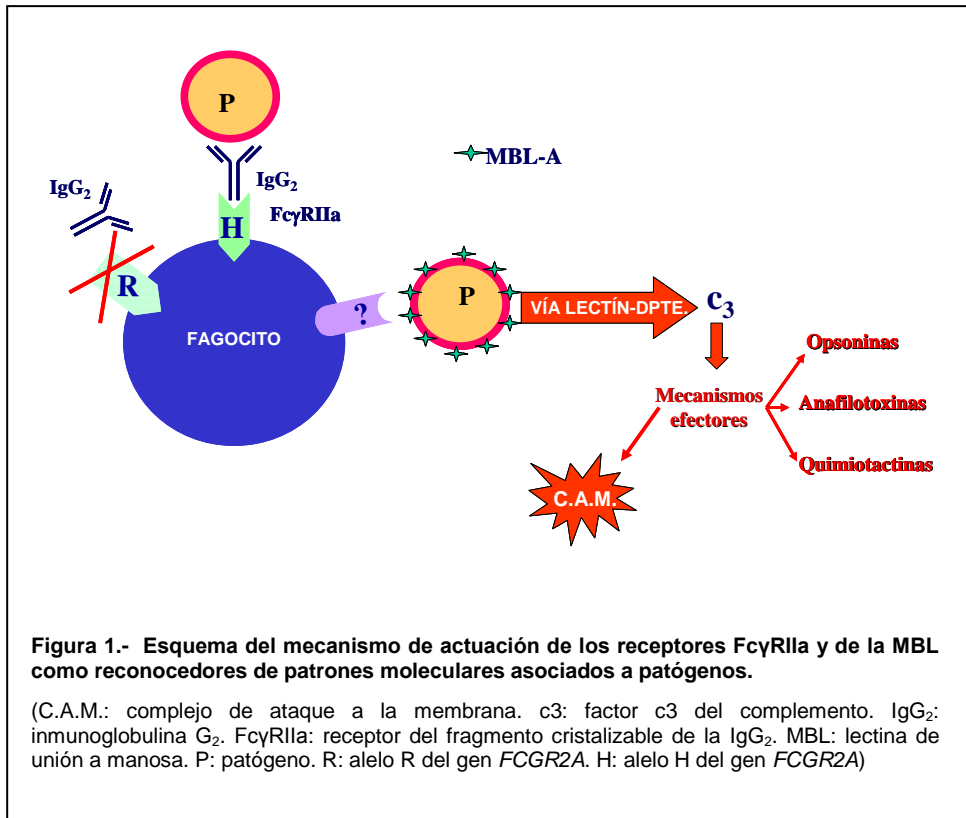
**Estudios de asociación:** para enfermedades poligénicas. Se realizan por medio de estudios casos-control. Es fundamental la uniformidad étnica dentro de cada uno de los dos grupos (casos y controles) y entre ellos; tanto es así que la falta de uniformidad étnica está descrita como uno de los errores que más frecuentemente determina la aparición de falsos positivos <sup>19</sup>.

#### **1.2.4.- Defensa frente a las infecciones: inmunidad innata y adaptativa.**

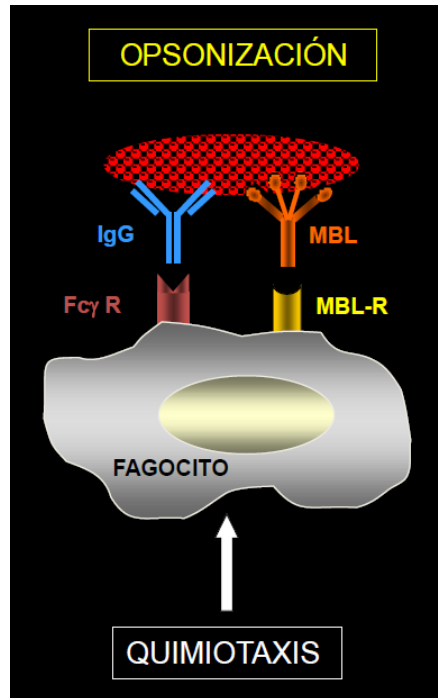
Existe un primer sistema de defensa frente a las infecciones, el sistema de barrera (anatómica y fisiológica), que actúa como una primera línea de contención. Además del anterior, el sistema inmune ofrece un proceso secuencial e integrado de componentes que llamamos “inmunidad innata” e “inmunidad adaptativa”<sup>20</sup>.

**La inmunidad innata** se basa en un limitado número de receptores para detectar patógenos invasores. No tiene “memoria inmunológica” y su respuesta es la misma tras cada exposición. Tiene un componente “celular”, formado por macrófagos, células dendríticas, mastocitos, neutrófilos, eosinófilos y células NK y NKT, y un componente “humoral”, del que forman parte las proteínas del complemento, las proteínas ligadoras del LPS, P”C”R y otras pentraxinas, colectinas como la MBL y otros péptidos antimicrobianos. Su principal característica es la rapidez de actuación: en minutos tras la exposición al patógeno se produce una respuesta inflamatoria protectora. Por otra parte, la inmunidad innata juega un papel fundamental en la activación de la respuesta inmune adaptativa<sup>21 22</sup>. Una parte muy importante de esta línea defensiva son diferentes tipos de proteínas capaces de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos. Entre estas se encuentran:

- La “lectina de unión a manosa” (MBL), que se une a ligandos de la superficie de múltiples microorganismos e induce la activación del complemento (vía lectín-dependiente) y, a su vez, promueve la fagocitosis de los microorganismos a los que se ha unido (figuras 1 y 2).



- Los receptores endocíticos, entre ellos los del fragmento Fc de las inmunoglobulinas (FcR), que promueven la fagocitosis de los microorganismos opsonizados (figuras 1 y 2). Su complejidad ha ido aumentando con la evolución para adaptarse al aumento paralelo de la complejidad de los isotipos de inmunoglobulinas, que son máximas en vertebrados <sup>23</sup>.



**Figura 2.- La inmunoglobulina G y la MBL opsonizan patógenos y promueven su fagocitosis y destrucción por células que dispongan de receptores de superficie para dichos epitopes.**

(IgG: inmunoglobulina G. MBL: lectina de unión a manosa. FcγR: receptores para el fragmento cristalizable de la IgG. MBL-R: receptores para la MBL)

- Los receptores señaladores, como los “receptores tipo Toll” (TLR), que reconocen a diferentes productos microbianos en el medio extracelular: TLR4 al lipopolisacárido (LPS), TLR5 a las flagelinas y TLR1-2 y 6 a las lipoproteínas. Cuando se activan acaban produciendo una expresión de genes proinflamatorios. O los “receptores similares al dominio de oligomerización del nucleótido” (NLR), que reconocen productos primariamente microbianos y productos secundarios al estrés metabólico en el

medio intracelular (peptidoglicanos, flagelinas y alteraciones del flujo de potasio intracelular).

**La inmunidad adaptativa** está formada por una parte “celular”, los linfocitos T y B, y una parte “humoral”, las inmunoglobulinas segregadas por los linfocitos B. Tiene “memoria inmunológica” y su sensibilidad mejora con la exposición repetida al antígeno. Su principal característica es la extrema diversidad, que la hace capaz de reconocer prácticamente cualquier antígeno. Sin embargo, en el reverso de la moneda está su lentitud a la hora de actuar: tras la exposición inicial al patógeno, la expansión clonal antígeno-específica de células B y T necesita al menos 5 días para ser suficientemente eficaz contra dicho patógeno<sup>20</sup>.

### **1.3.- Polimorfismos implicados en la respuesta a la infección.**

#### **1.3.1.- Polimorfismos en el reconocimiento del microorganismo.**

Como comentábamos anteriormente, la inmunidad innata es capaz de reconocer patrones moleculares comunes de la superficie de los patógenos, que se repiten de manera constante en diferentes microorganismos. Esto es lo que se denomina “patrón molecular asociado a patógenos” (PAMP, del inglés *pathogen associated molecular pattern*) y se trata de auténticas dianas para el sistema inmune. Y estos patrones son reconocidos por medio de moléculas generales que interactúan con ellos y que se conocen con el nombre de “receptores reconocedores de patrones” (PRR, del inglés *pattern recognition receptors*)<sup>24 25 17</sup>. (Tabla 1)

Cuando se unen los PAMP y los PRR se activa un sistema de amplificación de señal-respuesta extra e intracelular y se inicia una cascada inflamatoria inespecífica tremendamente eficaz.

**Tabla 1.- Moléculas patrón de reconocimiento y moléculas receptoras.**

PAMP		PRR	
Molécula	Origen	Localización	Molécula
Lipolisacárido	G (-)	Ubicuas	Proteínas humorales: - Complemento - MBL
Endotoxina	G (-)		
Ácido lipoteicoico	G (+)		
Peptidoglucano	G (+)	Fagocitos	Receptores endocíticos: - De la manosa - De las Ig
Zymosán	Levaduras		
Secuencias de ADN con dominios CpG no metilados	Virus	Células epiteliales y presentadoras de antígenos	Receptores señaladores: - TLR - CD14
Manosa			
ARN bicatenario			

(ADN: ácido dexosirribonucleico. ARN: ácido ribonucleico. CD14: glicoproteína de membrana *cluster of differentiation* 14. CpG: dinucleótido citosina-fosfato-guanina. G: tinción de Gram. Ig: inmunoglobulinas. MBL: lectina de unión a manosa. PAMP: patrón molecular asociado a patógenos. PRR: receptores reconocedores de patrones. TLR: receptores similares al Toll o tipo Toll).

También existen análogos endógenos de los PAMP: hay moléculas endógenas que también actúan como iniciadoras de la respuesta inmune, igual que los PAMP. Actúan como señal de alarma de que existe un daño celular (por eso se conocen como “alarminas”) y se trata de moléculas normales pertenecientes a las células que se liberan bien pasivamente (en la necrosis celular) bien activamente (por estrés celular en respuesta a una agresión). Algunas de estas moléculas son el hialuronano, las proteínas del shock térmico (HSPs) o las “proteínas nucleares de alta movilidad box1” (HMGB-1) que son un regulador transcripcional normalmente presente en el núcleo y el citoplasma de las células de los mamíferos <sup>25</sup>. La unión de las alarminas y de los PAMP forma lo que se conoce como DAMPs ó “patrones moleculares asociados a daño o lesión celular”, y no son otra cosa que señales de peligro para la integridad del sistema.

**a) Proteína ligadora del lipolisacárido (LBP).** Junto con la “proteína permeabilizadora bactericida” (BPI), de la que es

genéticamente homóloga, se une a componentes de la pared de las bacterias G (-). La LBP se produce en el hígado y se segrega a la circulación general, mientras que la BPI es producida fundamentalmente por los polimorfonucleares. La LBP facilita la transferencia del lipopolisacárido al CD14, mientras que la BPI actúa directamente sobre la pared bacteriana aumentando su permeabilidad y provocando su destrucción. Aunque la función de ambas moléculas es conocida y su función *in vitro* no presenta dudas, los estudios realizados hasta ahora no permiten afirmar con rotundidad si los polimorfismos implicados están asociados a aumento de riesgo en la sepsis.

- b) **CD14.** Es una proteína de membrana que aparece en la superficie de monocitos, macrófagos y polimorfonucleares. Una de sus funciones es actuar como factor clave en la vía de reconocimiento del lipopolisacárido-endotoxina de los G (-), aunque también puede unirse al peptidoglucano de *Staphylococcus aureus*, al lipoarabinomano de las micobacterias y a otros componentes de pared de *Streptococcus spp* <sup>24</sup>. El gen codificador se encuentra en el cromosoma 5 y está descrito un SNP en la posición -159 de la región promotora del gen (transición citosina-timina): los homocigotos T tienen mayores niveles de CD14 soluble. Hay estudios que asocian este genotipo con riesgo aumentado de mortalidad en pacientes con shock séptico <sup>26</sup> mientras que otros autores han obtenido resultados contrarios <sup>27</sup> o no han conseguido refrendar esos resultados con otros genotipos (SNP -260) <sup>28</sup>.
- c) **TLR.** Se trata de proteínas de superficie de las células humanas implicadas en el reconocimiento de diferentes antígenos de microorganismos. Hasta ahora se han descubierto al menos 11



TLR con distintas afinidades antigénicas. Su activación aumenta la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad y de los genes dependientes de NFκB (IL-1, IL-6, IL-12 y TNFα). De entre todos ellos, TLR2 está implicado en el reconocimiento del peptidoglicano de G (+) y TLR4 en el de la endotoxina <sup>25</sup>. Un SNP del gen TLR2 (*TLR2*-Arg/Gln753) parece estar relacionado con la disminución de la actividad celular en presencia de ligandos lipopeptídicos y dos SNPs del gen TLR4 (*TLR4*-Asp/Gly299 y *TLR4*-Thr/Ile399) se relacionan, en humanos, con respuestas amortiguadas a la inhalación de LPS <sup>29</sup>. TLR5 participa en el reconocimiento de la flagelina y su variabilidad (SNP -392) hace que determinados individuos produzcan proteínas incapaces de reconocer a las flagelinas, con lo que tendrán aumentada la susceptibilidad a infección por *Legionella pneumophila* <sup>30</sup>.

- d) **MBL.** Molécula ubicua, perteneciente al sistema inmune innato, que se une a restos hidrocarbonados de la superficie microbiana. Tras su unión produce la activación del sistema del complemento. Pero, además, puede actuar como opsonina uniéndose a receptores específicos de superficie. Está codificada por un único gen en el cromosoma 10 y tiene tres variantes alélicas estructurales así como otras en la región promotora del gen. Las variantes alélicas deficientes en MBL se asocian a mayor riesgo de desarrollar formas graves y a peor pronóstico en pacientes con NAC <sup>31</sup>; sin embargo, en un reciente estudio de nuestro grupo sobre infección neumocócica no se confirma el aumento de riesgo de enfermedad neumocócica invasiva, aunque un meta-análisis asociado al mismo sí lo respalde <sup>32</sup>.
- e) **FcγR.** Como ya se citó anteriormente, se unen a la región Fc de las inmunoglobulinas. Su unión estimula la fagocitosis y activa el

sistema del complemento y la citotoxicidad celular. Una mutación puntual en el exón 4 del gen **FCGR2A** produce la sustitución de una arginina (R) por una histidina (H) en la posición 131 del dominio de unión del FcγRIIIa. Esta variación hace que los receptores resultantes tengan diferentes afinidades por las distintas subclases de IgG y, así, el FcγRIIIa-H131 es el único FcγR capaz de interactuar de manera eficiente con la IgG<sub>2</sub> (cinco veces más que FcγRIIIa-V131)<sup>33 34 35</sup>. El **SNP FCGR3A-F158V** presenta una sustitución de una timina (T) por una guanina (G) en el nucleótido 559, cuyo resultado es la sustitución de una valina (V) por una fenilalanina (F) en la posición 158 del aminoácido. Los individuos FcγRIIIa-V/V158 presentan una mayor afinidad que los individuos FcγRIIIa-F/F158 por IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> y son capaces de unirse con IgG<sub>4</sub>, lo que resulta en una mayor actividad inducida por IgG de las células NK. El **polimorfismo FCGR3B-NA1/NA2** resulta de la variabilidad del sistema antígeno neutrofílico (NA) y el gen se encuentra situado en el brazo largo del cromosoma 1: las dos isoformas (NA1 y NA2) difieren al menos en cinco nucleótidos, lo cual resulta en la sustitución de cuatro aminoácidos en el dominio membrana-distal *Ig-like* del receptor; esto produce diferencias alélicas en la glicosilación del receptor y, así, el alotipo FcγRIIIb-NA1 es más eficiente que el FcγRIIIb-NA2 a la hora de inducir la fagocitosis de las partículas opsonizadas por IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> y de unirse a inmunocomplejos IgG<sub>3</sub>.<sup>36 37 34 33</sup>. Pero, además, una mutación puntual que produce la sustitución de una citosina (C) por una adenina (A) en la posición 266 produce la sustitución de una alanina por un ácido aspártico en posición 78 en la cadena de aminoácidos: esto genera la variante SH<sup>38</sup>, que muestra una afinidad por IgG<sub>3</sub> similar a la de FcγRIIIb-NA1 y FcγRIIIb-NA2 (y entre siete y nueve veces menor que la de FcγRIIIa)<sup>33</sup>.

### **1.3.2.- Polimorfismos implicados en la respuesta inflamatoria.**

Cuando se unen PAMP y PRR, el factor de transcripción nuclear NFκB se trasloca al núcleo celular. Esto hace que se activen los promotores de genes codificadores de citocinas inflamatorias. Hay que tener en cuenta que la reacción inflamatoria es un componente esencial de los mecanismos de defensa. Pero la respuesta inflamatoria no es algo uniforme: sus características difieren tanto de órgano a órgano, como de órgano a sangre periférica.

**a) TNFα.** Se conocen varios SNP en el locus del TNF (cromosoma 6, adyacentes a los del sistema HLA III). El más estudiado y mejor conocido es el TNFα-308: su alelo A asocia aumentos en la producción de la proteína (transición de guanina por adenina). Pero, dado que este polimorfismo se encuentra en desequilibrio de ligamiento con otros SNP de la región del promotor (muchos de ellos implicados también en la respuesta inflamatoria), esto podría explicar que distintos estudios presenten resultados contrapuestos. Por ejemplo, el alelo A de la linfotóxina alfa (LTA + 250A) casi siempre se asocia con un alelo G de TNFα-308; y el genotipo LTA + 250 AA está asociado a aumento de los niveles de TNF y a un mayor riesgo de shock séptico en pacientes con NAC ingresados en el hospital. Todas estas interrelaciones obligan a hacer estudios con diseños complejos puesto que se deben prever todas las posibles interacciones y, si no, el análisis de los resultados obtenidos será extremadamente complicado (cuando no equívoco).

**b) Interleuquina-1 (IL-1).** Aumenta los niveles plasmáticos del factor de activación plaquetario, de las prostaglandinas y del óxido nítrico, y actúa como un potente proinflamatorio. Es liberada por los macrófagos en las fases más tempranas de la sepsis. Los polimorfismos *IL1β*+3953 y -511 influyen en los

niveles de IL-1 $\beta$ , aunque los estudios de asociación han revelado resultados dispares; sin embargo, queda claro que tienen importancia como proinflamatorios en la sepsis <sup>39</sup>.

- c) **IL-6.** Es el principal inductor de la síntesis hepática de proteínas de fase aguda, C3 y proteína C reactiva (P"CR), fundamentalmente. Durante la sepsis se observan niveles plasmáticos aumentados pero no se ha conseguido correlacionar de manera clara estos niveles con ningún genotipo en particular <sup>40</sup>. En un estudio publicado por nuestro grupo en 2012 se valoró la repercusión clínica de ciertas variantes genéticas de la IL-6 en pacientes con NAC: en el subgrupo de NNAC el genotipo *IL-6-174 GG* se asoció a menor gravedad y a mejor pronóstico <sup>41</sup>.
- d) **Proteínas del shock térmico.** A pesar de que estas proteínas intracelulares tienen como misión principal un papel citoprotector, la HSP70 es capaz de inducir una respuesta proinflamatoria por medio de TLR-2 y TLR-4 por un mecanismo CD14-dependiente. Son potentes proinflamatorios en respuesta al shock térmico, a la endotoxina y a otros mediadores de la sepsis. Hay 3 genes que codifican proteínas de la familia HSP (*HSPA1A*, *HSPA1B* y *HSPA1L*). Los polimorfismos *HSPA1B* +1267 y *LTA* +250 se encuentran en desequilibrio de ligamiento. El análisis de haplotipos sugiere que los cromosomas que tienen una adenina en las posiciones +1267 y +250 respectivamente están asociados con un mayor riesgo de desarrollar shock séptico <sup>42</sup>.

### **1.3.3.- Polimorfismos implicados en la respuesta anti-inflamatoria.**

Los mediadores anti-inflamatorios tienden a predominar en la circulación para intentar prevenir que se inicien nuevos focos inflamatorios; sin embargo, su presencia en los tejidos puede no ser siempre suficiente para prevenir el inicio de una respuesta

proinflamatoria en cascada en distintos compartimentos. Realmente, la respuesta inflamatoria depende de un delicado equilibrio entre factores pro-inflamatorios y factores anti-inflamatorios, que dará como resultado el predominio alternante de ambos estados en el seno de una sepsis. En caso de un predominio claro de las citocinas anti-inflamatorias se podría llegar a una situación de inmunoparálisis ó “síndrome de respuesta anti-inflamatoria compensadora” (CARS), que puede ser tan nocivo como el estado original que se quería solucionar.

- a) **Antagonista del receptor de la IL-1.** Es el oponente fisiológico de la IL-1. El gen de *IL-1RN* tiene una región polimórfica en el intrón 2 con un número variable de repeticiones en tandem. De acuerdo con ello, existen distintos alelos según la frecuencia en que se presentan en la población sana: A1, A2, A3, A4 y A5. También aquí los estudios arrojan resultados contradictorios: parece que *IL-1RNA2* es más frecuente en pacientes con sepsis grave, con mayor producción de IL-1RN, aunque no parece ensombrece el pronóstico de la misma <sup>43</sup>.
- b) **IL-10.** Su función es inhibir la función de los macrófagos e, indirectamente, la actividad de las células B <sup>17</sup>. Su gen en humanos es muy polimórfico: se han descrito dos microsatélites CA y tres SNP (-1082, -819 y -592) <sup>18</sup> lo que define tres haplotipos diferentes. De todas formas, el efecto del haplotipo parece tener relación directa con las características del patógeno. Distintos estudios han presentado resultados discrepantes en cuanto a la asociación de los haplotipos con la mortalidad en la NAC <sup>44 45 46</sup>.
- c) **Receptores del TNF $\alpha$ .** Hay dos receptores del TNF, el TNFR1 y el TNFR2 y lo que hacen es modular la actividad biológica de TNF $\alpha$  y de la LTA. TNFR2 modula señales que promueven la reparación tisular y la angiogénesis e, *in vitro*, participa en la apoptosis, en la activación celular y en la migración de los

neutrófilos. En un estudio publicado en 2004 se encontró que el aumento de los niveles solubles de TNFR1 y TNFR2 se asociaba a disfunción orgánica, pero no se pudo demostrar por el análisis de SNP que la variabilidad influyera en la susceptibilidad ni en el pronóstico de la sepsis <sup>47</sup>.

#### **1.3.4.- Otros polimorfismos de interés.**

- a) **Enzima convertidora de la angiotensina.** El gen de la enzima conversora de la angiotensina (*ACE-DD*) puede sufrir la inserción / deleción de 250 pares de bases y esto se asocia con disminución de niveles de bradicinina y sustancia P. Estos hallazgos están relacionados con disminución del reflejo tusígeno y aumento del riesgo de broncoaspiración <sup>16</sup>. Pero además, en ancianos, el alelo ACE D parece ser un factor de riesgo independiente para el desarrollo de NAC <sup>48</sup>.
- b) **Proteínas del surfactante.** Secretadas por los neumocitos tipo II, se trata de colectinas y se conocen varios polimorfismos de los genes *SP-A*, *SP-B*, *SP-C* y *SP-D*. Su función, en el seno de una infección pulmonar aguda, es la de opsonizar microorganismos, estimular su fagocitosis y modular la inflamación pulmonar. En un estudio de nuestro grupo, publicado en 2011, se evaluó la asociación entre la variabilidad genética en las proteínas del surfactante y la susceptibilidad y pronóstico de la NAC <sup>49</sup> y se halló que varios haplotipos de *SFTPA1*, *SFTPA2* y *SFTPD* se asociaron con mayor susceptibilidad a NAC y con un peor pronóstico. Y en otro más reciente, de 2014, se evaluó la posible relación entre la variabilidad genética de las proteínas del surfactante y la gravedad de la infección por el virus H1N1 <sup>50</sup>. En él se halló una tendencia positiva a que las variantes en *SFTPA2* influyan sobre la severidad de la infección por H1N1 en pacientes hospitalizados: el haplotipo *1A<sup>0</sup>* de *SFTPA2* está asociado con

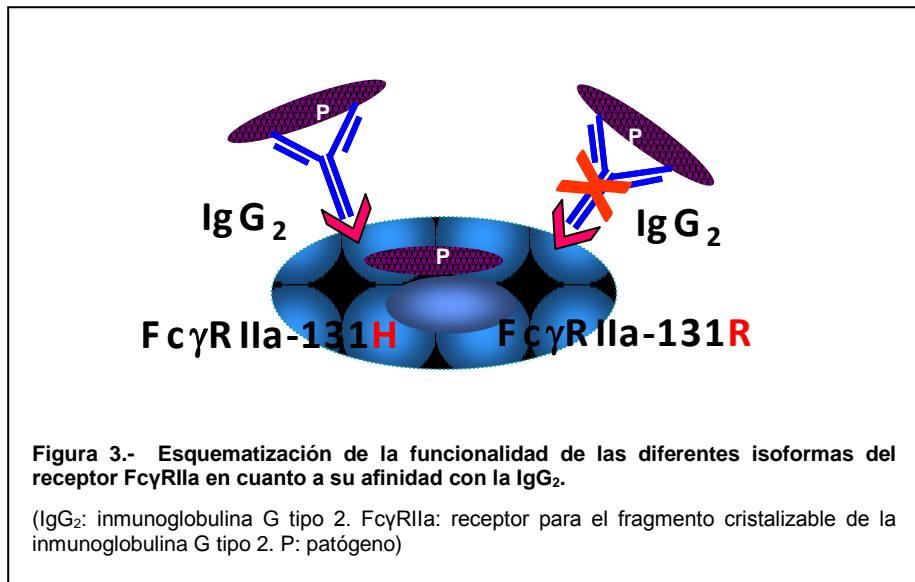
mayor gravedad, mientras que el haplotipo 1A<sup>1</sup> está asociado con un efecto protector contra las formas graves de la infección.

- c) Proteínas de la coagulación.** Es conocida la íntima relación existente entre inflamación y coagulación. De entrada, el factor tisular activa la cascada de la coagulación y estimula la respuesta inflamatoria. El inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1) es el principal inhibidor del sistema fibrinolítico y se ha identificado un polimorfismo altamente prevalente del gen *PAI-1* que conlleva un estado de hipercoagulabilidad por aumento de sus niveles en suero <sup>51</sup>. Pero, además, existe mayor susceptibilidad a la NAC en pacientes cuyos genotipos del *PAI-1* están asociados a un aumento en sus niveles circulantes <sup>52</sup> y existe un mayor riesgo de desarrollar shock séptico y disfunción multiorgánica en pacientes con NAC portadores del alelo 4G <sup>53</sup>.

#### **1.4.- Justificación del estudio del gen FCGR2A en la NAC.**

En los leucocitos, los receptores del fragmento cristalizante (Fc) de la inmunoglobulina G (IgG) (denominados FcγR) confieren funciones efectoras a dicha IgG, como son la fagocitosis, producción de superóxidos, citotoxicidad, producción de citoquinas, presentación de antígenos y regulación de la producción de anticuerpos <sup>34</sup>. Entre las diferentes subclases de IgG, IgG<sub>2</sub> es la que más específicamente se une a las bacterias encapsuladas y, en cuanto a IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub>, son las más proinflamatorias. Sin embargo, en lo que se refiere a la afinidad por los receptores a los que se unen, FcγRIIa (que, *per se*, es un receptor de baja afinidad) se une con mayor afinidad a IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> (cinco veces más a IgG<sub>1</sub> que a IgG<sub>3</sub>) y con menos afinidad a IgG<sub>2</sub> e IgG<sub>4</sub> (aproximadamente el doble a IgG<sub>2</sub> que a IgG<sub>4</sub>); y la afinidad a IgG<sub>1</sub> es 10 veces mayor que a IgG<sub>2</sub> y 20 veces mayor que a IgG<sub>4</sub> <sup>33</sup>.

El FcγRIIa se expresa en células fagocíticas<sup>29</sup> y en plaquetas, pero no en células *natural killer* (NK) ni en mastocitos. En lo referente al **SNP FCGR2A-H131R**, el FcγRIIa-H131 es el único FcγR capaz de interaccionar de manera eficiente con la IgG<sub>2</sub><sup>34 35</sup> (figura 3). De hecho, los pacientes con el genotipo FcγRIIa-H131 son menos susceptibles a la enfermedad meningocócica grave<sup>54</sup>.



Los polimorfismos del receptor FcγRIIa han sido asociados con enfermedades infecciosas, inflamatorias y autoinmunes. Lupus eritematoso sistémico (LES), arteritis de células gigantes, enfermedad de Kawasaki, enfermedad arterial coronaria, anemia de células falciformes, malaria, infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, infección por el virus de Epstein-Barr o meningococemia fulminante en niños son ejemplos del gran abanico de enfermedades en las que estos receptores juegan algún papel.



Otros receptores de membrana para el fragmento Fc de la IgG con algún papel en la forma en que el organismo responde frente a una infección son el FcγRIIIa y el FcγRIIIb.

El receptor FcγRIIIa se expresa en macrófagos, monocitos, células NK y células T, y presenta una afinidad intermedia por la IgG monomérica: mayor afinidad por la IgG<sub>3</sub> (aunque cinco veces menor que la de FcγRIIa) y menor por la IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>4</sub><sup>33</sup>. Este receptor ha sido relacionado con el LES y la artritis reumatoide y sus diferentes polimorfismos se han visto relacionados con infecciones periodontales de repetición y complicaciones infecciosas bacteriémicas en trasplantados hepáticos<sup>55</sup>.

El receptor FcγRIIIb se expresa en neutrófilos y puede ser inducido en eosinófilos por el interferón (IFN) γ. Su mayor afinidad es hacia la IgG<sub>3</sub>, y es similar a la de FcγRIIa; sin embargo es ocho veces menor que la de FcγRIIIa. Este receptor ha sido relacionado con la granulomatosis de Wegener, vasculitis sistémica y LES (este último en población japonesa) y, en relación con FcγRIIa, se puso en evidencia su posible influencia sobre la susceptibilidad a la enfermedad meningocócica (aunque posteriormente no ha podido ser ratificada).

Tanto FcγRIIa como FcγRIIIa y FcγRIIIb son receptores con función activadora intracelular.

El estudio de la relación existente entre el receptor FcγRIIa y la destrucción de bacterias encapsuladas resulta extremadamente atractivo, sobre todo por la implicación de estas últimas en la patogénesis de la NAC. En el presente estudio hemos querido investigar la relevancia que tienen las variantes genéticas del gen *FCGR2A* en la manera de enfermar de los pacientes con NAC: tanto en la susceptibilidad de los individuos a desarrollarla, como en la gravedad que presentan los individuos ya enfermos. La importancia funcional de este polimorfismo está avalada por experimentos que demuestran que los neutrófilos de los sujetos homocigotos para el alelo *FCGR2A*-R131 presentan una capacidad significativamente menor para opsonizar a las bacterias encapsuladas (neumococo, estreptococo del grupo B, neisseria y estafilococo) si los

comparamos con los polimorfonucleares de los sujetos homocigotos para el alelo *FCGR2A*-H131<sup>34</sup>. Y, en un estudio publicado en 2008, Yuan *et al* observaron que el genotipo *FCGR2A*-R/R131 estaba asociado con el desarrollo de enfermedad invasora por *S. pneumoniae* en pacientes pediátricos<sup>29</sup>. Basado en estos datos, se ha sugerido que el SNP *FCGR2A*-H131R podría jugar un papel importante en la susceptibilidad a la infección por *S. pneumoniae* y otras bacterias encapsuladas. Sin embargo, esta hipótesis sólo se ha analizado en estudios que han incluido escaso número de pacientes y los resultados obtenidos han sido, cuando menos, controvertidos<sup>56 57</sup>. Así pues, existe plausibilidad biológica, existen estudios funcionales convincentes y está poco estudiado en pacientes con NAC.

## **2.- HIPÓTESIS.**



## **2.- HIPÓTESIS.**

Dado que:

1. La variante FcγRIIa-H131 es el único FcγR capaz de interaccionar de manera eficiente con la IgG<sub>2</sub>.
2. Los neutrófilos de los sujetos homocigotos para el alelo *FCGR2A*-R131 presentan una capacidad significativamente menor para opsonizar a las bacterias encapsuladas que los polimorfonucleares de los sujetos homocigotos para el alelo *FCGR2A*-H131.

Se plantean las siguientes hipótesis de trabajo:

1. El genotipo *FCGR2A*-R/R se asocia a una mayor susceptibilidad a la NAC.
2. El genotipo *FCGR2A*-R/R se asocia a un peor pronóstico en pacientes con NAC.
3. El genotipo *FCGR2A*-R/R se asocia a una mayor predisposición a bacteriemia en pacientes con NAC.

Además, estas mismas hipótesis se asumirán en aquellos pacientes con infección demostrada por *S. pneumoniae*.



### **3.- OBJETIVOS.**





### **3.- OBJETIVOS.**

En el presente estudio evaluamos la potencial asociación del SNP *FCGR2A*-H131R con la gravedad y mortalidad de la NAC y con la susceptibilidad a la misma, particularmente en la NAC neumocócica (NNAC), en un amplio grupo de pacientes adultos. Para ello, se establecen los siguientes objetivos:

1. Para la hipótesis 1.

Establecer y comparar las frecuencias génicas y genotípicas del gen *FCGR2A* en el grupo de pacientes con NAC y en el grupo de controles.

- a. Para poder excluir un potencial efecto de confusión debido al desequilibrio de ligamiento entre el SNP *FCGR2A*-H131R y otros SNP funcionalmente relevantes de los genes *FCGR3A* y *FCGR3B*, se medirá el grado de desequilibrio de ligamiento entre estas variantes en controles sanos de nuestra población.
- b. Además, se establecerán las frecuencias alélicas y genotípicas de los genes *FCGR3A* y *FCGR3B* en subgrupos de las poblaciones de pacientes y controles, para comprobar que no haya influencia en los resultados. Los subgrupos tendrán una distribución similar a la población total, categorizados por hospital de origen.

2. Para la hipótesis 2.

Establecer y comparar las frecuencias génicas y genotípicas del gen *FCGR2A*:

- a. En el grupo de pacientes con NAC clasificados como graves.
- b. En el grupo de pacientes con NAC clasificados como “no graves”.

3. Para la hipótesis 3.

Establecer y comparar las frecuencias génicas y genotípicas del gen *FCGR2A*:

- a. En el grupo de pacientes con NAC que presentan bacteriemia.
- b. En el grupo de pacientes con NAC que no presentan bacteriemia.

Además, estos mismos objetivos se asumirán en aquellos pacientes con infección demostrada por *S. pneumoniae*.

## **4.- MATERIAL Y MÉTODOS.**

- 1. Tipo de estudio.**
- 2. Población.**
- 3. Definiciones.**
- 4. Recogida de datos.**
- 5. Estudio genético.**
- 6. Aspectos éticos.**
- 7. Tamaño muestral.**
- 8. Análisis estadístico.**



## **4.- MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **4.1.- Tipo de estudio.**

Estudio multicéntrico, prospectivo y observacional. En el presente estudio se han incluido pacientes hospitalizados por NAC entre mayo de 2003 y mayo de 2009 en cuatro hospitales de España: Hospital Universitario Dr. Negrín, de Las Palmas de Gran Canaria; Hospital Universitario de La Princesa, de Madrid; Hospital Clínico Universitario, de Valencia; y Hospital General San Jorge, de Huesca.

### **4.2.- Población.**

#### **4.2.1.- Casos.**

##### **a) Criterios de inclusión.**

Se incluyeron pacientes adultos que ingresaron en los cuatro hospitales participantes en el proyecto, con el diagnóstico de NAC. Este diagnóstico se estableció en presencia de síntomas y signos de infección de vías aéreas inferiores, junto con la aparición de un infiltrado radiológico nuevo y sin otros diagnósticos alternativos durante el seguimiento. Como requisito indispensable para el diagnóstico de NAC los pacientes no podían haber sido hospitalizados, al menos, en los diez días previos al episodio actual. Con el fin de homogeneizar el estudio, únicamente se incluyeron pacientes españoles de origen caucásico.

##### **b) Criterios de exclusión.**

Se excluyeron los pacientes con inmunodepresión grave, tales como inmunodeficiencias primarias, neutropenia significativa ( $<1,0 \times 10^9/L$ ), o infectados por VIH, trasplantados de médula ósea o de órgano sólido, o tratados con esteroides sistémicos a dosis superiores a 20 mg de prednisona o su equivalente al día durante dos semanas o más. También se excluyeron los pacientes con NAC

como evento terminal de una enfermedad crónica y progresiva, los pacientes con tuberculosis y los pacientes con neumonía obstructiva por neoplasia. Fueron excluidos los pacientes extranjeros, los pacientes españoles no caucásicos y los pacientes españoles cuyos antecesores fueran extranjeros.

#### **4.2.2.- Controles.**

Procedentes de los cuatro hospitales participantes y con las mismas características étnicas que los pacientes con NAC (únicamente se incluyeron para el análisis controles españoles de origen caucásico) y reclutados a partir de dos grupos seleccionados:

- a) **Controles sanos de la población general.** Constituido por voluntarios sanos no emparentados genéticamente, captados entre donantes de sangre y/o de médula ósea.
- b) **Controles pacientes.** Formado por pacientes sin historia previa relevante de infecciones respiratorias, no relacionados genéticamente.

### **4.3.- Definiciones.**

#### **4.3.1.- Etiología de la neumonía:**

- a) **De presunción:** cuando en una muestra de esputo válida se observó una bacteria predominante.
- b) **Definitiva:**
  - cuando se obtuvo un hemocultivo positivo para cualquier bacteria u hongo patógenos sin otro foco aparente;
  - cuando se recuperó un patógeno de muestras obtenidas con punción transtorácica o en líquido pleural;
  - cuando se produjo una seroconversión con aumento de, al menos, cuatro veces el título inicial de IgG para *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila psittaci*,

*Legionella pneumophila*, *Coxiella burnetii* y virus respiratorios;

- cuando se obtuvo un título inicial de IgM > 1:32 para *Chlamydophila pneumoniae*, 1:80 para *Coxiella burnetii*, y cualquier título para *Mycoplasma pneumoniae*;
- cuando se obtuvo un antígeno urinario positivo para *Legionella pneumophila* o para *S. pneumoniae*;
- cuando se obtuvieron recuentos >  $10^3$  unidades formadoras de colonias (ufc)/mL en muestras de catéter telescópado o biopsia pulmonar y >  $10^4$  ufc/mL en lavado broncoalveolar.

**4.3.2.- Neumonía neumocócica no bacteriémica (NNAC-NB):** su diagnóstico se basó en los resultados negativos de los hemocultivos **antes** de recibir tratamiento antibiótico en el hospital y al menos uno de los siguientes criterios:

- a) claro predominio de cocos lanceolados grampositivos agrupados en cadenas o en parejas, sin otros microorganismos en muestras de esputo o aspirados traqueobronquiales; dichos especímenes debían contener >20 neutrófilos y <10 células epiteliales escamosas por campo de bajo aumento;
- b) crecimiento significativo de *S. pneumoniae* en el cultivo, sin otros patógenos probables;
- c) líquido pleural con crecimiento de *S. pneumoniae*;
- d) antígeno urinario positivo para *S. pneumoniae*;
- e) crecimiento bacteriano de >  $10^3$  ufc/mL de *S. pneumoniae* en especímenes de catéter telescópado o biopsia pulmonar, y/o >  $10^4$  ufc/mL en lavado broncoalveolar.

**4.3.3.- Neumonía neumocócica bacteriémica (NNAC-B):** se definirá cuando haya, **al menos**, un hemocultivo positivo para *S. pneumoniae*.

**4.3.4.- NAC grave:** se establecerá su diagnóstico cuando el paciente con NAC cumpla **al menos tres** de los siguientes criterios menores de la ATS/IDSA <sup>7</sup>:

- a) frecuencia respiratoria  $\geq 30$  x';
- b) insuficiencia respiratoria grave ( $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 250$ );
- c) afectación radiográfica multilobar en la radiografía de tórax;
- d) confusión/desorientación;
- e) uremia ( $\text{BUN} \geq 20$  mg/dL o urea  $\geq 42.9$  mg/dL);
- f) leucopenia ( $< 4000$  células/ $\mu\text{L}$ );
- g) trombopenia ( $< 100000$  células/ $\mu\text{L}$ );
- h) hipotermia ( $T^a$  central  $< 36^\circ\text{C}$ );
- i) hipotensión que requiera resucitación agresiva con flúidos intravenosos.

**O, al menos, uno** de los siguientes criterios mayores:

- a) necesidad de ventilación mecánica;
- b) shock séptico con necesidad de drogas vasoactivas durante más de 4 horas.

Dado que se trata de un estudio prospectivo iniciado en 2002, en un principio se siguieron los criterios publicados por la ATS en 2001 <sup>58</sup>, entre los que también se encontraban los siguientes, como criterios mayores:

- a) incremento  $> 50\%$  del tamaño de los infiltrados radiológicos sin respuesta clínica en las últimas 48 horas;
- b) creatinina sérica  $\geq 2$  mg/dL o incremento de  $> 0.5$  mg/dL en un paciente con enfermedad renal previa o fracaso renal agudo con necesidad de diálisis.



Además, los pacientes fueron clasificados en función de su gravedad (**sepsis, sepsis grave, shock séptico, síndrome de distrés respiratorio agudo, fracaso multiorgánico** o muerte con cualquiera de estos diagnósticos) de acuerdo con las definiciones aceptadas internacionalmente<sup>59 60 61</sup>.

**4.3.5.- Sepsis:** cualquier infección documentada ó sospechada con uno ó más de los siguientes criterios:

- a) Fiebre ó hipotermia ( $T^a$  central  $> 38.3^{\circ}\text{C}$  ó  $< 36^{\circ}\text{C}$ )
- b) Taquicardia ( $\text{FC} > 90 \text{ x'}$ )
- c) Taquipnea ( $\text{FR} > 30 \text{ x'}$ )
- d) Alteración de la consciencia
- e) Edema ó balance hídrico (+)  $> 20 \text{ mL/kg}$  en 24h
- f) Hiperglucemia en ausencia de diabetes (glucosa plasmática  $> 120 \text{ mg/dL}$ )
- g) Leucocitosis ó leucopenia ( $> 12.000/\text{mm}^3$  ó  $< 4.000/\text{mm}^3$ ) ó recuento normal con  $> 10\%$  de formas inmaduras
- h) Niveles plasmáticos altos de P"CR ó Procalcitonina

**4.3.6.- Sepsis grave:** episodio de sepsis acompañado de disfunción orgánica, hipoperfusión ó hipotensión atribuible a la sepsis:

- a) Hipoxemia, con  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 300 \text{ mmHg}$
- b) Oliguria aguda (diuresis  $< 0.5 \text{ mL/kg/h}$  durante al menos 2 horas, a pesar de una adecuada resucitación con fluidos)
- c) Creatinina: incremento  $> 0.5 \text{ mg/dL}$  ó valor absoluto  $> 2 \text{ mg/dL}$
- d) Transtornos de la coagulación ( $\text{INR} > 1.5$  ó  $\text{TTPa} > 60 \text{ seg}$ )
- e) Trombocitopenia  $< 100.000/\text{mm}^3$

- f) Hiperbilirrubinemia (bilirrubina > 4'0 mg/dL)
- g) Hiperlactacidemia (lactato > 3 mmol/L ó > 27 mg/dL)
- h) Hipotensión arterial (PAS < 90 mmHg, PAM < 70 mmHg ó descenso de la PAS > 40 mmHg)
- i)  $SvO_2 > 70\%$  ó índice cardiaco > 3'5 L/min/m<sup>2</sup>

**4.3.7.- Shock séptico:** hipotensión arterial persistente que no pueda ser explicada por otras causas diferentes a la sepsis y que no se recupera a pesar de la adecuada resucitación con volumen.

**4.3.8.- Síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA):** se estableció su diagnóstico de acuerdo con las definiciones aceptadas internacionalmente <sup>62</sup>, cuyos criterios clásicos son:

- a) Fallo respiratorio
- b) Presentación aguda (< 72 h)
- c) Infiltrados radiológicos bilaterales
- d)  $PaO_2/FiO_2 < 200$  mmHg
- e) Ausencia de presiones de corazón izquierdo elevadas [PEP < 18 mmHg ó sin signos clínicos de hipertensión de aurícula izquierda (AI)]

**4.3.9.- Insuficiencia respiratoria aguda (IRpA):**

- a) Definición conceptual: fracaso del aparato respiratorio en su función de intercambio de gases, necesaria para atender la actividad metabólica del organismo.
- b) Definición gasométrica: cuando la  $PaO_2$  es menor de 60 mmHg y/ó la  $PaCO_2$  es mayor de 45-50 (dependiendo de si se trata de individuos sin o con insuficiencia respiratoria crónica).

c) Agudeza / cronicidad: se define por la anamnesis (si se conoce perfectamente su cronología) ó valorando la existencia de mecanismos de compensación en la crónica:

- aumento de la ventilación/minuto,
- policitemia y aumento de la cantidad de hemoglobina,
- disminución de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno a causa de un aumento del 2,3 difosfoglicerato y
- vasoconstricción pulmonar.

**4.3.10.- Insuficiencia/fracaso renal agudo (FRnA)** fue definido como una producción de orina menor de 20 mL/h durante dos horas consecutivas y/ó unos niveles de creatinina mayores ó iguales a 2 mg/dL en pacientes con función renal previamente normal o un aumento de dichos niveles > 0.5 mg/dL en pacientes con enfermedad renal crónica.

#### **4.4.- Recogida de datos.**

Los **datos demográficos, clínicos y de laboratorio** de pacientes y controles fueron recogidos, además de por el doctorando, por otros investigadores asociados. Se realizó entrevista directa con el paciente (o con su familiar, en caso de imposibilidad manifiesta) y revisión de la historia clínica en dos tiempos: durante su ingreso hospitalario y al cabo de, al menos, 100 días de su alta. Para su registro se utilizó una hoja de recogida de datos previamente diseñada a tal efecto. Se estableció la presencia o ausencia de los siguientes factores: lugar de residencia (asilo, domicilio o sin techo), tabaquismo (paquetes/año), consumo de alcohol (g/día) u otras drogas, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma, bronquiectasias, enfermedad cardiovascular, diabetes mellitus, enfermedad renal o hepática crónica, enfermedad neurológica, sospecha de aspiración, disfunciones deglutorias, uso previo de betalactámicos, uso de

glucocorticoides u otras drogas inmunosupresoras, infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, enfermedad inmune, esplenectomía, neumonía o infecciones respiratorias previas, y hospitalizaciones en los últimos tres meses anteriores.

También se registraron las **complicaciones** que aparecieron en los siguientes 30 días de la presentación de la NAC. En ellas se incluyeron: cualquier empeoramiento de las enfermedades de base del paciente y/o la presencia de shock (presión arterial sistólica < 90 mmHg no corregida por líquidos intravenosos, o que requiriera medicación vasopresora); coagulación intravascular diseminada; insuficiencia renal (creatinina sérica >1,5 mg/dL y/o urea >40 mg/dL en pacientes con función renal previa normal); insuficiencia respiratoria ( $PaO_2/FiO_2$  < 300 mmHg, o < 200 mmHg cuando se tratase de pacientes con EPOC); y metástasis sépticas (meningitis, empiema, artritis séptica, endocarditis, pericarditis purulenta, otitis). También se registró la necesidad de traslado del paciente a la UMI, ventilación mecánica y mortalidad a los 30 días de la presentación, duración del tratamiento antibiótico (oral e intravenoso), su adecuación a las recomendaciones SEPAR y la duración de la estancia hospitalaria.

La **gravedad** de la NAC fue evaluada por medio del índice de gravedad de la neumonía ó *pneumonia severity index* (PSI) y se midió usando la escala de Fine <sup>63</sup>. En los pacientes que requirieron ingreso en la unidad de medicina intensiva (UMI), y sólo en ellos, la gravedad del proceso fue evaluada por medio del *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE) II Score*, tomando el peor valor obtenido en las primeras veinticuatro horas en la UMI.

La detección del antígeno de *S. pneumoniae* en orina se realizó utilizando un test de inmunocromatografía comercial (*Binax NOW, Inverness Medical, Scarborough, ME*). Se obtuvieron cultivos de sangre de todos los pacientes ingresados.

## **4.5.- Estudio genético.**

### **4.5.1.- Determinaciones genéticas.**

Todas las determinaciones de laboratorio, tanto el procesamiento de las muestras biológicas como la extracción de ADN y el tipaje de los genes *FCGR2A*, *FCGR3A* y *FCGR3B*, se realizaron en la Unidad de Inmunología del Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín, de Las Palmas de Gran Canaria.

### **4.5.2.- Extracción del ADN genómico.**

De cada individuo a estudio se obtuvo una muestra de entre 5 y 10 mL de sangre venosa anticoagulada en un tubo con EDTA. Ésta se procesó de acuerdo con el protocolo estándar de extracción por fenol-cloroformo, modificado de Blin y Stafford (1976)<sup>64</sup>, que se describe a continuación:

- a) Aislamiento y lavado de las células blancas:
  - 1. a la sangre total de cada individuo se le añadió tampón de lisis de células rojas hasta un volumen de 50 mL.
  - 2. se centrifugó a 600 xg durante 10 minutos.
  - 3. se decantó el sobrenadante.
  - 4. se repitió el lavado dos veces más.
- b) Lisis de las células blancas y obtención de la fase acuosa:
  - 1. se resuspendió el precipitado resultante del proceso anterior en 4 mL de solución de lisis.
  - 2. se incubó en agitación a 42°C hasta el día siguiente.
  - 3. tras ese tiempo, se añadieron 4 mL de fenol/cloroformo/isoamílico y se puso en agitación a temperatura ambiente durante 10 minutos.
  - 4. la muestra se centrifugó a 1700 xg durante 10 minutos
  - 5. la fase superior resultante (acuosa) se pasó a otro tubo y se repitió el proceso; la fase inferior (orgánica) se desechó.

- c) Obtención del precipitado:
  - 1. se añadieron 4 mL de cloroformo/isoamílico a la fase superior obtenida y se puso en agitación a temperatura ambiente durante 7 minutos.
  - 2. se centrifugó a 1200 xg durante 5 minutos.
  - 3. se volvió a rescatar la fase superior acuosa y se repitió el proceso.
  - 4. se añadieron 300 µL de NaCl 3M y 4 mL de isopropanol, mezclando todo suavemente (por inversión) hasta la aparición del precipitado.
  - 5. el precipitado se extrajo a otro tubo y se lavó durante 30 minutos en etanol frío al 70%.
  - 6. tras lo anterior, se dejó secar a temperatura ambiente hasta el día siguiente.
- d) Finalización del procedimiento:
  - 1. al precipitado ya seco se le añadieron 500 µL de tris-EDTA (TE) 1/0.1 y se puso a rotar en un agitador orbital en días sucesivos hasta su resuspensión.
  - 2. se realizó espectrofotometría a los ADN así resuspendidos para medir tanto su concentración como su pureza.
  - 3. se ajustó la concentración de ADN a 100 µg/mL añadiendo el TE 1/0.1 necesario.

#### **4.5.3.- Genotipado.**

Los genotipados fueron realizados utilizando pequeñas modificaciones de procedimientos descritos con anterioridad: para *FCGR2A-H131R* (rs1801274)<sup>65 66</sup>, *FCGR3A-V158F* (rs396991), *FCGR3B-NA1/NA2* (rs200688856) y *FCGR3B-SH* (rs5030738)<sup>66 67 38</sup>.

- a) **Tipaje del gen *FCGR2A*.** (La precisión del método de genotipado para el *FCGR2A* fue confirmada mediante secuenciación directa).

**1. Amplificado (reacción en cadena de la polimerasa o PCR).**

- I. **Primers:** (Los *primers* se resuspenden en 500 µL y se ajustan a 10 µM)

- 5'-GGAAAATCCCAGAAATTCTCGC-3'
- 5'-CAACAGCCTGACTACCTATTACGCGG-3'

II. **Condiciones:**

- *Buffer* (10x): 2.5 µL
- MgCl<sub>2</sub>: 1.5 µL
- dNTPmix (de 2.5 mM): 2 µL
- *Primer* directo (10 µg/mL): 1 µL
- *Primer* reverso (10 µg/mL): 1 µL
- AmpliTaq polimerasa Perkin Elmer (5 U/µL): 0.17 µL
- H<sub>2</sub>O: 14.83 µL
- Volumen total: 23 µL de mix + 2 µL ADN (100 µL/mL)

- III. **Programa del termociclador** (Termociclador PTC-100-3, de MJ Research):  
(ver en la página siguiente)

TEMPERATURA (°C)	TIEMPO
95	5 min.
TEMPERATURA (°C)	TIEMPO
<b>35 ciclos</b>	
94	14 seg.
57	30 seg.
72	40 seg.
TEMPERATURA (°C)	TIEMPO
72	10 min.
TEMPERATURA (°C)	TIEMPO
4	30 min.

#### IV. **Visualización.**

Se corren 8 µL de amplificado en gel de agarosa al 2%; el cual se tiñe con bromuro de etidio (0.005%) y se visualiza en un transiluminador de luz UV:

- Producto de amplificado de 331 pares de bases (pb).

#### 2. **Digestión (análisis de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción o RFLP).**

##### I. **Condiciones de corte:**

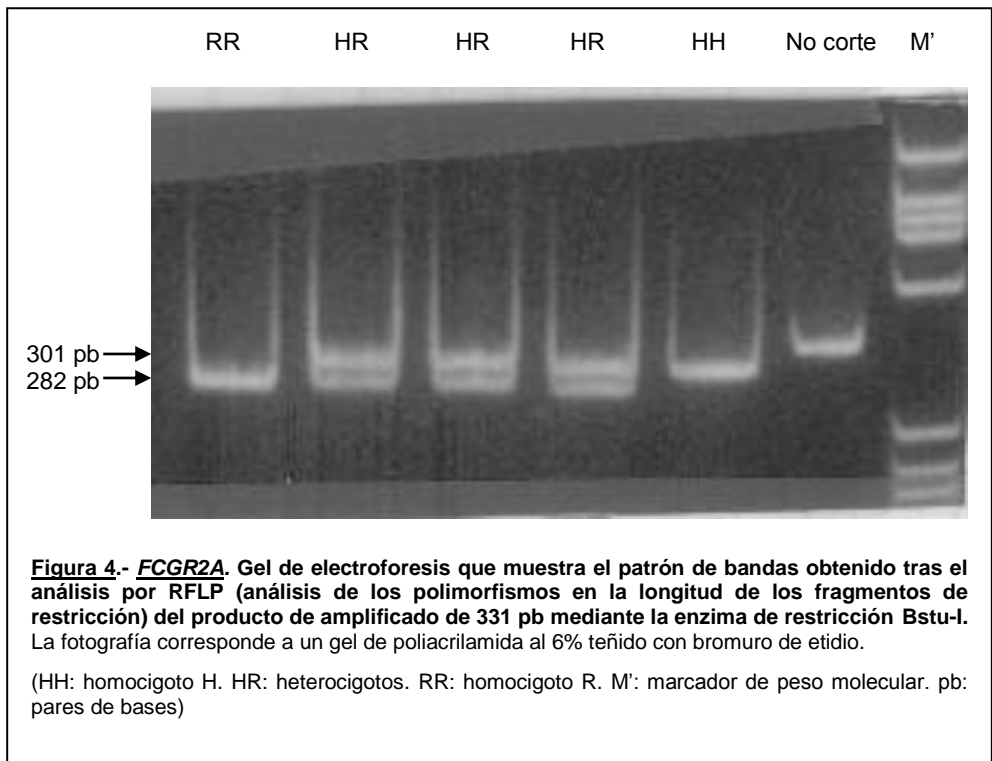
- Enzima de restricción: BstU-I (New England BioLabs)
- Temperatura: 65°C
- Tiempo: 120 min.
- H<sub>2</sub>O: 4 µL
- *Buffer* (10x): 2 µL
- BstU I: 4 µL
- Amplificado: 8 µL
- Volumen total: 10 µL mix + 8 µL amplificado



## II. Visualización.

El total del producto de corte se corre en gel de poliacrilamida al 6%, el cual se tiñe con bromuro de etidio (0.005%); las bandas se visualizan en un transiluminador de luz UV:

- Corte con Bst<sup>u</sup>-I alelo R: 282 pb
- No corte con Bst<sup>u</sup>-I alelo H: 301 pb



### b) Tipaje del gen *FCGR3A*.

1. **Primers:** (Los *primers* se resuspenden en 500 µL y se ajustan a 10 µM)
  - *FCGR3A-F3R*: 5'-GCGGGCAGGGCGGCGGGGGC  
GGGGCCGGTGATGTTACAGTCTCTGATCACAC  
ATTTTACTCCCATA-3'

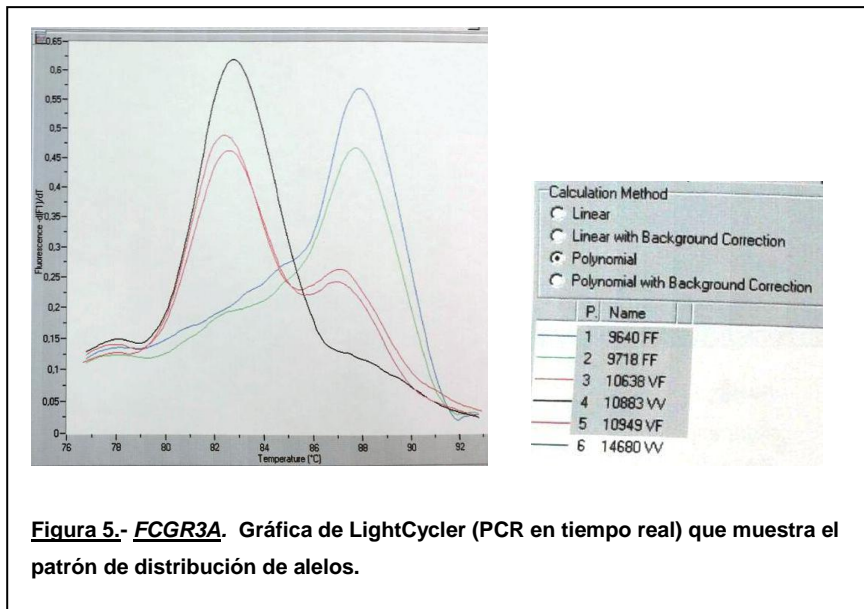
- FCGR3AF: 5'-TCCAAAAGCCACACTCAAAGTC-3'
- FCGR3A-V3R: 5'-AGACACATTTTACTCCCATC-3'

2. **Condiciones:**

- *Primer-AF* (10  $\mu$ M): 1.5  $\mu$ L
- *Primer-F3R* (10  $\mu$ M): 1.65  $\mu$ L
- *Primer-V3R* (10  $\mu$ M): 0.9  $\mu$ L
- Mix SYBR GREEN: 1.0  $\mu$ L (10  $\mu$ L del tubo 1a en el 1b)
- $Cl_2$  Mg (25 mM): 0.8  $\mu$ L
- $H_2O$ : 2.15  $\mu$ L
- Volumen total: 8  $\mu$ L + 2  $\mu$ L ADN.

3. **Programa del termociclador** (Roche LigthCycler):

DESNATURALIZACION (1 CICLO)		
TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	°C
95	00:05:00	20
AMPLIFICACIÓN (35 CICLOS)		
TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	°C
95	20 seg.	20
57	20 seg.	20 (SINGLE)
72	30 seg.	5
MELTING (MELTING CURVES) (1 CICLOS)		
TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	°C
72	0	20
99	0	0.05 (STEP)
ENFRIAMIENTO (1 CICLO)		
TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	°C
40	30 seg.	20



**Figura 5.- FCGR3A.** Gráfica de LightCycler (PCR en tiempo real) que muestra el patrón de distribución de alelos.

c) Tipaje del gen *FCGR3B* (PCR).

▪ **Primers:**

- FCGR3BNA1D: 5'-CTCAATGGTACAGGGTGCTC-3' (NA1D)
- FCGR3BNA1R: 5'-GGCCTGGCTTGAGATGAGGT-3' (NA1R)
- FCGR3BNA2D: 5'-CTCAATGGTACAGCGTGCTI-3' (NA2D)
- FCGR3BNA2R: 5'-CACCTGTACTCTCCACTGTCTI-3' (NA2R)
- HGH1D: 5'-GCCTTCCCAACCATTCCCTTA-3'
- HGH2R: 5'-CTCACGGATTTCTGTTGTGTTTC-3'
- FCGR3BSHD: 5'-AAGATCTCCCAAAGGCTGTG-3' (SHD)
- FCGR3BSHR: 5'-ACTGTCGTTGACTGTGTCAI-3' (SHR)

# 1. NA1/NA2:

## I. **Condiciones** (en 2 pocillos distintos, uno para NA1 y otro para NA2):

- H<sub>2</sub>O: 14.65 µL
- Buffer (10x): 2.5 µL (1x)
- dNTP mix: 2 µL (0.2 mM)
- MgCl<sub>2</sub>: 1.5 µL (1.5 mM)
- NA1D/NA2D: 0.8 µL (0.32 µM)
- NA1R/NA2R: 0.8 µL (0.32 µM)
- HGH1D: 0.8 µL (0.32 µM)
- HGH2R: 0.8 µL (0.32 µM)
- AmpliTaq polimerasa Perkin Elmer: 0.15 µL (0.75 U)
- Volumen total: 24 µL + 1 µL ADN (a 100 µg /mL)

## II. **Programa del termociclador** (Perkin-Elmer 9600):

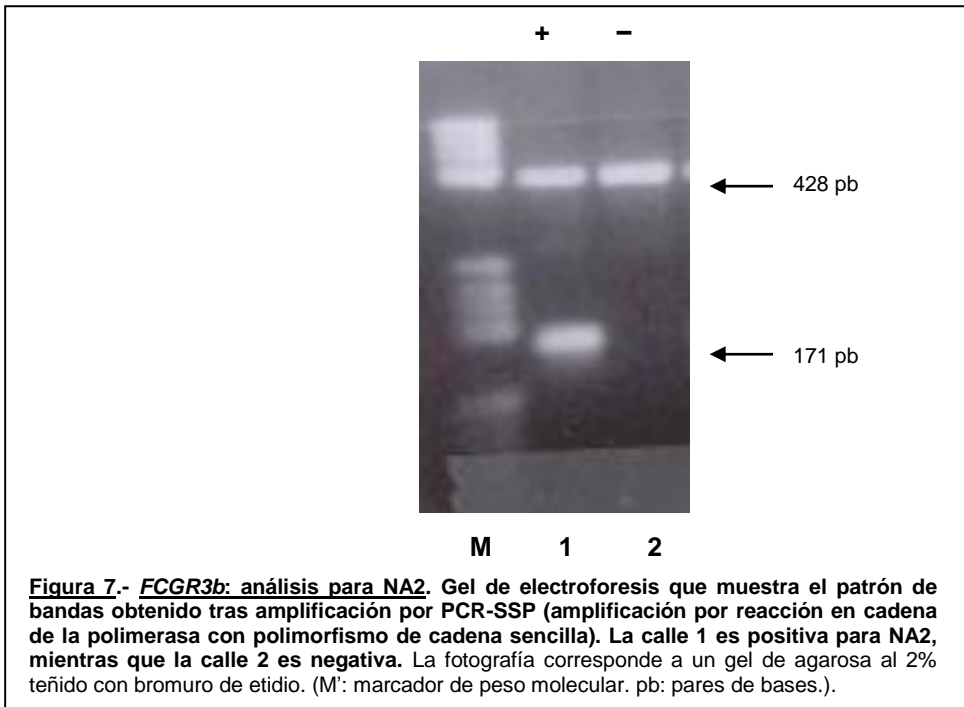
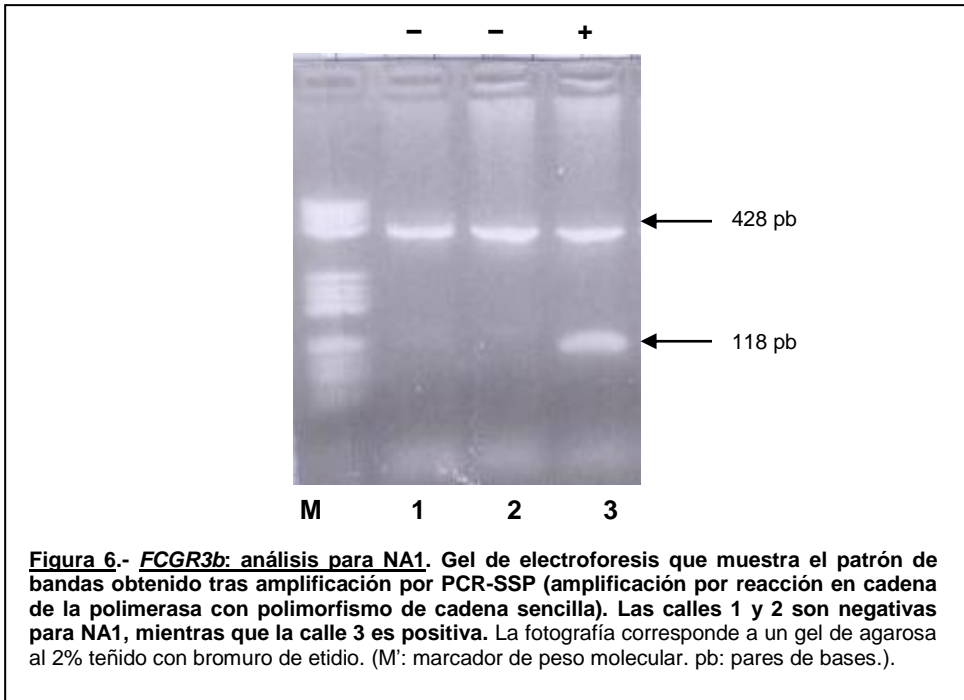
- 94°.....5 min.
  - 94°.....1 min.
  - 67°.....1 min.
  - 72°.....1 min.
  - 72°.....5 min.
- } x 30

## III. **Visualización.**

El producto obtenido se corre en gel de agarosa al 2%, el cual se tiñe con bromuro de etidio (0.005%) y se visualiza en un transiluminador de luz UV:

### **Tamaño:**

- NA1D+NA1R: 118 pb
- NA2D+NA2R: 171 pb
- HGH1D+HGH2R (control): 428 pb



## 2. **SH:**

### I. **Condiciones:**

- H<sub>2</sub>O: 14.65 µL
- Buffer (10x): 2.5 µL (1x)
- dNTP mix: 2 µL (0.2 mM)
- Mg Cl<sub>2</sub>: 1.5 µL (1.5 mM)
- SHD: 1.25 µL (0.5 mM)
- SHR: 1.25 µL (0.5 mM)
- HGH1D: 0.32 µL (0.128 mM)
- HGH1R: 0.32 µL (0.128 mM)
- AmpliTaq polimerasa Perkin Elmer: 0.16 µL (8 U)

### II. **Programa del termociclador (Perkin-Elmer 9600):**

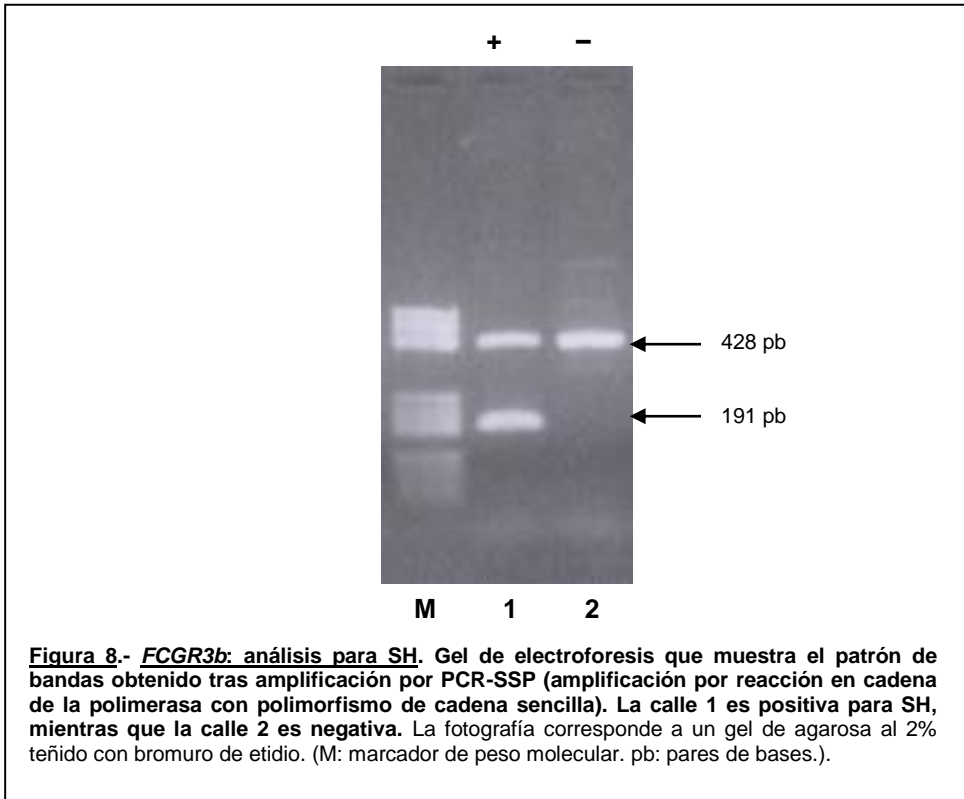
- 95°.....5 min.
  - 95°.....30 seg.
  - 60°.....1 min.
  - 71°.....30 seg.
  - 72°.....5 min.
- } x 30

### III. **Visualización.**

El producto obtenido se corre en gel de agarosa al 2%, el cual se tiñe con bromuro de etidio (0.005%) y se visualiza en un transiluminador de luz UV:

#### **Tamaño:**

- SHD+SHR: 191 pb
- HGH1D+HGH2R (control): 428 pb



#### **4.6.- Aspectos éticos.**

El protocolo fue aprobado por los Comités locales de Ética en la Investigación de los cuatro hospitales. Para la inclusión en el estudio se recogió el consentimiento informado del paciente o, en caso de imposibilidad por las características clínicas del mismo, de sus familiares. La investigación que se expone en el presente manuscrito es conforme con la declaración de Helsinki.

#### **4.7.- Tamaño muestral.**

En estudios previos de nuestro grupo se analizaron diez variantes polimórficas<sup>68 31 69</sup>. De acuerdo con los resultados obtenidos, asumimos

para nuestra población frecuencias alélicas de 0.489 para *FCGR2A-131H* y de 0.511 para *FCGR2A-131R*; y asumiendo, también, una incidencia de bacteriemia entre los pacientes con NNAC de 0'266 (n=319), el tamaño muestral de nuestro estudio es suficiente para detectar el efecto del alelo *FCGR2A-131H* sobre la susceptibilidad a la NAC, NNAC y NNAC-B con OR de 1.24, 1.4 y 2.01 respectivamente y un umbral de significación estadística de 0.003 con un poder estadístico del 80%. Igualmente, para la misma significación y poder estadísticos, nuestro estudio detectaría una asociación entre el alelo *FCGR2A-131R* y la NAC, la NNAC y la NNAC-B con OR de 1.23, 1.4 y 2 respectivamente.

#### **4.8.- Análisis estadístico.**

Después de excluir a los individuos doble heterocigotos, se calculó el equilibrio de Hardy-Weinberg para el SNP *FCGR2A-H131R* con el software *Arlequín* versión 3.11 y el desequilibrio de ligamiento (LD,  $D'$  y  $r^2$ ) con el software *Haploview* versión 4.1. Las variables cuantitativas se presentaron usando la media aritmética  $\pm$  desviación estándar (DS). La distribución de genotipos fue comparada usando el test de la  $\chi^2$ , ó el test exacto de Fisher cuando fue preciso, y se calculó la *odds ratio* (OR) con un intervalo de confianza del 95% (IC 95%). La relación entre gravedad y mortalidad con los genotipos fue evaluada por medio de análisis multivariante ajustado por PSI, hospital de origen e ingreso en UMI; y también por edad, sexo, hospital de origen, comorbilidades y admisión en UMI. Las tasas de supervivencia se estimaron usando el método de Kaplan-Meier y su comparación con los genotipos fue realizado por medio del test log-rank. Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS 15.0 (SPSS, Inc, Chicago, IL.). El poder estadístico y la sensibilidad de los test fueron calculados con QUANTO 1.2.



## **5.- RESULTADOS.**

- 1. Estudio clínico-demográfico**
- 2. Estudio genético**



## **5.- RESULTADOS.**

### **5.1.- Estudio clínico-demográfico.**

#### **5.1.1.- Población control.**

Nuestro grupo control estaba constituido por 1224 individuos españoles, caucásicos, procedentes de los cuatro hospitales de reclutamiento del estudio. Su edad media fue de  $63.2 \pm 17.95$  años y su distribución por sexos fue de 65.8% hombres frente al 34.2% de mujeres. Su distribución demográfica en cuanto a edad y sexo fue similar a la del grupo de pacientes con NAC. En cuanto al resto de características clínico-demográficas, por los propios criterios de inclusión en el grupo control no tienen relevancia en el estudio.

#### **5.1.2.- Grupo de pacientes.**

##### **a) Distribución demográfica.**

Formado por 1262 pacientes españoles de raza caucásica procedentes de los cuatro hospitales de origen. Su edad media fue de  $64.79 \pm 17.35$  años y su distribución por sexos fue de 68.4% hombres frente al 31.6% de mujeres (tabla 2).

##### **b) Características clínicas previas.**

Del total de pacientes, sólo el 33.5% no presentaba ninguna comorbilidad conocida. En el resto (839 pacientes) se describe, al menos, una de las comorbilidades consideradas en el estudio (tablas 2 y 3). Las comorbilidades más frecuentes fueron EPOC (28.4%) y diabetes (22.3%).

Tabla 2.- Características clínico-demográficas de los pacientes con NAC.

	N=1262
Características	Media $\pm$ DS
Edad	64.79 $\pm$ 17.35
	n (%) *
Sexo	
Hombre	863 (68.4)
Mujer	399 (31.6)
Comorbilidades <sup>†</sup>	
No	423 (33.5)
EPOC	358 (28.4)
Asma	64 (5.1)
Neoplasia	130 (10.3)
Cardiopatía isquémica	132 (10.5)
Diabetes	282 (22.3)
Insuficiencia renal	88 (7.0)
Insuficiencia hepática	75 (5.9)
Patología neurológica	163 (12.9)
Patología autoinmune	32 (2.5)
Patología psiquiátrica	9 (0.7)

\* Los valores son: número de individuos y % sobre el total.

<sup>†</sup> Algunos pacientes tienen más de una comorbilidad.

(DS: desviación estándar. EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica. N: número total de individuos. n: número de individuos obtenido con esas características. NAC: neumonía adquirida en la comunidad)

**Tabla 3.- Características clínico-demográficas de los distintos subgrupos de pacientes con NAC.**

Características	NAC		p #		NNAC-B (N = 85)	NNAC (N = 943)	NNAC-NB vs. NNAC-B	NNAC-NB vs. NnNAC	NNAC-B vs. NnNAC
	NNAC-NB (N = 234)	N (%) *	NNAC-B (N = 85)	N (%) *					
Edad *	60.2 ± 18.1		58.1 ± 16.1	64.1 ± 18.0			0.347	0.003	0.003
Sexo									
Hombre	148 (63.2)		63 (74.1)	652 (69.1)					
Mujer	86 (36.8)		22 (25.9)	291 (30.9)			0.090	0.090	0.400
Comorbilidades †									
No	88 (37.6)		33 (38.8)	305 (32.3)			0.843	0.126	0.223
EPOC	53 (22.6)		24 (28.2)	281 (29.8)			0.377	0.036 <sup>1</sup>	0.858
Asma	11 (4.7)		2 (2.4)	51 (5.4)			0.348	0.665	0.308
Neoplasia	22 (9.4)		10 (11.8)	98 (10.4)			0.535	0.654	0.693
Cardiopatía isquémica	17 (7.3)		3 (3.5)	112 (11.9)			0.339	0.056	0.030 <sup>2</sup>
Diabetes	50 (21.4)		16 (18.8)	216 (22.9)			.0620	0.615	0.389
Insuficiencia renal	9 (3.8)		3 (3.5)	76 (8.1)			0.840	0.036 <sup>3</sup>	0.197
Insuficiencia hepática	16 (6.8)		9 (10.6)	50 (5.3)			0.270	0.361	0.052
Patología neurológica	27 (11.5)		9 (10.6)	127 (13.5)			0.813	0.433	0.453
Patología autoinmune	5 (2.1)		0 (0.0)	27 (2.9)			0.330	0.541	0.159
Patología psiquiátrica	2 (0.9)		0 (0.0)	7 (0.7)			1.000	0.696	1.000

\* Los valores son: 1) para la edad: media ± desviación estándar y 2) para el resto: número de individuos y % sobre el total

# Test aplicados: t-test (para la edad) y Chi-cuadrado ó test exacto de Fisher (para las comorbilidades y el PSI)

† Algunos pacientes tienen más de una comorbilidad

<sup>1</sup> OR = 0.69; IC 95% (0.48-0.97). <sup>2</sup> OR = 0.27; IC 95% (0.05-0.85). <sup>3</sup> OR = 0.46; IC 95% (0.20-0.93).

(EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica. IC: intervalo de confianza. N: número total de individuos. n: número de individuos obtenido con esas características. NAC: neumonía adquirida en la comunidad. NNAC: neumonía neumocócica adquirida en la comunidad. NNAC-B: neumonía neumocócica bacteriémica adquirida en la comunidad. NNAC-NB: neumonía neumocócica no bacteriémica adquirida en la comunidad. NnNAC: neumonía no neumocócica adquirida en la comunidad. OR: odds ratio. p: probabilidad. vs.: contra (*versus*))

**c) Microbiología.**

Se obtuvo confirmación microbiológica de la NAC en 524 pacientes (41.5%). El agente etiológico más frecuente fue *S. pneumoniae* (319; 25.3% del total de pacientes con NAC y 60.8% de aquellos en que se encontró microorganismo causal). *Pseudomonas aeruginosa* fue aislado en 26 pacientes (2.1%), *Haemophilus influenzae* en 19 pacientes (1.5%) y *Staphylococcus aureus* en 24 pacientes (1.9%). Se identificaron otros microorganismos causales en 136 pacientes (tabla 4). En 35 pacientes (6.6%) se identificó más de un agente etiológico y se obtuvieron hemocultivos positivos en 118 pacientes (9.4 %). El 95'6% de los pacientes recibieron tratamiento antibiótico empírico de acuerdo con las guías de la ATS/IDSA <sup>70 58 71 7</sup>. Se diagnosticó NNAC-B en 85 pacientes (26.6% de las NNAC) y el antígeno urinario de *S. pneumoniae* fue detectado en el 83% de los pacientes con NNAC (tabla 5).

**Tabla 4.- Características microbiológicas de los pacientes con NAC.**

<b>Características microbiológicas</b>	<b>N = 1262 n (%) *</b>
Determinación de microorganismo	
Sí	524 (41.5)
No	738 (58.5)
Aislados	
Monomicrobiana	489 (93.3)
Polimicrobiana	35 (6.67)
Bacteriemia	
Sí	118 (9.4)
No	1144 (90.6)
Tratamiento concordante con ATS/IDSA	
Sí	1206 (95.6)
No	56 (4.4)
<b>Distribución de microorganismos</b>	<b>N = 524 n (%) *</b>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	319 (60.9)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26 (5.0)
<i>Haemophilus influenzae</i>	19 (3.6)
<i>Staphylococcus aureus</i>	24 (4.6)
Otros <sup>#</sup>	136 (26.0)

\* Los valores son: número de individuos y % sobre el total mostrado

<sup>#</sup> *Legionella pneumophyla*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Nocardia asteroides*, *Fusobacterium*, *Enterococcus faecalis*, *Acinetobacter baumannii*, *Peptostreptococcus*, *Aeromonas caviae*, *Coxiella burnetii*, *Pasteurella multocida*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus coagulasa* (-), *Serratia marcescens*, *Citrobacter diversus*, *Streptococcus milenii*, *Streptococcus acidominimus*, *Streptococcus viridans*, *Moraxella catharralis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptococcus sanguis*, virus Influenza A, virus Varicela, virus Respiratorio Sincitial, virus influenza B, virus parainfluenza.

(ATS/IDSA: Sociedad Americana del Tórax (*American Thoracic Society*)/Sociedad Americana de enfermedades infecciosas (*Infectious Diseases Society of America*). N: número total de individuos. n: número de individuos obtenido con esas características. NAC: neumonía adquirida en la comunidad).

**Tabla 5.- Características microbiológicas de los pacientes con NNAC.**

Características microbiológicas	N = 319 n (%) *
Bacteriemia	
Sí	85 (26.6)
No	234 (73.4)
Antigenuria <i>Streptococcus pneumoniae</i>	
Sí	265 (83.1)
No	54 (16.9)

\* Los valores son: número de individuos y % sobre el total mostrado

(NNAC: neumonía neumocócica adquirida en la comunidad. N: número total de individuos. n: número de individuos obtenido con esas características)



**d) Estratificación por gravedad.**

En cuanto a la gravedad de la NAC, el 54.6% del total (624 pacientes) se clasificaron al ingreso hospitalario como de gravedad moderada-alta (PSI IV-V) y 366 pacientes (29%) desarrollaron formas graves de la sepsis (sepsis grave ó shock séptico). Del total de los pacientes con NAC, un 9.4% desarrollaron bacteriemia (118 pacientes), característica que se considera como presentación clínica de gravedad.

Debido a su gravedad, 323 pacientes con NAC (el 25.6% del total) requirieron ingreso en UMI; el resto (74.4%) ingresaron en una planta de hospitalización convencional (PHC), bien en Neumología, bien en Medicina Interna. En cuanto a los pacientes del subgrupo con NNAC, el 38.2% ingresaron en UMI y el 61.8% restante lo hicieron en una PHC (tablas 6 y 7).

Es interesante el hecho de que la NNAC-B se asoció a una mayor gravedad de la enfermedad, evaluada ésta como ingreso en UMI, fracaso renal agudo, gravedad de la sepsis, SDMO y SDRA, incluso en el análisis multivariante ajustado por PSI y hospital de origen (tabla 8). El efecto de NNAC-B en la mortalidad no pudo ser evaluado, dado que el escaso número de pacientes fallecidos (n=19) no permitió disponer del suficiente poder estadístico.

Tabla 6.- Características clínicas de los pacientes con NAC.

Características	N=1262 n (%) *
Ingreso en UMI	
No	939 (74.4)
Sí	323 (25.6)
PSI	
I-III	638 (50.6)
IV-V	624 (49.4)
SDRA	
No	1209 (95.8)
Sí	53 (4.2)
Bacteriemia	
No	1144 (90.6)
Sí	118 (9.4)
Sepsis	
Sepsis no grave <sup>†</sup>	896 (71.0)
Formas graves de sepsis	366 (29.0)
SDMO	
No	1102 (87.3)
Sí	160 (12.7)
FRnA	
No	946 (75.0)
Si	316 (25.0)
Mortalidad a los 28 días	
No	1202 (95.2)
Sí	60 (4.8)
Mortalidad a los 90 días	
No	1176 (93.1)
Sí	86 (6.8)

\* Los valores son: número de individuos y % sobre el total

<sup>†</sup> Pacientes sépticos que no reúnen criterios de “sepsis grave” ni de “shock séptico”.

(FRnA: insuficiencia/fracaso renal agudo. n: número de individuos obtenido con esas características. NAC: neumonía adquirida en la comunidad. PSI: índice de severidad de la neumonía (*pneumonia severity index*). SDMO: síndrome de disfunción multiorgánica. SDRA: síndrome de distrés respiratorio agudo. UMI: Unidad/Servicio de Medicina Intensiva)

**Tabla 7.-- Características clínicas de los pacientes con NNAC.**

Características	N=319 n (%) *
Ingreso en UMI	
No	197 (61.8)
Sí	122 (38.2)
PSI	
I-III	157 (49.2)
IV-V	162 (50.8)
SDRA	
No	293 (91.8)
Sí	26 (8.2)
Bacteriemia	
No	234 (73.4)
Sí	85 (26.6)
Sepsis	
Sepsis no grave <sup>†</sup>	187 (58.6)
Formas graves de sepsis	132 (41.4)
SDMO	
No	262 (82.1)
Sí	57 (17.9)
FRnA	
No	218 (68.3)
Si	101 (31.7)
Mortalidad a los 28 días	
No	306 (95.9)
Sí	13 (4.1)
Mortalidad a los 90 días	
No	300 (94.1)
Sí	19 (5.9)

\* Los valores son: número de individuos y % sobre el total

<sup>†</sup> Pacientes sépticos que no reúnen criterios de "sepsis grave" ni de "shock séptico".

(FRnA: insuficiencia/fracaso renal agudo. n: número de individuos obtenido con esas características. NNAC: neumonía neumocócica adquirida en la comunidad. PSI: índice de severidad de la neumonía (*pneumonia severity index*). SDMO: síndrome de disfunción multiorgánica. SDRA: síndrome de distrés respiratorio agudo. UMI: Unidad/Servicio de Medicina Intensiva)

Tabla 8.- Asociación entre la NNAC-B y la NNAC-NB con la gravedad del proceso.

	NNAC-B (N=85)	NNAC-NB (N=234)	p <sup>#</sup>	OR (IC 95%)	p <sup>†</sup>	OR (IC 95%)
	n (%) *	n (%) *				
Ingreso en UMI	49 (57.6)	73 (31.3)	0.0000195	2.98 (1.73-5.14)	0.000131458	3.27 (1.78-6.01)
Sepsis grave	53 (62.4)	78 (33.3)	0.0000033	3.31 (1.92-5.72)	0.000006587	4.4 (2.31-8.39)
SDMO	26 (30.6)	31 (13.3)	0.0000269	3.37 (1.79-6.31)	0.000482794	3.29 (1.69-6.41)
SDRA	13 (15.3)	13 (5.6)	0.0037971	3.18 (1.28-7.81)	0.010273191	3.04 (1.30-7.11)
FRnA	41 (48.2)	60 (25.6)	0.0001523	2.67 (1.54-4.62)	0.002376058	2.49 (1.38-4.49)
Mortalidad 28 días	3 (3.5)	10 (4.3)	n.s.	n.s.	-	-
Mortalidad 90 días	5 (5.9)	14 (6.0)	n.s.	n.s.	-	-

\* Los valores son: número de individuos y % sobre el total mostrado

<sup>#</sup> Valor de la p para la comparación bivariante, calculada mediante el test de la Chi-cuadrado

<sup>†</sup> Valor de la p para el análisis multivariante, incluyendo las variables "hospital de origen" y "PSI"

(FRnA: insuficiencia/fracaso renal agudo. IC: intervalo de confianza. N: número total de individuos. n: número de individuos obtenido con esas características. NNAC-B: neumonía neumocócica bacteriémica adquirida en la comunidad. NNAC-NB: neumonía neumocócica no bacteriémica adquirida en la comunidad. OR: *odds ratio*. p: probabilidad. PSI: índice de severidad de la neumonía (*pneumonia severity index*). SDMO: síndrome de disfunción multiorgánica. SDRA: síndrome de distrés respiratorio agudo. UMI: Unidad/Servicio de Medicina Intensiva)

### **1. Escala PSI.**

En el total de las NAC, el valor del PSI (según la escala de Fine) calculado al ingreso fue de  $119.97 \pm 38.16$  para los pacientes ingresados en UMI y de  $99.18 \pm 37.17$  en los pacientes ingresados en una PHC. Clasificándolo por grados, los de menor gravedad (I-III) supusieron el 50.6% mientras que los de mayor gravedad (IV-V) fueron un 49.4%. Sin embargo, existen marcadas diferencias si comparamos los pacientes ingresados en UMI y con los ingresados en PHC: en los ingresados en UMI los grados más altos del Fine representaban un 77.3%, frente al 52.9% de los ingresados en una PHC.

En el subgrupo de pacientes con NNAC, el Fine calculado al ingreso fue de  $120.92 \pm 39.66$  para los pacientes ingresados en UMI y de  $89.15 \pm 32.64$  para los pacientes ingresados en una PHC. En el total de las NNAC, los grados más bajos del Fine (I-III) supusieron un 49.2%, frente al 50.8% de los grados más altos (IV-V) (tabla 9).

### **2. Escala APACHE-II.**

Esta puntuación sólo se calcula en pacientes que ingresan en UMI, por tanto no se ha valorado en los pacientes ingresados en una PHC. El valor del APACHE-II al ingreso en UMI fue de  $18.43 \pm 7.42$  para la NAC total y de  $19.64 \pm 7.51$  para el subgrupo de pacientes con NNAC (tabla 9).

### **3. Bacteriemia.**

El 9.4% de nuestras NAC fueron bacteriémicas mientras que, en el subgrupo de las NNAC, se alcanza el 26.6% (tablas 6 y 7)

**Tabla 9.- Comparativa de los valores de las escalas de Fine y APACHE-II en los distintos subgrupos de pacientes con NAC.**

		NAC (N=1262)	NnNAC (N=943)	NNAC (N=319)		
				Total (N=319)	NNAC-NB (N=234)	NNAC-B (N=85)
				n (%) *	n (%) *	n (%) *
PSI	I - III	638 (50.6)	481 (51.0)	157 (49.2)	121 (51.7)	36 (42.4)
	IV-V	624 (49.4)	462 (49.0)	162 (50.8)	113 (48.3)	49 (57.6)
		(N=323)	(N=201)	(N=122)	(N=72)	(N=50)
		Media ± DS *	Media ± DS *	Media ± DS *	Media ± DS *	Media ± DS *
APACHE-II		18.43 ± 7.42	17.77 ± 7.31	19.64 ± 7.51	18.90 ± 7.38	20.70 ± 7.65

\* Los valores son: 1) para PSI, el número de individuos y el % sobre el total mostrado; y 2) para APACHE-II, la media ± la desviación estándar (ANOVA)

(APACHE: *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation*. DS: desviación estándar. N: número total de individuos de cada epígrafe. n: número de individuos obtenido con esas características. NAC: neumonía adquirida en comunidad. NNAC: neumonía neumocócica adquirida en la comunidad. NNAC-B: neumonía neumocócica bacteriémica adquirida en la comunidad. NNAC-NB: neumonía neumocócica no bacteriémica adquirida en la comunidad. NnNAC: neumonía no neumocócica adquirida en la comunidad. PSI: índice de severidad de la neumonía (*pneumonia severity index*))

#### 4. Estratificación de la sepsis.

De los pacientes con NAC incluidos en el estudio, un 71.0% tuvieron signos de sepsis no grave, de acuerdo con las definiciones internacionalmente aceptadas<sup>59 60 61</sup> (tabla 10). El 29.0% restante presentaron formas graves de sepsis (sepsis grave + shock séptico) llegando a desarrollar shock séptico un 15.1% del total.

**Tabla 10 .- Distribución de los distintos grados de sepsis en pacientes con NAC y subgrupos de NNAC.**

	<b>NAC</b> (N=1262)	<b>NNAC</b> (N=319)		
		<b>Total</b> (N=319)	<b>NNAC-NB</b> (N=234)	<b>NNAC-B</b> (N=85)
	<b>n (%) *</b>	<b>n (%) *</b>	<b>n (%) *</b>	<b>n (%) *</b>
<b>Sepsis no grave</b>	896 (71.0)	187 (58.6)	156 (66.7)	32 (37.6)
<b>Formas graves de sepsis</b>	366 (29.0)	132 (41.4)	78 (33.3)	53 (62.4)

\* Los valores son: número de individuos y % sobre el total mostrado

(N: número total de individuos de cada epígrafe. n: número de individuos obtenido con esas características. NAC: neumonía adquirida en comunidad. NNAC: neumonía neumocócica adquirida en la comunidad. NNAC-B: neumonía neumocócica bacteriémica adquirida en la comunidad. NNAC-NB: neumonía neumocócica no bacteriémica adquirida en la comunidad.)

Sin embargo, en el subgrupo de pacientes con NNAC ese porcentaje asciende al 41.4%, lo que parece indicar una mayor gravedad de esta etiología de NAC frente al resto (tabla 10). Profundizando aún más, dentro de las NNAC hay también diferencias palpables dependiendo de si son bacteriémicas o no: en las NNAC-B el porcentaje de pacientes que desarrollaron formas graves aumenta hasta el 62.4%, frente al 33.5% que lo desarrollaron en las NNAC-NB (en análisis multivariante que incluye hospital de origen y PSI,  $p=0.0000065$ ;  $OR=4.4$  IC9% [2.31-8.39]) (tabla 8).

### 5. Insuficiencia/fracaso renal agudo (FRnA).

Los pacientes con NNAC-B desarrollan más frecuentemente FRnA que los no bacteriémicos: 48.2% vs. 25.6% (tabla 11); que son valores estadísticamente significativos tanto en el análisis bivalente como en el multivariante, con  $p=0.00015$  (OR=2.67 [1.54-4.62]) y  $p=0.0024$  (OR=2.49 [1.38-4.49]) respectivamente (tabla 8).

**Tabla 11.- Comparativa del desarrollo de FRnA en pacientes con NAC y subgrupos de NNAC.**

		NAC (N=1262)	NNAC (N=319)		
			Total (N=319)	NNAC-NB (N=234)	NNAC-B (N=85)
		N (%) *	N (%) *	N (%) *	N (%) *
FRnA	NO	946 (74.9)	218 (68.3)	174 (74.4)	44 (51.8)
	SÍ	316 (25.1)	101 (31.7)	60 (25.6)	41 (48.2)

\* Los valores son: número de individuos y % sobre el total mostrado

(FRnA: insuficiencia/fracaso renal agudo. N: número total de individuos de cada epígrafe. n: número de individuos obtenido con esas características. NAC: neumonía adquirida en comunidad. NNAC: neumonía neumocócica adquirida en la comunidad. NNAC-B: neumonía neumocócica bacteriémica adquirida en la comunidad. NNAC-NB: neumonía neumocócica no bacteriémica adquirida en la comunidad.)



## 6. Síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA).

Entre todas las NAC estudiadas, el 4.2% desarrollaron un SDRA, que se transforma en un 8.2% si hablamos de las NNAC (tabla 12). Dentro de estas últimas hay una marcada diferencia entre la NNAC-B y las NNAC-NB, a favor de las bacteriémicas (15.3% vs. 5.6%;  $p=0.0102$  y  $OR=3.04$  con  $IC95\%$  1.30-7.11] en el análisis multivariante) (tabla 8).

**Tabla 12.- Comparativa del desarrollo de SDRA en pacientes con NAC y subgrupos de NNAC.**

		NAC (N=1262)	NNAC (N=319)		
			Total (N=319)	NNAC-NB (N=234)	NNAC-B (N=85)
		N (%) *	N (%) *	N (%) *	N (%) *
SDRA	NO	1209 (95.8)	293 (91.85)	221 (94.4)	72 (84.7)
	SÍ	53 (4.2)	26 (8.15)	13 (5.6)	13 (15.3)

\* Los valores son: número de individuos y % sobre el total mostrado

(N: número total de individuos de cada epígrafe. n: número de individuos obtenido con esas características. NAC: neumonía adquirida en comunidad. NNAC: neumonía neumocócica adquirida en la comunidad. NNAC-B: neumonía neumocócica bacteriémica adquirida en la comunidad. NNAC-NB: neumonía neumocócica no bacteriémica adquirida en la comunidad. SDRA: síndrome de distrés respiratorio agudo)

## 7. Disfunción multiorgánica.

El 12.7% de las NAC desarrollaron SDMO frente al 17.5% de las NNAC (tabla 13) ( $p=0.0296$ , OR:1.47 [10.3-2.06]). Cuando se analizan las NNAC se observa una significativa diferencia en el desarrollo de SDMO a favor de los pacientes bacteriémicos frente a los no bacteriémicos (30.6 vs. 13.3;  $p=0.0005$ , OR=3.29 con IC95% [1.69-6.41] en el análisis multivariante) (tabla 8).

**Tabla 13.- Comparativa del desarrollo de SDMO en pacientes con NAC y subgrupos de NNAC.**

		NAC (N=1262)	NNAC (N=319)		
			Total (N=319)	NNAC-NB (N=234)	NNAC-B (N=85)
		N (%) *	N (%) *	N (%) *	N (%) *
SDMO	NO	1102 (95.2)	262 (82.1)	203 (86.7)	59 (69.4)
	SÍ	160 (12.7)	57 (17.9)	31 (13.3)	26 (30.3)

\* Los valores son: número de individuos y % sobre el total mostrado

(N: número total de individuos de cada epígrafe. n: número de individuos obtenido con esas características. NAC: neumonía adquirida en comunidad. NNAC: neumonía neumocócica adquirida en la comunidad. NNAC-B: neumonía neumocócica bacteriémica adquirida en la comunidad. NNAC-NB: neumonía neumocócica no bacteriémica adquirida en la comunidad. SDMO: síndrome de disfunción multiorgánica)

## 8. Mortalidad.

La mortalidad de nuestros pacientes con NAC a los 28 días fue del 4.75% y a los 90 días del 6.81%. Si analizamos el subgrupo de pacientes con NNAC fue del 4.07% y 5.96% respectivamente. Estas diferencias entre los dos grupos de neumonías no son significativas. El análisis de las diferencias de mortalidad entre los pacientes con NNAC bacteriémicas y no bacteriémicas no ha sido posible por el escaso tamaño de las muestras (tabla 14).

**Tabla 14.- Comparativa de la mortalidad en pacientes con NAC y subgrupos de NNAC.**

			NAC (N=1262)	NNAC (N=319)		
				Total (N=319)	NNAC-NB (N=234)	NNAC-B (N=85)
			N (%) *	N (%) *	N (%) *	N (%) *
Mortalidad	28 días	NO	1202 (95.24)	306 (95.93)	224 (95.73)	82 (96.47)
		SÍ	60 (4.75)	13 (4.07)	10 (4.27)	3 (3.53)
	90 días	NO	1176 (93.19)	300 (94.04)	220 (94.02)	80 (94.12)
		SÍ	86 (6.81)	19 (5.96)	14 (5.98)	5 (5.88)

\* Los valores son: número de individuos y % sobre el total mostrado

(N: número total de individuos de cada epígrafe. n: número de individuos obtenido con esas características. NAC: neumonía adquirida en comunidad. NNAC: neumonía neumocócica adquirida en la comunidad. NNAC-B: neumonía neumocócica bacteriémica adquirida en la comunidad. NNAC-NB: neumonía neumocócica no bacteriémica adquirida en la comunidad. NnNAC: neumonía no neumocócica adquirida en la comunidad)

## 5.2.- Estudio genético.

### 5.2.1.- Caracterización genética de la población control.

Las frecuencias genotípicas del SNP *FCGR2A-H131R* en el grupo de controles se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p=0.7$ ). Además, para poder excluir un potencial efecto de confusión debido al desequilibrio de ligamiento entre el SNP *FCGR2A-H131R* y otros SNPs funcionalmente relevantes de los genes *FCGR3A* y *FCGR3B*<sup>29</sup> se midió el grado de desequilibrio de ligamiento entre estas variantes en un subgrupo de 573 controles de nuestra población. No se observó desequilibrio de ligamiento de *FCGR2A-H131R* con *FCGR3A-V158F* ( $D'=0.02$ ,  $r^2=0.021$ ) ni con *FCGR3B-NA1/NA2* ( $D'=0.05$ ,  $r^2=0.001$ ). (La distribución de los distintos alelos en los tres genes se muestra en la tabla 15).

**Tabla 15.- Frecuencias de los genotipos de los SNPs *FCGR2A-H131R*, *FCGR3A-V158F* y *FCGR3B-NA1/NA2* en población control sana.**

(N = 1224)			
Genotipos <i>FCGR2A</i>	H/H	H/R	R/R
n (%) *	284 (23.2)	630 (51.5)	310 (25.3)
(N=528)			
Genotipos <i>FCGR3A</i>	F/F	F/V	V/V
n (%) *	208 (39.4)	256 (48.5)	64 (12.1)
(N=573)			
Genotipos <i>FCGR3B</i>	1/1	1/2	2/2
n (%) *	49 (8.6)	252 (43.9)	272 (47.5)

\* Los valores son: número de individuos y % sobre el total

(*FCGR2A*: gen del receptor 2A para el fragmento Fc de la inmunoglobulina G. *FCGR3A*: gen del receptor 3A para el fragmento Fc de la inmunoglobulina G. *FCGR3B*: gen del receptor 3B para el fragmento Fc de la inmunoglobulina G. N: número total de individuos de cada epígrafe. n: número de individuos obtenido con esas características. SNP: polimorfismo de un único nucleótido (*single-nucleotide polymorphism*))

### 5.2.2.- Caracterización genética de la población con neumonía.

#### a) Neumonía adquirida en la comunidad.

Las frecuencias genotípicas del SNP *FCGR2A-H131R* se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg en los pacientes con NAC ( $p=0.3$ ).

La distribución de los distintos alelos en los tres genes (*FCGR2A-H131R*, *FCGR3A-V158F* y *FCGR3B-NA1/NA2*) se muestra en la tabla 16.

**Tabla 16.- Frecuencias de los genotipos de los SNPs *FCGR2A-H131R*, *FCGR3A-V158F* y *FCGR3B-NA1/NA2* en pacientes con NAC.**

(N = 1262)			
Genotipos <i>FCGR2A</i>	H/H	H/R	R/R
n (%) *	321 (25.4)	637 (50.5)	304 (24.1)
(N= 854)			
Genotipos <i>FCGR3A</i>	F/F	F/V	V/V
n (%) *	331 (38.8)	394 (46.1)	129 (15.1)
(N= 931)			
Genotipos <i>FCGR3B</i>	1/1	1/2	2/2
n (%) *	81 (8.7)	438 (47.0)	412 (44.3)

\* Los valores son: número de individuos y % sobre el total

(*FCGR2A*: gen del receptor 2A para el fragmento Fc de la inmunoglobulina G. *FCGR3A*: gen del receptor 3A para el fragmento Fc de la inmunoglobulina G. *FCGR3B*: gen del receptor 3B para el fragmento Fc de la inmunoglobulina G. N: número total de individuos de cada epígrafe. n: número de individuos obtenido con esas características. NAC: neumonía adquirida en comunidad. SNP: polimorfismo de un único nucleótido (*single-nucleotide polymorphism*))

**b) Neumonía neumocócica adquirida en la comunidad.**

También analizamos la distribución de los distintos alelos de los tres genes en el subgrupo de pacientes con NNAC. Los resultados se muestran en la tabla 17 y no difieren significativamente de los hallados en la población NAC total o de los hallados en controles.

**Tabla 17.- Frecuencias de los genotipos de los SNPs *FCGR2A*-H131R, *FCGR3A*-V158F y *FCGR3B*-NA1/NA2 en el subgrupo de pacientes con NNAC.**

	(N = 319)		
Genotipos <i>FCGR2A</i>	H/H	H/R	R/R
N (%) *	67 (21.1)	166 (52.0)	86 (26.9)
	(N=254)		
Genotipos <i>FCGR3A</i>	F/F	F/V	V/V
N (%) *	91 (35.8)	114 (44.9)	49 (19.3)
	(N=303)		
Genotipos <i>FCGR3B</i>	1/1	1/2	2/2
N (%) *	26 (8.6)	134 (44.2)	143 (47.2)

\* Los valores son: número de individuos y % sobre el total

(*FCGR2A*: gen del receptor 2A para el fragmento Fc de la inmunoglobulina G. *FCGR3A*: gen del receptor 3A para el fragmento Fc de la inmunoglobulina G. *FCGR3B*: gen del receptor 3B para el fragmento Fc de la inmunoglobulina G. N: número total de individuos de cada epígrafe. n: número de individuos obtenido con esas características. NNAC: neumonía neumocócica adquirida en la comunidad. SNP: polimorfismo de un único nucleótido (*single-nucleotide polymorphism*))

Por otro lado, hicimos un análisis estratificado por el genotipo *FCGR2A*-H131R de la distribución clínico-demográfica de los pacientes con NNAC para buscar posibles asociaciones, pero estas no fueron relevantes. Los resultados se muestran en la tabla 18.

**Tabla 18.- Características clínico-demográficas del subgrupo de pacientes con NNAC, estratificadas por el genotipo FCGR2A-H131R.**

Características	H/H (N=67)	H/R (N=166)	R/R (N=86)	p
Edad <sup>1</sup>	61.0 ± 18.6	60.5 ± 17.1	56.8 ± 17.6	0.21*
	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	
Sexo <sup>2</sup>				
Hombre	46 (68.7)	113 (68.1)	52 (60.5)	0.43 <sup>#</sup>
Mujer	21 (31.3)	53 (31.9)	34 (39.5)	
Comorbilidades <sup>2†</sup>				
No	38 (56.7)	111 (66.9)	49 (57.0)	0.18 <sup>#</sup>
EPOC	16 (23.9)	44 (26.5)	17 (19.8)	0.49 <sup>#</sup>
Asma	5 (7.5)	6 (3.6)	2 (2.3)	0.25 <sup>#</sup>
Neoplasia	7 (10.4)	18 (10.8)	7 (8.1)	0.79 <sup>#</sup>
Cardiopatía isquémica	3 (4.5)	11 (6.6)	6 (7.0)	0.70 <sup>#</sup>
Diabetes	7 (10.4)	35 (21.1)	24 (27.9)	0.03 <sup>#</sup>
Insuficiencia renal	3 (4.5)	7 (4.2)	2 (2.3)	0.71 <sup>#</sup>
Insuficiencia hepática	5 (7.5)	16 (9.6)	4 (4.7)	0.37 <sup>#</sup>
Patología neurológica	8 (11.9)	21 (12.7)	7 (8.1)	0.55 <sup>#</sup>
Patología autoinmune	2 (3.0)	3 (1.8)	0 (0.0)	0.32 <sup>#</sup>
Patología psiquiátrica	2 (3.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0.04 <sup>#</sup>

<sup>1</sup> Para la edad, el valor es: media ± desviación estándar.

<sup>2</sup> Para el resto de las características los valores son: número de individuos y % sobre el total

\* Comparación de las medias por medio de análisis de la varianza (ANOVA)

<sup>#</sup> Análisis de la asociación entre comorbilidad y genotipo H131R: por medio del Test de  $\chi^2$  o test exacto de Fisher, en caso de necesidad

<sup>†</sup> Algunos pacientes tienen más de una comorbilidad

(EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica. FCGR2A: gen del receptor 2A para el fragmento FC de la inmunoglobulina G. HH: alelo homocigoto H. HR: alelo heterocigoto. N: número total de individuos de cada epígrafe. n: número de individuos obtenido con esas características. NAC: neumonía adquirida en la comunidad. NNAC: neumonía neumocócica adquirida en la comunidad. RR: alelo homocigoto R.)

### **5.2.3.- Estudio de susceptibilidad.**

#### **c) Neumonía adquirida en la comunidad.**

Para evaluar la posible susceptibilidad al desarrollo de NAC comparamos las frecuencias genotípicas y alélicas observadas en los pacientes con las observadas en el grupo control (tabla 19).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre pacientes con NAC y controles al analizar los genotipos *FCGR2A*-H131R, *FCGR3A*-V158F y *FCGR3B*-NA1/NA2.

Por tanto, tras analizar los resultados no se han encontrado datos que sugieran que alguna de las variantes de los SNPs *FCGR2A*-H131R, *FCGR3A*-V158F o *FCGR3B*-NA1/NA2 conlleve un aumento de la susceptibilidad para padecer NAC.



**Tabla 19.- Frecuencias de los genotipos de los SNPs *FCGR2A*-H131R, *FCGR3A*-V158F y *FCGR3B*-NA1/NA2 en pacientes y controles.**

	<b>Controles</b> n (%) *	<b>NAC</b> n (%) *	<b>p</b>
<b>Genotipos <i>FCGR2A</i></b>	(N = 1224)	(N = 1262)	
H/H	284 (23.2)	321 (25.4)	n.s.
H/R	630 (51.5)	637 (50.5)	
R/R	310 (25.3)	304 (24.1)	
<b>Genotipos <i>FCGR3A</i></b>	(N = 528)	(N = 854)	
F/F	208 (39.4)	331 (38.8)	n.s.
F/V	256 (48.5)	394 (46.1)	
V/V	64 (12.1)	129 (15.1)	
<b>Genotipos <i>FCGR3B</i></b>	(N = 573)	(N = 931)	
1/1	49 (8.6)	81 (8.7)	n.s.
1/2	252 (43.9)	438 (47.0)	
2/2	272 (47.5)	412 (44.3)	

\* Los valores son: número de individuos y % sobre el total. No se observaron diferencias estadísticamente significativas.

(*FCGR2A*: gen del receptor 2A para el fragmento Fc de la inmunoglobulina G. *FCGR3A*: gen del receptor 3A para el fragmento Fc de la inmunoglobulina G. *FCGR3B*: gen del receptor 3B para el fragmento Fc de la inmunoglobulina G. F/F: alelo homocigoto F. F/V: alelo heterocigoto. H/H: alelo homocigoto H. H/R: alelo heterocigoto. N: número total de individuos de cada epígrafe. n: número de individuos obtenido con esas características. NAC: neumonía adquirida en la comunidad. . n.s.: no significativa. p: probabilidad. R/R: alelo homocigoto R. V/V: alelo homocigoto V. 1/1: alelo homocigoto NA1. 1/2: alelo heterocigoto. 2/2: alelo homocigoto NA2)

**d) Neumonía neumocócica adquirida en la comunidad.**

Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes del subgrupo con NNAC y los controles al analizar los genotipos *FCGR2A*-H131R, *FCGR3A*-V158F y *FCGR3B*-NA1/NA2 (tabla 20). Por tanto, tras analizar los resultados no se han encontrado datos que sugieran que alguno de los polimorfismos de los SNPs *FCGR2A*-H131R, *FCGR3A*-V158F o *FCGR3B*-NA1/NA2 conlleve un aumento de la susceptibilidad para padecer NNAC.

Abundando aún más en el análisis y considerando a la NNAC-B como un subgrupo con entidad propia, se analizó este subgrupo de la NNAC frente a los controles para cada uno de los genotipos *FCGR2A*-H131R, *FCGR3A*-V158F y *FCGR3B*-NA1/NA2 (tablas 21). Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre NNAC-B y controles para el genotipo *FCGR2A*-H131R ( $p=0.0167$ ; OR=1.81 con IC 95% [1.09-2.93]); sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas para los genotipos *FCGR3A*-V158F y *FCGR3B*-NA1/NA2. Por tanto, tras analizar los datos, los resultados sugieren que existe mayor susceptibilidad a padecer NNAC bacteriémica en los pacientes homocigotos para el alelo *FCGR2A*-H131, aunque no se han encontrado diferencias significativas que sugieran que alguna de las variantes de los SNPs *FCGR3A*-V158F o *FCGR3B*-NA1/NA2 conlleve un aumento de la susceptibilidad para padecer NNAC-B.

**Tabla 20.- Frecuencias de los genotipos de los SNPs *FCGR2A*-H131R, *FCGR3A*-V158F y *FCGR3B*-NA1/NA2 en pacientes con NNAC y controles.**

	<b>Controles</b> n (%) *	<b>NNAC</b> n (%) *	<b>p</b>
<b>Genotipos <i>FCGR2A</i></b>	(N = 1224)	(N = 319)	
H/H	284 (23.2)	67 (21.0)	n.s.
H/R	630 (51.5)	166 (52.0)	
R/R	310 (25.3)	86 (26.1)	
<b>Genotipos <i>FCGR3A</i></b>	(N = 528)	(N = 249)	
F/F	208 (39.4)	88 (35.3)	0.008 #
F/V	256 (48.5)	113 (45.4)	
V/V	64 (12.1)	48 (19.3)	
<b>Genotipos <i>FCGR3B</i></b>	(N = 573)	(N = 262)	
1/1	49 (8.6)	22 (8.4)	n.s.
1/2	252 (43.9)	119 (45.4)	
2/2	272 (47.5)	121 (46.2)	

\* Los valores son: número de individuos y % sobre el total

# V/V vs. F/F+V/V: p=0.008; OR=1.73; IC 95% (1.12-2.66). Para el resto no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

(*FCGR2A*: gen del receptor 2A para el fragmento Fc de la inmunoglobulina G. *FCGR3A*: gen del receptor 3A para el fragmento Fc de la inmunoglobulina G. *FCGR3B*: gen del receptor 3B para el fragmento Fc de la inmunoglobulina G. F/F: alelo homocigoto F. F/V: alelo heterocigoto. H/H: alelo homocigoto H. H/R: alelo heterocigoto. N: número total de individuos de cada epígrafe. n: número de individuos obtenido con esas características. NNAC: neumonía neumocócica adquirida en la comunidad. n.s.: no significativa. p: probabilidad. R/R: alelo homocigoto R. V/V: alelo homocigoto V. 1/1: alelo homocigoto NA1. 1/2: alelo heterocigoto. 2/2: alelo homocigoto NA2)

**Tabla 21.- Frecuencias de los genotipos de los SNPs FCGR2A-H131R, FCGR3A-V158F y FCGR3B-NA1/NA2 en pacientes con NNAC-B y controles.**

	<b>NNAC-B n (%) *</b>	<b>Controles n (%) *</b>	<b>p</b>
<b>Genotipos FCGR2A</b>	(N = 85)	(N = 1224)	
H/H	30 (35.3)	284 (23.2)	0.011 #
H/R	37 (43.5)	630 (51.5)	
R/R	18 (21.2)	310 (25.3)	
<b>Genotipos FCGR3A</b>	(N = 71)	(N = 528)	
F/F	23 (32.4)	208 (39.4)	n.s.
F/V	34 (47.9)	256 (48.5)	
V/V	14 (19.7)	64 (12.1)	
<b>Genotipos FCGR3B</b>	(N = 72)	(N = 573)	
1/1	4 (5.6)	49 (8.6)	n.s.
1/2	37 (51.4)	252 (43.9)	
2/2	31 (43.1)	272 (47.5)	

\* Los valores son: número de pacientes y % sobre el total

# H/H vs. H/R+R/R: p=0.011; OR=1.81; IC 95% (1.09-2.93). Para el resto no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

(FCGR2A: gen del receptor 2A para el fragmento Fc de la inmunoglobulina G. FCGR3A: gen del receptor 3A para el fragmento Fc de la inmunoglobulina G. FCGR3B: gen del receptor 3B para el fragmento Fc de la inmunoglobulina G. F/F: alelo homocigoto F. F/V: alelo heterocigoto. H/H: alelo homocigoto H. H/R: alelo heterocigoto. IC: intervalo de confianza. N: número total de individuos de cada epígrafe. n: número de individuos obtenido con esas características. NNAC-B: neumonía neumocócica bacteriémica adquirida en la comunidad. n.s.: no significativa. OR: odds ratio. p: probabilidad. p: probabilidad. R/R: alelo homocigoto R. V/V: alelo homocigoto V. 1/1: alelo homocigoto NA1. 1/2: alelo heterocigoto. 2/2: alelo homocigoto NA2)

#### **5.2.4.- Estudio de gravedad y pronóstico.**

##### **a) Neumonía adquirida en la comunidad.**

Tal y como se describe en los siguientes puntos de este apartado, no se observó ningún efecto de *FCGR2A-H131R* sobre la gravedad (considerada en base a las escalas PSI y APACHE-II), ni sobre la mortalidad de la NAC; ni siquiera al realizar un análisis multivariante ajustado por el genotipo *FCGR2A-H131R*, PSI y hospital de origen.

##### **1. Escala PSI.**

El valor del PSI según la escala de Fine osciló entre  $96.32 \pm 38.58$  (genotipos R/R) y  $100.02 \pm 38.41$  (genotipos H/H), al valorar el total de los pacientes con NAC (tabla 22). Cuando se valoró a los pacientes que requirieron ingreso en UMI se observó, como era de esperar, valores ligeramente más altos que van desde  $115.64 \pm 37.54$  (genotipos R/R) hasta  $129.49 \pm 40.83$  (genotipos H/H); en cualquier caso, no hay diferencias significativas al comparar los valores medios obtenidos dentro de cada grupo (total e ingresados en UMI) por medio de ANOVA.

Tampoco hay diferencias al valorar los porcentajes de genotipos H/H presentes en los rangos más bajos de la escala de Fine (I-III) frente a los más altos (IV-V).

**Tabla 22.- Características de gravedad de los pacientes con NAC, estratificados por el genotipo FCGR2A-H131R.**

		HH (N=321)	HR (N=637)	RR (N=304)
Características		Media $\pm$ DS *	Media $\pm$ DS *	Media $\pm$ DS *
PSI	NAC total	100.02 $\pm$ 38.41	96.71 $\pm$ 39.18	96.32 $\pm$ 38.58
	NAC UMI	129.49 $\pm$ 40.83	119.55 $\pm$ 44.35	115.64 $\pm$ 37.54
APACHE-II		20.14 $\pm$ 7.03	18.01 $\pm$ 7.47	17.94 $\pm$ 7.79
		n (%)*	n (%)*	n (%)*
Mortalidad a los 28 días #		15 (25.0)	29 (48.3)	16 (26.7)
Mortalidad a los 90 días #		23 (26.7)	43 (50.0)	20 (23.3)

\* Los valores son: 1) para PSI y APACHE-II, la media  $\pm$  la desviación estándar (ANOVA) y 2) para la mortalidad, el número de individuos y el % sobre el total

# Test de  $\chi^2$  o test exacto de Fisher, en caso de necesidad

(FCGR2A: gen del receptor 2A para el fragmento FC de la inmunoglobulina G. H/H: alelo homocigoto H. H/R: alelo heterocigoto. N: número total de individuos de cada epígrafe. n: número de individuos obtenido con esas características. NNAC: neumonía neumocócica adquirida en la comunidad. PSI: índice de severidad de la neumonía (*pneumonia severity index*). R/R: alelo homocigoto R)

## 2. Escala APACHE-II.

Los valores medios obtenidos en los pacientes que requirieron ingreso en UMI oscilaron entre 17.94  $\pm$  7.79 (genotipos R/R) y 20.14  $\pm$  7.03 (genotipos H/H), al valorar el total de los pacientes con NAC (tabla 22) y no existen diferencias significativas al comparar los valores medios obtenidos por medio de ANOVA.

Tampoco se observaron diferencias significativas en los porcentajes de pacientes con genotipos H/H entre los rangos más bajos del APACHE-II (hasta 29 puntos) y los más altos (a partir de 30 puntos). A título exclusivamente de curiosidad: el valor más alto obtenido de APACHE-II fue de 45 puntos y dicho individuo era R/R-F/F-NA2/NA2.

### **3. Bacteriemia.**

Su distribución, atendiendo al genotipo *FCGR2A-H131R* osciló entre el 7.6% (genotipos R/R) y el 11.5% (genotipos H/H), sin que las diferencias resultasen significativas al comparar la presentación en pacientes bacteriémicos y no bacteriémicos (tabla 23).

### **4. Estratificación de la sepsis.**

En cuanto al desarrollo de sepsis en las NAC, atendiendo al genotipo del *FCGR2A-H131R* no se hallaron diferencias estadísticamente significativas al comparar la presentación de la homocigosis para el alelo H en pacientes con formas graves de sepsis y pacientes con formas menos graves (tabla 23).

### **5. Insuficiencia renal aguda.**

Al analizar las frecuencias genotípicas se observó que había mayor porcentaje de homocigotos para el alelo H entre los pacientes que desarrollaron FRnA que entre los que no lo desarrollaron (29.7% vs. 23.9%), pero esa diferencia no resultó significativa, ni siquiera al realizar un análisis multivariante unilateral, ajustado por PSI y centro de procedencia (tabla 23).

**Tabla 23.- Presentaciones clínicas de gravedad de la NAC en función de los genotipos del SNP FCGR2A-H131R.**

	HH	HR+RR		
	n (%) *	n (%) *	p <sup>#</sup>	OR (IC 95%)
<b>Ingreso en UMI</b>				
<b>Sí</b> (N= 323)	84 (26.0)	239 (74.0)	0.75	1.05 (0.77-1.41)
<b>No</b> (N=939)	236 (25.1)	703 (74.9)		
<b>Bacteriemia</b>				
<b>Sí</b> (N=116)	37 (31.9)	79 (68.1)	0.09	1.42 (0.91-2.18)
<b>No</b> (N=1146)	284 (24.8)	862 (75.2)		
<b>Formas graves de sepsis</b>				
<b>Sí</b> (N=366)	99 (27.0)	267 (73.0)	0.37	1.13 (0.85-1.50)
<b>No</b> (N=896)	221 (24.7)	675 (75.3)		
<b>FRnA</b>				
<b>Sí</b> (N=316)	94 (29.7)	222 (70.3)	0.038	1.35 (1.00-1.81)
<b>No</b> (N=946)	226 (23.9)	720 (76.1)		
<b>SDRA</b>				
<b>Sí</b> (N=53)	17 (32.1)	36 (67.9)	0.25	1.41 (0.73-2.62)
<b>No</b> (N=1209)	303 (25.1)	906 (74.9)		
<b>SDMO</b>				
<b>Sí</b> (N=160)	42 (26.3)	118 (73.7)	0.78	1.05 (0.70-1.56)
<b>No</b> (N=1102)	278 (25.2)	824 (74.8)		

\* Los valores son: número de individuos y % sobre el total mostrado

<sup>#</sup> Valor de la p para la comparación bivalente, calculada mediante el test de la  $\chi^2$

(FCGR2A: gen del receptor 2A para el fragmento FC de la inmunoglobulina G. FRnA: insuficiencia/fracaso renal agudo. N: número total de individuos de cada epígrafe. n: número de individuos obtenido con esas características. H/H: alelo homocigoto H. H/R: alelo heterocigoto. p: probabilidad. SDMO: síndrome de disfunción multiorgánica. SDRA: síndrome de distrés respiratorio agudo. R/R: alelo homocigoto R. UMI: Unidad/Servicio de Medicina Intensiva.)



## **6. Síndrome de distrés respiratorio agudo.**

Al hacer el análisis de las frecuencias genotípicas, parecía haber un ligero aumento de la frecuencia de homocigotos H en los pacientes que desarrollaron SDRA frente a los que no lo desarrollaron, pero dichas diferencias no resultaron significativas (tabla 23).

## **7. Disfunción multiorgánica.**

Con una frecuencia de presentación de homocigotos para el alelo H del 26.3% en pacientes que desarrollaron SDMO frente a un 25.2% que no lo desarrollaron, las diferencias no fueron estadísticamente significativas (tabla 23).

## **8. Mortalidad.**

De los 60 pacientes que fallecieron dentro de los primeros 28 días, el porcentaje de cada una de las presentaciones del genotipo *FCGR2A*-H131R osciló entre 4.6% (en los genotipos H/R) y 5.3% (en los genotipos R/R). En ningún caso las diferencias halladas al comparar el porcentaje de homocigotos H en fallecidos frente a supervivientes fueron significativas (25.0% vs.25.4%). En cuanto a los fallecidos dentro de los 90 días, tampoco aquí se encontraron diferencias estadísticamente significativas (porcentaje de homocigotos H en fallecidos frente a supervivientes: 26.7% vs. 25.3%) (tabla 22).

**b) Neumonía neumocócica adquirida en la comunidad.**

Tal y como se describe en los siguientes puntos de este apartado, no se observó ningún efecto de *FCGR2A*-H131R sobre la gravedad (considerada en base a las escalas PSI y APACHE-II), ni sobre mortalidad. Sin embargo, si se halló que la homocigosidad para el alelo *FCGR2A*-H131 se asoció significativamente con el desarrollo de FRnA, de SDRA y de formas más graves de sepsis,; así como en el desarrollo de bacteriemia en la NNAC.

**1. Escala PSI.**

Los valores medios del Fine abarcaban una horquilla entre  $94.47 \pm 36.53$  (genotipos R/R) y  $103.01 \pm 41.26$  (genotipos H/H) en el total de los pacientes con NNAC; en los pacientes que requirieron ingreso en UMI se halló, como era de esperar, un aumento de estas cifras: oscilaron entre  $108.06 \pm 30.59$  (en los genotipos R/R) y  $126.28 \pm 42.27$  (genotipos H/H). En cualquier caso, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas al comparar los valores medios obtenidos dentro de cada grupo (ingresados en UMI y total) por medio de ANOVA (tabla 24).

**Tabla 24.- Características de gravedad de los pacientes con NNAC, estratificados por los genotipos del SNP *FCGR2A*-H131R.**

		HH	HR	RR	p
Características		Media $\pm$ DS *	Media $\pm$ DS *	Media $\pm$ DS *	
APACHE-II		19.26 $\pm$ 7.90	19.24 $\pm$ 7.71	19.13 $\pm$ 7.33	0.807
PSI	NNAC total	103.01 $\pm$ 41.26	99.87 $\pm$ 39.70	94.47 $\pm$ 36.53	0.327
	NNAC UMI	126.28 $\pm$ 42.27	125.00 $\pm$ 39.9	108.06 $\pm$ 30.59	0.06
		n (%) #	n (%) #	n (%) #	
PSI	I-III (N=157)	28 (41.8)	85 (51.2)	44 (51.2)	0.39
	IV-V (N=162)	39 (58.2)	81 (48.8)	42 (48.8)	

\* Los valores son: la media  $\pm$  la desviación estándar (ANOVA)

# Los valores son: número de individuos y % sobre el total (test de  $\chi^2$  o test exacto de Fisher, en caso de necesidad)

(DS: desviación estándar. *FCGR2A*: gen del receptor 2A para el fragmento FC de la inmunoglobulina G. H/H: alelo homocigoto H. H/R: alelo heterocigoto. N: número total de individuos de cada epígrafe. n: número de individuos obtenido con esas características. NNAC: neumonía neumocócica adquirida en la comunidad. PSI: índice de severidad de la neumonía (*pneumonia severity index*). R/R: alelo homocigoto R. UMI: Unidad/Servicio de Medicina Intensiva.)

## 2. Escala APACHE-II.

Los valores medios del APACHE-II se encontraban entre 19.13  $\pm$  7.33 (genotipo R/R) y 19.26  $\pm$  7.90 (genotipo H/H) (tabla 24) y no existen diferencias significativas al comparar los valores medios obtenidos por medio de ANOVA. Tampoco se observaron diferencias significativas en los porcentajes de pacientes con genotipos H/H entre los rangos más bajos del APACHE-II (hasta 29 puntos) y los más altos (a partir de 30 puntos)

## 3. Bacteriemia.

Los pacientes con NNAC-B tuvieron frecuencias de genotipos *FCGR2A*-H/H131 significativamente mayores que aquellos con NNAC-NB ( $p=0.00016$ , OR=2.9, IC 95% [1.58-

5.3]), como se muestra en la tabla 25. Las diferencias observadas entre NNAC-B y NNAC-NB siguieron siendo significativas tras ajustar por PSI, hospital de origen e ingreso en UMI ( $p=0.0011$ ,  $OR=2.83$ , IC 95% [1.51-5.32]), así como tras ajustar por edad, sexo, ingreso en UMI, comorbilidades y hospital de origen ( $p=0.0004$ ,  $OR=3.02$ , IC 95% [1.63-5.6]). Si aplicáramos la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples, la asociación entre el genotipo *FCGR2A-HH* y la predisposición a NNAC-B seguiría siendo significativa, incluso si los diez polimorfismos analizados por nuestro grupo en estudios previos fueran tenidos en cuenta <sup>68 31 69</sup>.

El análisis multivariante también permitió ver que el efecto de la bacteriemia sobre la gravedad (valorado por medio de las escalas PSI y APACHE) era independiente del genotipo *FCGR2A*.

**Tabla 25.- Frecuencias de los genotipos del SNP *FCGR2A-H131R* en pacientes con NNAC-B y NNAC-NB.**

	NNAC-NB (N = 234)	NNAC-B (N = 85)		
Genotipos <i>FCGR2A</i>	n (%) *	n (%) *	p #	
			Bivariante	Multivariante
H/H	37 (15.8)	30 (35.3)	0.00016	0.0012
H/R	129 (55.1)	37 (43.5)		
R/R	68 (29.1)	18 (21.2)		

\* Los valores son: número de pacientes y % sobre el total

# Análisis estadístico *H/H* vs. *H/R* + *R/R* en NNAC-B y NNAC-NB:

- Análisis bivariante:  $p= 0.00016$ ;  $OR= 2.9$ ; IC 95% (1.58-5.3)
- Análisis multivariante (incluye las variables "hospital de origen", "ingreso en UMI" y "PSI"):  $p= 0.0012$ ;  $OR= 2.83$ ; IC 95% I (1.51-5.32)

(*FCGR2A*: gen del receptor 2A para el fragmento FC de la inmunoglobulina G. H/H: alelo homocigoto H. H/R: alelo heterocigoto. N: número total de individuos de cada epígrafe. n: número de individuos obtenido con esas características. NNAC-B: neumonía neumocócica bacteriémica adquirida en la comunidad. NNAC-B: neumonía neumocócica no bacteriémica adquirida en la comunidad. p: probabilidad. R/R: alelo homocigoto R)

#### 4. Estratificación de la sepsis.

En el análisis multivariante con contraste unilateral ajustado por PSI y hospital de origen, la homocigosidad para el *FCGR2A*-H131 predispuso al desarrollo de formas graves de la sepsis (sepsis grave + shock séptico): la homocigosidad para *FCGR2A*-H131 se encontró en 33 de los 132 (25%) pacientes con NNAC que desarrollaron sepsis grave, comparado con 34 de los 187 (18.2%) pacientes que no la desarrollaron ( $p=0.037$ ;  $OR=1.8$ ,  $>1.05$ ) (tabla 26).

**Tabla 26.- Presentaciones clínicas de gravedad de la NNAC en función de los genotipos del SNP *FCGR2A*-H131R.**

	H/H	H/R+R/R	p <sup>#</sup>
	n (%) *	n (%) *	
<b>Formas graves de sepsis</b>			
<b>Sí (N=132)</b>	33 (25.0)	99 (75.0)	0.037
<b>No (N=187)</b>	34 (18.2)	153 (81.8)	
<b>FRnA</b>			
<b>Sí (N=101)</b>	30 (29.7)	71 (70.3)	0.004
<b>No (N=218)</b>	37 (17.0)	181 (83.0)	
<b>SDMO</b>			
<b>Sí (N=55)</b>	11 (20.0)	44 (80.0)	n.s.
<b>No (N=264)</b>	56 (21.2)	208 (78.8)	
<b>SDRA</b>			
<b>Sí (N=26)</b>	9 (34.6)	17 (65.4)	0.047
<b>No (N=293)</b>	58 (19.8)	235 (80.2)	

\* Los valores son: número de individuos y % sobre el total mostrado

<sup>#</sup> Análisis multivariante con contraste unilateral ajustado por PSI y hospital de origen

(*FCGR2A*: gen del receptor 2A para el fragmento FC de la inmunoglobulina G. FRnA: insuficiencia/fracaso renal agudo. H/H: alelo homocigoto H. H/R: alelo heterocigoto. SDRA: síndrome de distrés respiratorio agudo. H/H: alelo homocigoto H. H/R+R/R: alelos no homocigotos H. N: número total de individuos de cada epígrafe. n: número de individuos obtenido con esas características. NNAC: neumonía neumocócica adquirida en la comunidad. p: probabilidad.)

### **5. Insuficiencia/fracaso renal agudo.**

La homocigosidad para el alelo *FCGR2A*-H131 se asoció significativamente con FRnA tanto en el análisis bivalente (H/H vs. H/R+R/R:  $p=0.009$ ; OR: 2.07; IC 95%[1.14-3.72]) como en un análisis multivariante con contraste unilateral ajustado por PSI y hospital de origen ( $p=0.004$ ; OR=2.32,  $> 1.36$ ): 30 pacientes con NNAC (29'7%) que desarrollaron FRnA eran homocigotos para el *FCGR2A*-H131, comparados con 37 pacientes (17%) con NNAC que no desarrollaron FRnA (tabla 26).

### **6. Síndrome de distrés respiratorio agudo.**

En el análisis multivariante con contraste unilateral ajustado por PSI y hospital de origen, la homocigosidad para el *FCGR2A*-H131 predispuso al desarrollo de SDRA: 9 de los 26 (34.6%) individuos con NNAC que desarrollaron SDRA eran homocigotos para el alelo *FCGR2A*-H131, comparados con 58 (19.8%) de aquellos que no desarrollaron SDRA ( $p=0.047$ ; OR=2.17,  $>1.01$ ) (tabla 26).

### **7. Disfunción multiorgánica.**

No se observó ninguna relación entre el genotipo *FCGR2A*-H131R y el desarrollo de SDMO (eran homocigotos para el alelo H el 20.0% de los pacientes que desarrollaron SDMO frente al 21'2% de los que no lo desarrollaron). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al hacer el análisis, ni en el bivalente ni en el multivariante (tabla 26).

### **8. Mortalidad.**

En ningún caso las diferencias halladas al comparar el porcentaje de homocigotos H en fallecidos frente a supervivientes fueron significativas (15.4% vs. 21.3%). En cuanto a los fallecidos dentro de los 90 días, tampoco aquí se

encontraron diferencias estadísticamente significativas (porcentaje de homocigotos H en fallecidos frente a supervivientes: 21.0% vs. 21.0%) (tabla 27).

**Tabla 27.- Mortalidad de los pacientes con NNAC, estratificados por los genotipos del SNP *FCGR2A*-H131R.**

	HH	HR	RR	
	n (%) <sup>#</sup>	n (%) <sup>#</sup>	n (%) <sup>#</sup>	p
Mortalidad a los 28 días (N=13)	2 (3.0)	8 (4.8)	3 (3.5)	0.87
Mortalidad a los 90 días (N=19)	4 (6.0)	11 (6.6)	4 (4.7)	0.91

<sup>#</sup> Los valores son: número de individuos y % sobre el total (test de  $\chi^2$  o test exacto de Fisher, en caso de necesidad)

(*FCGR2A*: gen del receptor 2A para el fragmento FC de la inmunoglobulina G. H/H: alelo homocigoto H. H/R: alelo heterocigoto. N: número total de individuos de cada epígrafe. n: número de individuos obtenido con esas características. NNAC: neumonía neumocócica adquirida en la comunidad. p: probabilidad. R/R: alelo homocigoto R)

Por último, haciendo un resumen de los hallazgos anteriores, en nuestro estudio se observa que en los individuos homocigotos para el alelo *FCGR2A*-H131, la NNAC conlleva un aumento significativo de riesgo para desarrollar formas graves de sepsis, SDRA y FRnA, y para presentar bacteriemia (tabla 28).

**Tabla 28.- Comparativa de la gravedad entre los subgrupos de NAC (NNAC y NnNAC) en función de la homocigosidad del alelo FCGR2A-H131.**

	H/H		p <sup>#</sup>	OR (IC 95%)
	NNAC (N=67)	NnNAC (N=253)		
	n (%) *	n (%) *		
<b>Formas graves de sepsis</b>				
<b>Sí</b> (N=99)	33 (49.3)	66 (26.1)	0.00027	2.75 (1.51-4.97)
<b>No</b> (N=221)	34 (50.7)	187 (73.9)		
<b>SDRA</b>				
<b>Sí</b> (N=17)	9 (13.4)	8 (3.2)	0.00275	4.75 (1.54-14.73)
<b>No</b> (N=303)	58 (86.6)	245 (96.8)		
<b>FRnA</b>				
<b>Sí</b> (N=94)	30 (44.8)	64 (23.3)	0.00188	2.39 (1.31-4.33)
<b>No</b> (N=226)	37 (55.2)	189 (74.7)		
<b>SDMO</b>				
<b>Sí</b> (N=44)	11 (16.4)	31 (12.3)	n.s.	--
<b>No</b> (N=278)	56 (83.6)	222 (87.7)		
<b>Ingreso en UMI</b>				
<b>Sí</b> (N=84)	29 (43.3)	55 (21.7)	0.00037	2.75 (1.49-5.02)
<b>No</b> (N=236)	38 (56.7)	198 (78.3)		
<b>Bacteriemia</b>				
<b>Sí</b> (N=36)	30 (44.8)	6 (2.4)	0.00000	33.38 (12.35-102.94)
<b>No</b> (N=284)	37 (55.2)	247 (97.6)		

\* Los valores son: número de individuos y % sobre el total mostrado

# Test de  $\chi^2$  o test exacto de Fisher, en caso de necesidad

(FCGR2A: gen del receptor A para el fragmento FC de la inmunoglobulina G<sub>2</sub>. FRnA: insuficiencia/fracaso renal agudo. H/H: alelo homocigoto H. IC: intervalo de confianza. N: número total de individuos de cada epígrafe. n: número de individuos obtenido con esas características. n.s.: no significativo. NAC: neumonía adquirida en la comunidad. NNAC: neumonía neumocócica adquirida en la comunidad. NnNAC: neumonía no neumocócica adquirida en la comunidad. OR: *odds ratio*. p: probabilidad. SDMO: síndrome de disfunción multiorgánica. SDRA: síndrome de distrés respiratorio agudo. UMI: Unidad/Servicio de Medicina Intensiva.)



## **6.- DISCUSIÓN.**



## **6.- DISCUSIÓN.**

En nuestro estudio se confirmó microbiológicamente la NAC en un 41.5% de los pacientes y el microorganismo más frecuentemente aislado fue *S. pneumoniae* (25.3%), lo que coincide con la mayor parte de los estudios publicados hasta la fecha. En cuanto a resultados clínicos, la NNAC-B se asoció significativamente a una mayor gravedad de la enfermedad (evaluada ésta como ingreso en UMI, FRnA, presentación de formas graves de sepsis, SDRA y SDMO), incluso tras ajustar por PSI y hospital de origen en el análisis multivariante. Sin embargo, no encontramos diferencias significativas en lo que respecta a la mortalidad debido al escaso número de fallecidos en nuestro estudio, bastante menor que el aportado en otros estudios similares (tanto españoles como extranjeros).

En lo que respecta al estudio genético, no encontramos asociación entre el SNP *FCGR2A*-H131R y la susceptibilidad a padecer NAC ó NNAC. Sin embargo, en un reciente estudio de Rúa-Figueroa *et al* en el que se evaluó la incidencia de NAC en un grupo de pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) (36 pacientes con NAC frente a 196 pacientes sin NAC) <sup>72</sup>, se encontró que la homocigosidad para *FCGR2A*-H131 era un factor independiente de susceptibilidad para el desarrollo de NAC en aquellos pacientes que no estaban recibiendo inmunosupresores de manera concomitante ( $p=0.03$ , OR: 3.01, IC 95% [1.11-8.15]). Es cierto que la incidencia de NAC es sustancialmente mayor en pacientes con LES que en la población general y que, en el grupo de pacientes analizados en ese estudio, la presencia del genotipo *FCGR2A*-R/R131 fue mayor que en la población control reportada en estudios previos de nuestro grupo (lo que es acorde con otros estudios que afirman que el alelo *FCGR2A*-R predispone a LES). Pero ninguno de estos dos hechos invalida los resultados obtenidos. La explicación aportada por los autores es que, debido a los diferentes niveles de afinidad para la IgG<sub>2</sub> y la P<sup>n</sup>C<sup>n</sup>R de las variantes FcγRIIIa-R y FcγRIIIa-H, el polimorfismo *FCGR2A*-H131R puede jugar un papel dual y

opuesto en la susceptibilidad al LES y en el riesgo de desarrollo de NAC en los pacientes con LES.

Por otra parte, nuestro estudio sí mostró una asociación significativa de la homocigosidad para el alelo *FCGR2A*-H131 con la bacteriemia en adultos con NAC. Puesto que ya se conocía que la homocigosidad para el alelo *FCGR2A*-R131 se asocia con una capacidad reducida de unión con la IgG<sub>2</sub><sup>34 35 73</sup> y que la IgG<sub>2</sub> se considera crucial en el aclaramiento de bacterias encapsuladas, sería de esperar que este genotipo se asociara con un aumento de la susceptibilidad a la NAC y a la bacteriemia; sin embargo, en nuestro estudio no se confirman dichos resultados. En un estudio de 2012, Bouglé *et al*<sup>74</sup> analizaron una serie retrospectiva de 243 pacientes con enfermedad neumocócica invasiva. Al realizar el análisis genotípico encontraron que la homocigosis para el alelo *FCGR2A*-R131 estaba asociada a mejores resultados clínicos (que hay que interpretar como pronóstico) en los pacientes ingresados en UMI. De hecho, la mortalidad de estos pacientes comparada con la de los homocigotos y heterocigotos para el alelo H fue de 14.8% vs. 35.1% (p=0.007).

Varios estudios publicados entre 1994 y 2008 han descrito una elevada frecuencia de homocigosidad para el alelo *FCGR2A*-R131 en niños con infecciones de repetición del tracto respiratorio superior<sup>29 75 76 56</sup>. Sin embargo, en otros no se confirmaron estos resultados<sup>77 78</sup>.

Otros estudios se han dirigido al papel de las variantes del *FCGR2A*-H131R en las infecciones bacterianas respiratorias de los adultos. Yee *et al*<sup>79</sup> estudiaron 70 pacientes con NNAC. En dicho estudio del año 2000 encontraron que los pacientes con NNAC-B (n=42) presentaban mayor frecuencia de homocigotos para el alelo *FCGR2A*-R131 que los controles sanos, aunque observaron un aumento no significativo del genotipo *FCGR2A*-R/R131 al comparar estos pacientes con los que presentaron NNAC-NB. Por el contrario otro estudio publicado en 2006, que incluyó a 55 pacientes con enfermedad neumocócica invasiva (23.6% menores de 15 años), encontró un descenso no significativo de la prevalencia del genotipo *FCGR2A*-R/R131 en sus pacientes con respecto a controles sanos<sup>57</sup>. Más

recientemente (en 2009). Endeman *et al* publicaron los resultados obtenidos al estudiar a 200 pacientes con NAC (60 con NNAC) y no encontraron diferencias entre los pacientes con NAC ó NNAC cuando los compararon con controles sanos <sup>80</sup>. En este estudio el genotipo *FCGR2A*-R/R131 se asoció con sepsis grave. Sin embargo en nuestro estudio, que incluye a 366 pacientes con sepsis grave <sup>81</sup>, no se observó relación entre el SNP *FCGR2A*-H131R y la gravedad o la mortalidad de la NAC. En un estudio de Beppler *et al* <sup>82</sup> cuyos resultados se han publicado en 2015, el alelo *FCGR2A*-R131 fue significativamente más frecuente en pacientes sépticos que en pacientes no infectados y, por tanto, estos datos podrían indicar que el genotipado del gen *FCGR2A* podría ser usado como marcador de susceptibilidad genética para sepsis. En nuestro estudio (1224 controles, 210 pacientes con shock séptico y 366 pacientes con formas graves de sepsis) no se observan los mismos resultados. Es posible que las diferencias en el estudio brasileño estriben en la selección del grupo étnico de los pacientes que, como ya se comentó anteriormente, puede producir sesgos insalvables <sup>19</sup>) o en el tamaño del grupo control (ya que, por otra parte, las frecuencias alélicas de sus grupos no presentan diferencias significativas con el nuestro): llama la atención que, de los dos grupos control empleados en su estudio, sólo en uno de ellos y en la suma de ambos aparezca una tendencia positiva (que no claramente significativa) pero no en la otra aislada. En cualquier caso, hay que recordar que en nuestro estudio sólo fueron evaluados pacientes que desarrollaron sepsis con el único origen de una NAC y, en concreto, sólo en la neumocócica se observaron resultados significativos. Por el contrario, en el mencionado estudio de Beppler el criterio de selección de pacientes fue presentar un cuadro séptico cuyo origen podría estar en cualquier tipo de infección (no especificada en el texto) y, por tanto, con un repertorio de gérmenes causantes no comparable con el de nuestro estudio. Por otra parte, Zúñiga *et al* <sup>83</sup> estudiaron a 91 pacientes con infección por virus influenza A/H1N1 que desarrollaron neumonía grave. En este estudio, publicado en 2012, encontraron que la presencia de homocigosidad para el alelo *FCGR2A*-

H131 era significativamente mayor en estos pacientes que en sus contactos cercanos, los cuales no desarrollaron la enfermedad a pesar de haber estado también expuestos al virus. Este grupo esgrime la hipótesis de que el alelo mencionado tiene un efecto perjudicial en la infección por el virus A/H1N1, posiblemente debido a la activación de la cascada inflamatoria en respuesta a la deposición de inmunocomplejos en el tracto respiratorio.

El tamaño muestral de nuestro estudio es suficiente para detectar el efecto de los genotipos *FCGR2A*-R/R131 y *FCGR2A*-H/H131 sobre la susceptibilidad a la NAC con un OR de 1.29 y 1.3 respectivamente, con un umbral de significación estadística de 0.05 y una potencia estadística del 80%. Y, por tanto, lo anterior hace que las conclusiones extraídas sean fiables. Asimismo, nuestro estudio detectaría una asociación de estos genotipos con la susceptibilidad a la NNAC con un OR mayor de 1.46 y 1.47 para *FCGR2A*-R/R131 y *FCGR2A*-H/H131 respectivamente. En relación con la asociación de la homocigosidad para *FCGR2A*-H131 y la susceptibilidad a la NNAC-B, el poder del test para el OR observado con un nivel de significación estadística del 5% y del 1% fue de 96.6% y 87.8% respectivamente.

Los adultos vacunados con polisacáridos de *S. pneumoniae* producen anticuerpos IgG, fundamentalmente del isotipo IgG<sub>2</sub>, mientras que en niños predomina el IgG<sub>1</sub><sup>84</sup>. Está ampliamente aceptado desde la década de los 80 del pasado siglo, que la deficiencia de IgG<sub>2</sub> predispone a infecciones por bacterias encapsuladas<sup>85 86</sup>. Sin embargo, en la actualidad no está claro el significado de las deficiencias de algunas subclases de IgG, en concreto de la IgG<sub>2</sub>, ya que se ha identificado a individuos con delección de cadenas pesadas de la subclase IgG<sub>2</sub> y con niveles séricos de IgG<sub>2</sub> drásticamente bajos, que permanecen totalmente asintomáticos<sup>87 88</sup>. Como consecuencia, la teoría de una conexión entre la deficiencia de IgG<sub>2</sub> y la susceptibilidad a las infecciones se ha visto claramente cuestionada. En individuos no vacunados, que reflejan la adquisición natural de inmunidad antineumocócica, los anticuerpos polisacáridos antineumocócicos son, en su mayoría, de la subclase IgG<sub>2</sub> hasta los 4 años de edad; a partir de

entonces la proporción de anticuerpos antineumocócicos de esta subclase desciende hasta valores tan bajos como del 20% <sup>89</sup>. A nivel molecular, la IgG<sub>1</sub> es más eficiente que la IgG<sub>2</sub> en la activación de mecanismos efectores, como son la vía clásica de activación del complemento y la fagocitosis mediada por FcγR <sup>87</sup>. Por tanto, es al menos dudoso que los adultos homocigotos para el alelo *FCGR2A*-R131 sean más susceptibles a la infección por neumococo. Y es que, aunque el FcγRIIa-R131 tiene una afinidad reducida por la IgG<sub>2</sub>, lo cual se manifiesta como una menor fagocitosis de bacterias por ella opsonizadas, la unión de grandes inmunocomplejos de IgG<sub>2</sub> es más que suficiente para inducir la producción de citoquinas <sup>90</sup>.

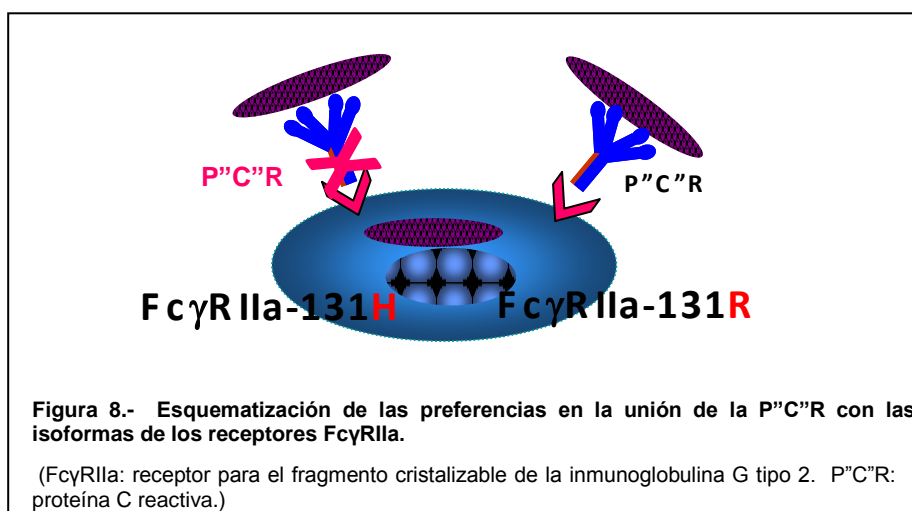
La explicación para la asociación observada entre la homocigosidad para el alelo *FCGR2A*-H131 y la predisposición a la bacteriemia en la NNAC podría ser la diferente afinidad de las variantes *FCGR2A*-H131 y *FCGR2A*-R131 por la P<sup>+</sup>C<sup>+</sup>R<sup>+</sup>: así como el alelo *FCGR2A*-H131 es la única variante capaz de reconocer a la IgG<sub>2</sub> de manera eficiente, en el caso de la IgG<sub>1</sub> el alelo *FCGR2A*-H131 tiene mayor afinidad que el *FCGR2A*-R131, pero su actuación no es exclusiva IgG<sub>1</sub>; y, además, *FCGR2A*-R131 tiene mejores respuestas efectoras frente a las bacterias opsonizadas con P<sup>+</sup>C<sup>+</sup>R<sup>+</sup> que *FCGR2A*-H131. De hecho, en un trabajo reciente de Shimizu *et al* sobre complicaciones infecciosas en pacientes trasplantados hepáticos <sup>55</sup>, en el cuál los pacientes presentan una distribución de frecuencias alélicas muy desplazada hacia los H/H (H/H: 59.6%, H/R: 33.7%, R/R: 6.7%), no consiguieron demostrar diferencias significativas en la incidencia de bacteriemia entre pacientes *FCGR2A*-H/H131 y pacientes *FCGR2A*-131H/R o *FCGR2A*-R/R131. La justificación de estos resultados vendría dada porque la unión preferente de los *FCGR2A*-H/H131 con la IgG<sub>1</sub> podría estar compensada con la baja afinidad de los mismos por la P<sup>+</sup>C<sup>+</sup>R<sup>+</sup>.

En humanos, la P<sup>+</sup>C<sup>+</sup>R<sup>+</sup> es el prototipo de proteína de fase aguda: se une a residuos de fosfocolina presentes en el polisacárido C de la pared celular de *S. pneumoniae* y de otras bacterias <sup>91</sup>. La P<sup>+</sup>C<sup>+</sup>R<sup>+</sup> es reconocida por los FcγRs con una afinidad similar a la observada con las isoformas de

IgG <sup>92</sup>. Una vez que la P<sup>+</sup>C<sup>+</sup>R ha formado un complejo con el ligando se activa la vía clásica del complemento e interactúa con los FcγRs de los leucocitos, estimulando así la fagocitosis y la síntesis de citoquinas <sup>93 94 95</sup>.

En ratones, la P<sup>+</sup>C<sup>+</sup>R es tan sólo un elemento traza. En modelos murinos la P<sup>+</sup>C<sup>+</sup>R humana, bien sea inyectada ó bien sea producida de forma transgénica, es protectora frente a la bacteriemia neumocócica <sup>96 97</sup>. Los resultados de infección intravenosa en modelos murinos sugieren que el efecto protector de la P<sup>+</sup>C<sup>+</sup>R frente al neumococo es independiente de los FcγRs <sup>98</sup>. Sin embargo, recientes trabajos sobre modelos de infección pulmonar han demostrado que el reconocimiento innato del neumococo por la P<sup>+</sup>C<sup>+</sup>R protege contra la infección y aumenta la supervivencia; todo ello a través de la destrucción FcγR-dependiente de las bacterias opsonizadas por la P<sup>+</sup>C<sup>+</sup>R <sup>99</sup>.

El SNP *FCGR2A*-H131R afecta a la capacidad de unión del FcγRIIa con la P<sup>+</sup>C<sup>+</sup>R, la cuál se une preferentemente con la isoforma codificada por el alelo *FCGR2A*-R131 <sup>92 100</sup>. De hecho, algunas de las respuestas de los neutrófilos a la P<sup>+</sup>C<sup>+</sup>R y a los neumococos opsonizados por la P<sup>+</sup>C<sup>+</sup>R (tales como la producción de citoquinas inflamatorias) fueron mayores en células homocigotas para el alelo *FCGR2A*-R131 <sup>101 100</sup>.





La bacteriemia es reconocida como un estado crítico que afecta a la gravedad de la sepsis. Sin embargo, hay datos contradictorios sobre el papel que la bacteriemia neumocócica juega en la gravedad de la NAC: algunos autores han detectado una mortalidad significativamente mayor en los pacientes con bacteriemia <sup>102 103 104 105</sup>, mientras que otros no han sido capaces de reproducir esos resultados <sup>106 107 108</sup>. Estas discrepancias podrían ser debidas, en parte, a las dificultades derivadas de la identificación diagnóstica de casos no bacteriémicos o, en paralelo, a la relativamente baja sensibilidad de la prueba utilizada para demostrar la bacteriemia; esto último subestimaría el número de casos bacteriémicos <sup>106</sup>. En nuestro estudio la mayoría de los casos no bacteriémicos (83%) fueron identificados por medio del antígeno urinario de *S. pneumoniae*, del cuál se ha reportado una alta sensibilidad y especificidad. Incluso en un reciente estudio español, Zalacaín *et al* <sup>109</sup> estudiaron a 350 pacientes con NNAC de dos hospitales del norte de España de acuerdo con su positividad o no a la antigenuria de *Streptococcus pneumoniae*. En dicho estudio se observó que los pacientes con NNAC demostrada por medio de hemocultivo (+), que además tuvieran positividad al test urinario, presentaban mayor porcentaje de ingreso en UMI, de fracaso del tratamiento y de mortalidad a los 30 días; por ello, proponen este test como método fiable de diagnóstico, con similares niveles de evidencia que los hemocultivos dado que no se ve afectado por circunstancias tales como la administración de antibióticos previos.

Entre nuestros pacientes con NNAC se identificó a 85 con NNAC-B, mientras que 234 pacientes fueron NNAC-NB. Rello *et al* investigaron la relación existente entre la carga bacteriana neumocócica y el resultado clínico, y observaron que una alta carga cuantitativa de genoma bacteriano de *S. pneumoniae* en muestras sanguíneas se asociaba con un alto riesgo de muerte<sup>110</sup>. En nuestro estudio, la NNAC-B se asocia con una mayor gravedad de la enfermedad. Otros estudios recientes con tamaños muestrales mayores han aportado datos que refrendan nuestros resultados. Bordon *et al* han publicado en 2015 un estudio de 833 NNAC <sup>102</sup>, de las que

394 eran bacteriémicas; dicho estudio combina dos bases de datos diferentes, una internacional y otra local. Sus resultados sobre mortalidad otorgan un riesgo aumentado de mortalidad intrahospitalaria a las NNAC-B frente a las NNAC-NB (12% vs. 6%;  $p < 0.005$ ) y, aunque parece haber una tendencia, los resultados no fueron significativos en la mortalidad a los 28 días (20% vs. 14%;  $p=0.058$ ). En nuestro país, Capelastegui *et al* publicaron en 2014 los resultados del estudio de 399 pacientes con NNAC-B procedentes de un grupo de 891 pacientes con NNAC reclutados en dos hospitales del norte de España<sup>103</sup>. En dicho trabajo hallaron que las NNAC-B presentan mayores tasas de ventilación mecánica, shock séptico y fracaso del tratamiento, así como mayor mortalidad tanto intrahospitalaria como a los 15 y 30 días.

Abundando en lo anterior, en nuestro estudio el análisis multivariante sugiere que la homocigosidad para el alelo *FCGR2A*-H131 predispone a una mayor gravedad de la NNAC. Sin embargo, nuestro estudio tiene poca potencia para detectar el efecto del genotipo *FCGR2A*-131HH sobre la gravedad y la mortalidad de la enfermedad. No obstante, para los OR observados con un nivel de significación estadística del 5%, la homocigosidad para el *FCGR2A*-H131 se asocia con una predisposición a desarrollar FRnA en pacientes con NNAC con una potencia del 90.49%.

Aunque aún falta para que quede claramente establecido si el *SNP* *FCGR2A*-H131R juega algún papel en la susceptibilidad a la infección por bacterias encapsuladas en niños, la mayor parte de los estudios sugieren la existencia de dicha asociación. La homocigosidad para el alelo *FCGR2A*-R131 también podría estar asociada con un aumento de la susceptibilidad a la meningitis meningocócica, particularmente en pacientes con déficit del complemento<sup>34</sup>. La NAC, fundamentalmente por *S. pneumoniae*, es el mayor asesino de niños menores de cinco años en todo el mundo<sup>111</sup>. Dado que *FCGR2A*-R131 es, curiosamente, la variante con menor afinidad para la IgG<sub>2</sub>, la alta frecuencia de dicha variante hallada en la mayor parte de las poblaciones sería sorprendente salvo que confiriese alguna ventaja selectiva. Aunque no hemos estudiado el papel de *FCGR2A*-H131R en

NNAC en niños, nuestros hallazgos sobre el papel predisponente del *FCGR2A*-H131 (que es la variante con peor afinidad para la PCR) para el desarrollo de NNAC-B en adultos podrían sostener la idea de una selección balanceada: las variantes *FCGR2A*-R131 y *FCGR2A*-H131 pueden mantener sus altas frecuencias en la mayor parte de las poblaciones por un balance de fuerzas selectivas contrarias positivas y negativas, en niños y en adultos. Como es obvio, estas observaciones deberían ser confirmadas en otras poblaciones.

A pesar de la demostrada relevancia funcional del *FCGR2A*-H131R para unirse a IgG<sub>2</sub> y PCR, no se puede excluir formalmente la existencia de desequilibrio de ligamiento con las variantes de los genes que codifican para los receptores Fcγ ó con otros genes en la región del cromosoma 1, lo que podría influir en nuestros resultados.

Por otro lado, la trombopenia es realmente frecuente en la sepsis y suele estar producida por coagulación intravascular diseminada, de mayor o menor entidad. Pero no es menos importante que, además, la sepsis se caracteriza por un estado de hipercoagulabilidad que tiene efectos deletéreos a corto-medio plazo sobre los individuos afectados. La oclusión de la microvascularización juega un papel importante en la disfunción orgánica, local y a distancia, que aparece en estos pacientes. Sobre ese estado de hipercoagulabilidad aparece también un mecanismo de activación plaquetaria que, además, está mediado por receptores Fcγ. El FcγRIIa se expresa en las plaquetas humanas, hace de intermediario en la trombopenia inducida por heparina y participa en la activación plaquetaria inducida por el factor von Willebrand <sup>112</sup>. Cuando las plaquetas son estimuladas con altas concentraciones de trombina la agregación se produce con independencia del FcγRIIa; sin embargo, la contribución de éste último es particularmente relevante cuando las plaquetas son estimuladas con bajas dosis de trombina o con análogos del tromboxano A<sub>2</sub>. Un buen ejemplo de la relación existente entre las plaquetas, la lesión orgánica y la gravedad en la evolución de una enfermedad infecciosa fue la pandemia de gripe H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> de 2009. En los pacientes más graves se observó una inflamación exacerbada

de la vía aérea que produjo daño tisular y pérdida progresiva de la función respiratoria. Durante su estudio se postuló que una gran parte de los síntomas y de la gravedad de esta gripe estarían causados, o al menos en relación, con la excesiva producción de citoquinas e inmunocomplejos. Además, en esta infección, la trombopenia asociada se considera fehacientemente como un factor de riesgo de mortalidad. Uno de los orígenes de dicha trombopenia podría ser el secuestro plaquetario en órganos muy específicos, como los pulmones o el bazo. De hecho, en las autopsias de pacientes fallecidos por influenza se observa trombosis de la vascularización pulmonar de manera habitual. En una publicación de 2015 de Boilard *et al* se describe que el virus influenza H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> promueve la activación plaquetaria, por un lado, por medio de la formación de inmunocomplejos y estímulo de los receptores FcγRIIa y, por otro lado, por medio de la activación de la trombina <sup>113</sup>; y, físicamente, los autores observaron un importante acúmulo de plaquetas en el lavado broncoalveolar de ratones infectados por el virus H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>. Pero es que, además, las propias plaquetas pueden jugar un papel principal en la destrucción de determinadas bacterias. Riaz *et al* publicaron en 2012 los resultados de un estudio en que observaron que las plaquetas podían destruir primariamente a bacterias *E. coli* por medio de una internalización dependiente de FcγRIIa; si bien es cierto que describen que la mayor parte del mecanismo de destrucción se producía por la liberación de proteínas plaquetarias microbicidas tras la activación de dichas plaquetas <sup>114</sup>. En cualquier caso el papel de las plaquetas y su relación con el FcγRIIa es indudable, y la gravedad de la sepsis asociada con la trombopenia por consumo de plaquetas activadas abre nuevos campos a la investigación.

## **7.- CONCLUSIONES.**



## **7.- CONCLUSIONES.**

Nuestros resultados no respaldan que el polimorfismo *FCGR2A-H131R* juegue algún papel en la susceptibilidad a la neumonía adquirida en la comunidad (NAC) o a la neumonía neumocócica adquirida en la comunidad (NNAC). Sin embargo, proporcionamos datos de que la homocigosidad para *FCGR2A-H131* predispone a padecer neumonía neumocócica adquirida en la comunidad bacteriémica (NNAC-B) lo que, en nuestro estudio, está asociado con una mayor gravedad.

Así pues, con respecto a la NAC, podemos concluir que:

1. El genotipo *FCGR2A-R/R131* no se asocia a una mayor susceptibilidad a NAC.
2. El genotipo *FCGR2-R/R131* no se asocia a un peor pronóstico en pacientes con NAC.
3. El genotipo *FCGR2A-R/R131* no se asocia a una mayor predisposición a bacteriemia en pacientes con NAC.

Y con respecto a la NNAC, concluimos que:

4. El genotipo *FCGR2A-R/R131* no se asocia a una mayor susceptibilidad a NNAC.
5. La homocigosidad para el alelo *FCGR2A-H131* predispone a padecer NNAC-B.
6. La homocigosidad para el alelo *FCGR2A-H131* se asocia con una mayor gravedad en pacientes con NNAC y, por tanto, con un peor pronóstico.

Asimismo hemos observado y, por tanto, concluimos que:

7. No existe desequilibrio de ligamiento (DL) entre los genes *FCGR2A*, *FCGR3A* y *FCGR3B*. Por tanto, se descarta que los resultados obtenidos para *FCGR2A* en cuanto a gravedad se

deban a DL con los polimorfismos funcionales estudiados de los otros dos genes.

8. La homocigosidad para el alelo *FCGR3A*-V158 se asocia con mayor susceptibilidad a NNAC. Sin embargo, dado que el estudio no se diseñó específicamente para este fin, sería deseable incidir en este propósito con nuevos estudios que permitan obtener conclusiones firmes acerca de esta asociación.



## **8.- BIBLIOGRAFÍA.**



## **8.- BIBLIOGRAFÍA**

1. Rozenbaum MH, Mangen M-JJ, Huijts SM, van der Werf TS, Postma MJ. Incidence, direct costs and duration of hospitalization of patients hospitalized with community acquired pneumonia: A nationwide retrospective claims database analysis. *Vaccine* 2015; 33(28):3193-9.
2. Capelastegui A, España PP, Bilbao A *et al.* Study of community-acquired pneumonia: Incidence, patterns of care, and outcomes in primary and hospital care. *J Infect* 2010; 61(5):364-71.
3. Cavallazzi R, Wiemken T, Arnold FW *et al.* Outcomes in patients with community-acquired pneumonia admitted to the intensive care unit. *Respir Med* 2015; 109(6):743-50.
4. Georges H, Journaux Cc, Devos P *et al.* Improvement in process of care and outcome in patients requiring intensive care unit admission for community acquired pneumonia. *BMJ Infect Dis* 2013; 13:196.
5. Capelastegui A, España P, Quintana J *et al.* Pacientes ingresados por neumonía adquirida en la comunidad: estudio comparativo en función de la especialidad del servicio médico responsable. *Archivos de Bronconeumología* 2005; 41(06):300-6.
6. Rodríguez de Castro F. Influencia de la especialidad en el manejo de la neumonía hospitalizada. *Archivos de Bronconeumología* 2005; 41(06):297-9.
7. Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A *et al.* Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society Consensus Guidelines on the Management of Community-Acquired Pneumonia in Adults. *Clin Infect Dis* 2007; 44(s2):S27-S72.

8. Spoorenberg SM, Bos WJW, Heijligenberg R *et al.* Microbial aetiology, outcomes, and costs of hospitalisation for community-acquired pneumonia; an observational analysis. *BMC Infect Dis* 2014; 14:335.
9. Alan M, Grolimund E, Kutz A *et al.* Clinical risk scores and blood biomarkers as predictors of long-term outcome in patients with community-acquired pneumonia: a 6-year prospective follow-up study. *J Intern Med* 2015; 278(2):174-84.
10. Tejerina E, Esteban A, Fernández-Segoviano P, Rodríguez-Barbero JM *et al.* Clinical diagnoses and autopsy findings: discrepancies in critically ill patients. *Crit Care Med* 2012; 40:842-6.
11. Hunt CR, Benbow EW, Knox WF, McMahon RF, McWilliam LJ. Can histopathologists diagnose bronchopneumonia? *J Clin Pathol* 1995; 48(2):120-3.
12. Picard C, Puel A, Bustamante J, Ku C-L, Casanova J-L. Primary immunodeficiencies associated with pneumococcal disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003; 3(6):451-9.
13. Guttmacher AE, Collins FS. Genomic medicine - A primer. *N Engl J Med* 2002; 347(19):1512-20.
14. Sorensen TIA, Nielsen GG, Andersen PK, Teasdale TW. Genetic and Environmental Influences on Premature Death in Adult Adoptees. *N Engl J Med* 1988; 318(12):727-32.
15. Sirgo G, Rello J, Bodi M *et al.* Polimorfismo genético en el paciente crítico (I). Aspectos generales, inflamación y sepsis. *Medicina Intensiva* 2003; 27(1):24-31.
16. Lin MT, Albertson TE. Genomic polymorphisms in sepsis. *Crit Care Med* 2004; 32(2):569-79.

17. Holmes CL, Russell JA, Walley KR. Genetic polymorphisms in sepsis and septic shock: Role in prognosis and potential for therapy. *Chest* 2003; 124(3):1103-15.
18. Papathanassoglou ED, Giannakopoulou MD, Bozas E. Genomic Variations and Susceptibility to Sepsis. *AACN Advanced Critical Care* 2006; 17(4):394-422.
19. Hirschhorn JN, Lohmueller K, Byrne E, Hirschhorn K. A comprehensive review of genetic association studies. *Genet Med* 2002; 4(2):45-61.
20. Turvey SE, Broide DH. Chapter 2: Innate Immunity. 2010; 125(Suppl 2):S24-S32.
21. Medzhitov R, Janeway Jr CA. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 1997; 9(1):4-9.
22. Medzhitov R, Janeway C. Innate Immunity. *N Engl J Med* 2000; 343(5):338-44.
23. Akula S, Mohammadamin S, Hellman L. Fc Receptors for Immunoglobulins and Their Appearance during Vertebrate Evolution. *PLoS One* 2014; 9(5):e96903.
24. Ferrer Agüero JM, Millán S, Rodríguez de Castro F, Martín-Loeches I, Solé-Violán J. Neumonía adquirida en la comunidad: variantes génicas implicadas en la inflamación sistémica. *Medicina Intensiva* 2014; 38(5):315-23.
25. Surbatovic M, Veljovic M, Jevdjic J, Popovic N, Djordjevic D, Radakovic S. Immunoinflammatory Response in Critically Ill Patients: Severe Sepsis and/or Trauma. *Mediators Inflamm* 2013; 362793.

26. Sutherland AM, Walley KR, Russell JA. Polymorphisms in CD14, mannose-binding lectin, and Toll-like receptor-2 are associated with increased prevalence of infection in critically ill adults. *Crit Care Med* 2005; 33(3):638-44.
27. Hubacek JA, Stüber F, Fröhlich D *et al.* The common functional C(-159)T polymorphism within the promoter region of the lipopolysaccharide receptor CD14 is not associated with sepsis development or mortality. *Genes Immun* 2000; 1(6):405-7.
28. Heesen M, Bloemeke B, Schade U, Obertacke U, Majetschak M. The -260 C→T promoter polymorphism of the lipopolysaccharide receptor CD14 and severe sepsis in trauma patients. *Intensive Care Med* 2002; 28(8):1161-3.
29. Yuan FF, Marks K, Wong M *et al.* Clinical relevance of TLR2, TLR4, CD14 and Fc[gamma]RIIA gene polymorphisms in *Streptococcus pneumoniae* infection. *Immunol Cell Biol* 2008; 86(3):268-70.
30. Hawn TR, Verbon A, Lettinga KD *et al.* A Common Dominant TLR5 Stop Codon Polymorphism Abolishes Flagellin Signaling and Is Associated with Susceptibility to Legionnaires' Disease. *J Exp Med* 2003; 198(10):1563-72.
31. García-Laorden MI, Solé-Violán J, de Castro FR *et al.* Mannose-binding lectin and mannose-binding lectin-associated serine protease 2 in susceptibility, severity, and outcome of pneumonia in adults. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122(2):368-74.
32. García-Laorden MI, Rodríguez de Castro F, Solé-Violán J *et al.* The role of mannose-binding lectin in pneumococcal infection. *Eur Respir J* 2013; 41(1):131-9.

33. Bruhns P, Iannascoli B, England P *et al.* Specificity and affinity of human Fc[gamma] receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* 2009; 113:3716-25.
34. van Sorge NM, van der Pol WL, van de Winkel JG. FcgammaR polymorphisms: Implications for function, disease susceptibility and immunotherapy. *Tissue Antigens* 2003; 61(3):189-202.
35. Parren PW, Warmerdam PA, Boeije LC *et al.* On the interaction of IgG subclasses with the low affinity Fc gamma RIla (CD32) on human monocytes, neutrophils, and platelets. Analysis of a functional polymorphism to human IgG2. *J Clin Invest* 1992; 90(4):1537-46.
36. Lehrnbecher T, Foster CB, Zhu S *et al.* Variant Genotypes of the Low-Affinity Fcgamma Receptors in Two Control Populations and a Review of Low-Affinity Fcgamma Receptor Polymorphisms in Control and Disease Populations. *Blood* 1999; 94(12):4220-32.
37. de Haas M. IgG-Fc receptors and the clinical relevance of their polymorphisms. *Wien Klin Wochenschr* 2001; 113(20-21):825-31.
38. Bux J, Stein E-L, Bierling P *et al.* Characterization of a New Alloantigen (SH) on the Human Neutrophil Fcgamma receptor IIIb. *Blood* 1997; 89(3):1027-34.
39. Ma P, Chen D, Pan J, Du B. Genomic polymorphism within interleukin-1 family cytokines influences the outcome of septic patients. *Crit Care Med* 2002; 30(5):1046-50.
40. Schluter B, Raufhake C, Erren M *et al.* Effect of the interleukin-6 promoter polymorphism (-174 G/C) on the incidence and outcome of sepsis. *Crit Care Med* 2002; 30(1):32-7.

41. Martín-Loeches I, Solé-Violán J, Rodríguez de Castro F *et al.* Variants at the promoter of the interleukin-6 gene are associated with severity and outcome of pneumococcal community-acquired pneumonia. *Intensive Care Med* 2012; 38(2):256-62.
42. Waterer GW, ElBahlawan L, Quasney MW, Zhang Q, Kessler LA, Wunderink RG. Heat shock protein 70-2+1267 AA homozygotes have an increased risk of septic shock in adults with community-acquired pneumonia. *Crit Care Med* 2003; 31(5):1367-72.
43. Arnalich F, López-Maderuelo D, Codoceo R *et al.* Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism and mortality in patients with severe sepsis. *Clin Exp Immunol* 2002; 127(2):331-6.
44. Gallagher PM, Lowe G, Fitzgerald T *et al.* Association of IL-10 polymorphism with severity of illness in community acquired pneumonia. *Thorax* 2003; 58(2):154-6.
45. Lowe PR, Galley HF, Abdel-Fattah A, Webster NR. Influence of interleukin-10 polymorphisms on interleukin-10 expression and survival in critically ill patients. *Crit Care Med* 2003; 31(1):34-8.
46. Stuber F. Another definite candidate gene for genetic predisposition of sepsis: Interleukin-10. *Crit Care Med* 2003; 31(1):314-5
47. Gordon AC, Lagan AL, Aganna E *et al.* TNF and TNFR polymorphisms in severe sepsis and septic shock: a prospective multicentre study. *Genes and Immunity* 2004; 5(8):631-40.
48. Morimoto S, Okaishi K, Onishi M *et al.* Deletion allele of the angiotensin-converting enzyme gene as a risk factor for pneumonia in elderly patients. *Am J Med* 2002; 112(2):89-94.
49. García-Laorden MI, Rodríguez de Castro F, Solé-Violán J *et al.* Influence of genetic variability at the surfactant proteins A and D in community-acquired pneumonia: a prospective, observational, genetic study. *Critical Care* 2011; 15(1):R57.



50. Herrera-Ramos E, López-Rodríguez M, Ruíz-Hernández JJ *et al.* Surfactant protein A genetic variants associate with severe respiratory insufficiency in pandemic influenza A virus infection. *Critical Care* 2014; 18(3):R127.
51. Hermans PWM, Hazelzet JA. Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 Gene Polymorphism and Sepsis. *Clin Infect Dis* 2005; 41(Supplement 7):S453-S458.
52. Yende S, Angus DC, Ding J *et al.* 4G/5G Plasminogen Activator Inhibitor-1 Polymorphisms and Haplotypes Are Associated with Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176(11):1129-37.
53. Madách K, Aladzsity I, Szilágyi Á *et al.* 4G/5G polymorphism of PAI-1 gene is associated with multiple organ dysfunction and septic shock in pneumonia induced severe sepsis: prospective, observational, genetic study. *Critical Care* 2010; 14(2):R79.
54. Platonov AE, Shipulin GA, Vershinina IV, Dankert J, van de Winkel JG, Kuijper EJ. Association of human Fc gamma RIIa (CD32) polymorphism with susceptibility to and severity of meningococcal disease. *Clin Infect Dis.* 1998; 27(4):746-50.
55. Shimizu S, Tanaka Y, Tazawa H *et al.* Fc-Gamma Receptor Polymorphisms Predispose Patients to Infectious Complications After Liver Transplantation. *American Journal of Transplantation* 2015; XX:1-9.
56. Sanders LAM, van de Winkel JGJ, Rijkers GT *et al.* Fcγ Receptor IIa (Cd32) Heterogeneity In Patients With Recurrent Bacterial Respiratory Tract Infections. *J Infect Dis* 1994; 170(4):854-61.
57. Moens L, Van Hoeyveld E, Verhaegen J, De Boeck K, Peetermans WE, Bossuyt X. Fcγ-receptor IIA genotype and invasive pneumococcal infection. *Clin Immunol.* 2006; 118(1):20-3.

58. Niederman MS, Mandell LA, Anzueto A *et al.* Guidelines for the Management of Adults with Community-acquired Pneumonia . Diagnosis, Assessment of Severity, Antimicrobial Therapy, and Prevention. Am J Respir Crit Care Med 2001; 163(7):1730-54.
59. Bone RC, Balk RA, Cerra FB *et al.* Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest 1992; 101(6):1644-55.
60. Levy MM, Fink MP, Marshall JC *et al.* 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. Intensive Care Med. 2003; 29(4):530-8.
61. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM *et al.* Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock: 2008. Intensive Care Med. 2008; 34(1):17-60.
62. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL *et al.* The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination.: American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. Am J Respir Crit Care Med 1994; 149(3):818-24.
63. Fine MJ, Auble TE, Yealy DM *et al.* A Prediction Rule to Identify Low-Risk Patients with Community-Acquired Pneumonia. N Engl J Med 1997; 336(4):243-50.
64. Blin N, Stafford DW. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. Nucleic Acids Res 1976; 3(9):2303-8.

65. Jiang XM , Arepally G , Poncz M , McKenzie SE. Rapid detection of the Fc gamma RIIA-H/R 131 ligand-binding polymorphism using an allele-specific restriction enzyme digestion (ASRED). *J Immunol Methods* 1996; 199(1):55-9.
66. Kuwano ST, Bordin JO, Chiba AK *et al.* Allelic polymorphisms of human Fcγ receptor IIa and Fcγ receptor IIIb among distinct groups in Brazil. *Transfusion (Paris)* 2000; 40(11):1388-92.
67. Hessner MJ, Curtis BR, Endean DJ, Aster RH. Determination of neutrophil antigen gene frequencies in five ethnic groups by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. *Transfusion* 1996; 36(10):895-9.
68. García-Laorden MI, García-Saavedra A, de Castro FR *et al.* Low clinical penetrance of mannose-binding lectin-associated serine protease 2 deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118(6):1383-6.
69. Solé-Violán J, Rodríguez de Castro F, García-Laorden MI *et al.* Genetic variability in the severity and outcome of community-acquired pneumonia:. *Respir Med* 2010; 104(3):440-7.
70. Bartlett JG, Dowell SF, Mandell LA, File JrTM, Musher DM, Fine MJ. Practice Guidelines for the Management of Community-Acquired Pneumonia in Adults. *Clin Infect Dis* 2000; 31(2):347-82.
71. Mandell LA, Bartlett JG, Dowell SF, File JrTM, Musher DM, Whitney C. Update of Practice Guidelines for the Management of Community-Acquired Pneumonia in Immunocompetent Adults. *Clin Infect Dis* 2003; 37(11):1405-33.
72. Rúa-Figueroa I, Nóvoa J, García-Laorden MI *et al.* Clinical and Immunogenetic Factors Associated with Pneumonia in Patients with Systemic Lupus Erythematosus: A Case-Control Study. *J Rheumatol* 2014; 41(9):1801-7.

73. Bruhns P, Iannascoli B, England P *et al.* Specificity and affinity of human Fc{gamma} receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* 2009; 113(16):3716-25.
74. Bouglé A, Max A, Mongardon N *et al.* Protective effects of *FCGR2A* polymorphism in invasive pneumococcal diseases. *Chest* 2012; 142(6):1474-81.
75. Ozturk C, Aksu G, Berdeli A, Kutukculer N. Clinical and Experimental Medicine: Fc gamma RIIa, IIIa and IIIb polymorphisms in Turkish children susceptible to recurrent infectious diseases. 2006; 6(1):27-32.
76. Wiertsema SP, Veenhoven RH, Walraven V *et al.* Pneumococcal vaccine efficacy for mucosal pneumococcal infections depends on Fcγ receptor IIa polymorphism. *Vaccine* 2006; 24(6):792-7.
77. Bossuyt X, Moens L, Van Hoeyveld E *et al.* Coexistence of (Partial) Immune Defects and Risk of Recurrent Respiratory Infections. *Clin Chem* 2007:124-30.
78. Straetemans M, Wiertsema S, Sanders EM *et al.* Immunological Status in the Aetiology of Recurrent Otitis Media with Effusion: Serum Immunoglobulin Levels, Functional Mannose-Binding Lectin and Fc Receptor Polymorphisms for IgG. *J Clin Immunol* 2005; 25(1):78-86.
79. Yee AMF, Phan HM, Zuniga R, Salmon JE, Musher DM. Association Between FcγRIIa-R131 Allotype and Bacteremic Pneumococcal Pneumonia. *Clin Infect Dis* 2000; 30(1):25-8.
80. Endeman H, Cornips MCA, Grutters JC *et al.* The Fc{gamma} Receptor IIA-R/R131 Genotype Is Associated with Severe Sepsis in Community-Acquired Pneumonia. *Clin Vaccine Immunol.* 2009; 16(7):1087-90.

81. Solé-Violán J, García-Laorden MI, Marcos-Ramos JA *et al.* The Fc[gamma] receptor IIA-H/H131 genotype is associated with bacteremia in pneumococcal community-acquired pneumonia. *Crit Care Med* 2011; 39(6):1388-93.
82. Beppler J, Koehler-Santos P, Pasqualim G *et al.* Inflammation: Fc Gamma Receptor IIA (CD32A) R131 Polymorphism as a Marker of Genetic Susceptibility to Sepsis. *Inflammation* 2015; 1-8.
83. Zúniga J, Buendía-Roldán I, Zhao Y *et al.* Genetic variants associated with severe pneumonia in A/H1N1 influenza infection. *Eur Respir J* 2012; 39(3):10.1183/09031936.00020611.
84. Lottenbach KR, Mink CM, Barenkamp SJ, Anderson EL, Homan SM, Powers DC. Age-Associated Differences in Immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG2 Subclass Antibodies to Pneumococcal Polysaccharides following Vaccination. *Infect Immun* 1999; 67(9):4935-8.
85. Rijkers GT, Sanders LA, Zegers BJ. Anti-capsular polysaccharide antibody deficiency states. *Immunodeficiency* 1993; 5:1-21.
86. Umetsu DT, Ambrosino DM, Quinti I, Siber GR, Geha RS. Recurrent Sinopulmonary Infection and Impaired Antibody Response to Bacterial Capsular Polysaccharide Antigen in Children with Selective IgG-Subclass Deficiency. *N Engl J Med* 1985; 313(20):1247-51.
87. Maguire G, Kumararatne D, Joyce H. Are there any clinical indications for measuring IgG subclasses? *Ann Clin Biochem* 2002; 39(4):374-7.
88. Buckley R. Current Allergy and Asthma Reports: Immunoglobulin G subclass deficiency: Fact or fancy? *Curr Allergy Asthma Rep* 2002; 2(5):356-60.

89. Schauer U, Stemberg F, Rieger CHL *et al.* Levels of Antibodies Specific to Tetanus Toxoid, Haemophilus influenzae Type b, and Pneumococcal Capsular Polysaccharide in Healthy Children and Adults. Clin Diagn Lab Immunol 2003; 10(2):202-7.
90. Vogelpoel LTC, Baeten DLP, de Jong EC, den Dunnen J. Control of Cytokine Production by Human Fc Gamma Receptors: Implications for Pathogen Defense and Autoimmunity. Front Immunol 2015; 6:79.
91. Volanakis JE. Human C-reactive protein: expression, structure, and function. Mol Immunol 2001; 38(2-3):189-97.
92. Lu J, Marnell LL, Marjon KD, Mold C, Du Clos TW, Sun PD. Structural recognition and functional activation of FcγR by innate pentraxins. Nature 2008; 456(7224):989-92.
93. Bharadwaj D, Stein M-P, Volzer M, Mold C, Clos TWD. The Major Receptor for C-Reactive Protein on Leukocytes Is Fcγ Receptor II. J Exp Med 1999; 190(4):585-90.
94. Chi M, Tridandapani S, Zhong W, Coggeshall KM, Mortensen RF. C-Reactive Protein Induces Signaling Through Fc{gamma}RIIa on HL-60 Granulocytes. J Immunol 2002; 168(3):1413-8.
95. Stein M-P, Mold C, Du Clos TW. C-Reactive Protein Binding to Murine Leukocytes Requires Fc{gamma} Receptors. J Immunol 2000; 164(3):1514-20.
96. Mold C, Nakayama S, Holzer TJ, Gewurz H, Du Clos TW. C-reactive protein is protective against Streptococcus pneumoniae infection in mice. J Exp Med 1981; 154(5):1703-8.
97. Szalai A, Briles D, Volanakis J. Human C-reactive protein is protective against fatal Streptococcus pneumoniae infection in transgenic mice. J Immunol 1995; 155(5):2557-63.

98. Mold C, Rodic-Polic B, Du Clos TW. Protection from *Streptococcus pneumoniae* Infection by C-Reactive Protein and Natural Antibody Requires Complement But Not Fc{gamma} Receptors. *J Immunol* 2002; 168(12):6375-81.
99. Thomas-Rudolph D, Du Clos TW, Snapper CM, Mold C. C-Reactive Protein Enhances Immunity to *Streptococcus pneumoniae* by Targeting Uptake to Fc{gamma}R on Dendritic Cells. *J Immunol* 2007; 178(11):7283-91.
100. Stein M-P, Edberg JC, Kimberly RP *et al.* C-reactive protein binding to FcγRIIa on human monocytes and neutrophils is allele-specific. *J Immunol* 2000; 105(3):369-76.
101. Mold C, Du Clos TW. C-Reactive Protein Increases Cytokine Responses to *Streptococcus pneumoniae* through Interactions with Fc{gamma} Receptors. *J Immunol* 2006; 176(12):7598-604.
102. Bordon JM, Fernandez-Botran R, Wiemken TL *et al.* Bacteremic pneumococcal pneumonia: clinical outcomes and preliminary results of inflammatory response. *Infection* 2015; 1-10. DOI 10.1007/s15010-015-0837-z
103. Capelastegui A, Zalacain R, Bilbao A *et al.* Pneumococcal pneumonia: differences according to blood culture results. *BMC Pulm Med* 2014; 14:128.
104. Musher D, Alexandraki I, Graviss EA *et al.* Bacteremic and Nonbacteremic Pneumococcal Pneumonia: A Prospective Study. *Medicine (Baltimore)* 2000; 79(4):210-21.
105. Watari M, Ohe M, Kunitomo E, Tsukamoto R, Komagata H. Mortality and prognostic factors in patients with community-acquired pneumonia: an analysis of 231 cases. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi* 2000; 38(7):509-17.

106. van Mens SP, van Deursen AMM, de Greeff SC *et al.* Bacteraemic and non-bacteraemic/urinary antigen-positive pneumococcal community-acquired pneumonia compared. *Eur J of Clin Microbiol Infect Dis* 2015; 34(1):115-22.
107. Jover F, Cuadrado J-M, Andreu L *et al.* A comparative study of bacteremic and non-bacteremic pneumococcal pneumonia. *Eur J Intern Med* 2008; 19(1):15-21.
108. Brandenburg JA, Marrie TJ, Coley CM *et al.* Clinical Presentation, Processes and Outcomes of Care for Patients with Pneumococcal Pneumonia. *J Gen Intern Med* 2000; 15(9):638-46.
109. Zalacain R, Capelastegui A, Ruiz LA *et al.* Streptococcus pneumoniae antigen in urine: Diagnostic usefulness and impact on outcome of bacteraemic pneumococcal pneumonia in a large series of adult patients. *Respirology* 2014; 19(6):936-43.
110. Rello J, Lisboa T, Lujan M *et al.* Severity of pneumococcal pneumonia associated with genomic bacterial load. *Chest* 2009; 136(3):832-40.
111. O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP *et al.* Burden of disease caused by Streptococcus pneumoniae in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet* 2009; 374(9693):893-902.
112. Canobbio I, Stefanini L, Guidetti GF, Balduini C, Torti M. A new role for FcγRIIA in the potentiation of human platelet activation induced by weak stimulation. *Cell Signal* 2006; 18(6):861-70.
113. Boilard E, Paré G, Rousseau M *et al.* Influenza virus H1N1 activates platelets through FcγRIIA signaling and thrombin generation. *Blood* 2014; 123(18):2854-63.
114. Riaz AH, Tasma BE, Woodman ME, Wooten RM, Worth RG. Human platelets efficiently kill IgG-opsonized *E. coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012; 65(1):78-83.