

III. PACIENTES Y MÉTODOS

III.1. PACIENTES

El presente estudio se llevó a cabo en todos los pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) que ingresaron, por episodios de neumonía, en las Unidades de Infecciones de los Servicios de Medicina Interna de los Hospitales Universitarios “Virgen de las Nieves” (Granada) y “Ciudad de Jaén” (Jaén), durante el periodo comprendido entre Enero de 1991 y Diciembre de 1998.

III.1.1.CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Pacientes mayores de 14 años.
- Pacientes usuarios de drogas por vía parenteral infectados por VIH.
- Pacientes con evidencia clínica y radiológica de neumonía.

III.1.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Pacientes con neumonía nosocomial.
- Pacientes con neumonía por *Pneumocystis carinii* (NPC), micobacterias, hongos o virus.
- Pacientes con neumonía no filiada y tratados con cotrimoxazol.
- Pacientes con endocarditis derecha, infección pulmonar metastásica o neumonitis obstructiva por neoplasia.
- Pacientes con alteraciones radiológicas atribuibles a insuficiencia cardíaca congestiva, embolismos pulmonares o enfermedad pulmonar crónica subyacente.
- Pacientes con neumonía por aspiración

III.2. MÉTODOS

III.2.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se llevó a cabo un estudio observacional mixto. Así se realizó, por una parte, un análisis retrospectivo de las historias clínicas de todos los pacientes ingresados desde Enero de 1991 hasta Diciembre de 1997 y, por otra parte, se estableció un protocolo prospectivo de recogida de datos para los todos pacientes ingresados entre Enero de 1998 y Diciembre de 1998.

III.2.2. PROTOCOLO

Los sujetos que cumplieron los requisitos anteriormente citados fueron reclutados y en base a un protocolo diseñado se recogieron de las historias clínicas de cada paciente, los siguientes datos:

1) **Datos demográficos:**

- a) Edad.
- b) Sexo.

2) **Datos relacionados con la infección por VIH y antecedentes:**

- a) Práctica o conducta de riesgo para la adquisición de la infección por VIH.
- b) Tiempo de evolución desde el diagnóstico de la infección por el VIH (meses) hasta el momento del ingreso.
- c) Infecciones oportunistas pulmonares previas (neumonía por *Pneumocystis carinii* y tuberculosis).
- d) Estadio clínico previo al ingreso según la clasificación de los *Centers for Disease Control and Prevention*⁸².

- e) Recuento de linfocitos CD4 obtenido en los tres meses anteriores al ingreso o durante el ingreso en el caso de no disponer de una cifra previa.
- f) Tratamiento antirretroviral actual que realizaba el paciente, siempre que tuviera una duración superior al mes.
- g) Profilaxis primaria o secundaria frente a *P. carinii* que realizaba el paciente, siempre que tuviera una duración superior al mes.
- h) Estado funcional del paciente determinado por la escala de *Karnofsky*¹⁵⁸.
- i) Consumo de tabaco.
- j) Ingesta enólica.
- k) Antecedente de neumonía previa.

3) Síntomas y signos clínicos de neumonía al ingreso:

- a) Fiebre.
- b) Escalofríos.
- c) Tos.
- d) Expectorcación.
- e) Dolor torácico.
- f) Disnea.
- g) Tensión arterial (mm Hg).
- h) Frecuencia cardíaca.
- i) Frecuencia respiratoria.
- j) Alteración del estado mental.

4) Características radiológicas al ingreso:

- a) Patrón radiológico (alveolar, intersticial o mixto).
- b) Localización del infiltrado (unilobular, multilobular, unilateral o bilateral).
- c) Derrame pleural.
- d) Cavitación.
- e) Absceso.
- f) Neumotórax.

5) Pruebas complementarias de laboratorio al ingreso:

- a) Estudio hematimétrico (hemoglobina, hematocrito, fórmula y recuento leucocitario, plaquetas).
- b) Estudio de coagulación.
- c) Bioquímica general (glucosa, urea, creatinina, sodio, potasio, LDH, proteínas totales, albúmina, triglicéridos y VSG).
- d) Gasometría arterial.

6) Estudios microbiológicos:

- a) Tinción de Gram y cultivo de esputo.
- b) Investigación de micobacterias en esputo.
- c) Hemocultivos.
- d) Estudio serológico (*Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila* y *Coxiella burnetti*)
- e) En presencia de derrame pleural significativo (mayor de 10 mm de espesor de líquido en la proyección en decúbito lateral del

mismo lado), se realizó toracocentesis y se determinaron en líquido pleural: citología (número de células totales, número de neutrófilos y linfocitos y sus respectivos valores porcentuales), bioquímica del líquido (pH, glucosa, proteínas, LDH, ADA, y los correspondientes cocientes líquido pleural/suero), tinción de Gram y cultivo para aerobios y anaerobios e investigación de micobacterias.

- e) En los casos en que se realizó fibrobroncoscopia, se remitieron muestras para cultivo e investigación de micobacterias y *P. carinii*.

7) Tratamiento antibiótico inicial:

- a) Tipo de antibiótico.
- b) Duración del tratamiento.
- c) Adecuación del tratamiento al microorganismo identificado.

8) Datos evolutivos:

- a) Duración de los síntomas antes del ingreso.
- b) Duración de la fiebre tras inicio del tratamiento antibiótico.
- c) Necesidad de ingreso en Unidad de Cuidados Intensivos.
- d) Días hasta la curación clínica.
- e) Mortalidad y relación con neumonía.
- f) Número de días de hospitalización.

III.2.3. DEFINICIONES Y CRITERIOS ESTABLECIDOS

III.2.3.1. DEFINICIONES

1. Infección por VIH. Se estableció el diagnóstico por la detección de anticuerpos frente al VIH mediante enzimoimmunoanálisis (ELISA) (Dade-Behring, Germany) con confirmación por Western-Blot (Sorin, Italy). Para la clasificación de los diferentes estadios de la enfermedad se aplicaron los criterios de los *Centers for Disease Control and Prevention*⁸².

2. Fumador. Paciente que consume más de 10 paquetes de cigarrillos/año.

3. Consumo excesivo de alcohol. Ingesta enólica superior a 40 gramos de alcohol al día.

4. UDVP. paciente que reconocía usar drogas por vía intravenosa y que no tenía otros factores de riesgo conocidos para la adquisición de la de infección por el VIH^{108,159}.

5. Taquicardia. Frecuencia cardíaca superior a 100 latidos por minuto.

6. Taquipnea. Frecuencia respiratoria superior a 30 respiraciones por minuto.

7. Bacteriemia. Aislamiento de bacterias viables en sangre¹⁶⁰. En el caso de los estafilococos coagulasa-negativos, los estreptococos del grupo viridans, *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp., y *Propionibacterium* spp. es necesaria la presencia de crecimiento en dos o más tomas de hemocultivos¹⁶¹.

Se definen las **bacteriemias polimicrobianas** como aquellas en las que se aísla más de un microorganismo en una de las tomas de hemocultivo.

8. Hipotensión. Tensión arterial sistólica inferior a 90 mm Hg o una reducción mayor de 40 mm Hg de la cifra basal, en ausencia de otras causas distintas de la neumonía que lo justifiquen.

9. Shock séptico. Situación definida por la existencia de hipotensión junto a la presencia de signos clínicos de disminución de perfusión tisular (taquicardia, acidosis láctica, diuresis menor a 20 ml/h, alteración del estado mental agudo y necesidad de fármacos vasopresores) en presencia de infección ¹⁶⁰.

10. Neutropenia. Recuento de leucocitos polimorfonucleares inferior a 1.500/mm³.

11. Linfopenia. Recuento de linfocitos inferior a 1.000 /mm³.

12. Insuficiencia respiratoria aguda. Diagnóstico que se llevó a cabo cuando existía una alteración gasométrica con presión arterial de oxígeno (respirando aire ambiente) inferior a 60 mm Hg o un cociente P_{aO_2}/F_{iO_2} inferior a 250 ^{8,162}.

13. Presentación clínica aguda. duración de síntomas o signos clínicos inferior o igual a siete días contabilizados desde el inicio del cuadro clínico hasta el ingreso del paciente.

14. Presentación clínica subaguda. duración de síntomas o signos clínicos mayor a siete días contabilizados desde el inicio del cuadro clínico hasta el ingreso del paciente.

15. Insuficiencia renal aguda. Existencia de una cifra de creatinina sérica por encima de 2 mg/dL al ingreso o un incremento de 1.5 mg/dL respecto a una cifra previa en un paciente sin antecedentes de patología renal.

III.2.3.2. CRITERIOS ESTABLECIDOS

III.2.3.2.1. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS

1. Neumonía. Para el diagnóstico de neumonía se exigió la presencia de criterios clínicos asociados a criterios radiológicos ^{2,4}.

1.1. Criterios clínicos. Presencia de fiebre (temperatura igual o superior a 38° C), tos, expectoración purulenta, disnea, dolor torácico y/o crepitantes en la auscultación pulmonar.

1.2. Criterios radiológicos. Aparición de infiltrados pulmonares, con o sin presencia de derrame pleural, que no existían previamente.

2. Neumonía adquirida en la comunidad. Infección pulmonar que acontece en un paciente sin ingreso hospitalario en los 15 días previos y que no vive en residencias o casas de acogidas.

3. Neumonía recurrente. Se aplica al segundo episodio de neumonía bacteriana que sufre un paciente en el mismo año, habiéndose objetivado la resolución clínica y radiológica completa entre el primer y el segundo episodio ⁸². Cuando un paciente presentó varios episodios de neumonía en el mismo año, se analizó únicamente el primer episodio de neumonía recurrente.

4. Neumonía bacteriana.

4.1. Definitiva. Se estableció dicho diagnóstico cuando se cumplieron los criterios (clínicos y radiológicos) de neumonía y en el estudio microbiológico se identificó un agente etiológico mediante cultivos o estudio serológico. Se consideraron los siguientes puntos de corte para los patógenos habituales: hemocultivos, líquido pleural, muestras apropiadas de esputo ($\geq 10^6$ ufc/mL),

lavado broncoalveolar ($\geq 10^4$ ufc/mL) ^{163,164}. Las muestras de esputo se consideraron apropiadas si contenían más de 25 leucocitos polimorfonucleares y menos de 10 células epiteliales por campo ¹⁶⁵. Los estudios serológicos se consideraron positivos cuando los títulos de anticuerpos séricos (para *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae*, *C. burnetii* o *L. pneumophila*) se cuadruplicaron en un intervalo de 2-3 semanas. Los casos en los que se aisló más de un microorganismo se consideraron como coinfecciones.

4.2. Probable. Se catalogó como tal cuando se cumplieron los criterios para el diagnóstico de neumonía, los estudios microbiológicos fueron negativos (incluidos *Mycobacterium* spp, *P. carinii* y hongos) y el paciente respondió favorablemente al tratamiento antibiótico instaurado (distinto a cotrimoxazol). En los pacientes que fallecieron sin diagnóstico etiológico se consideró neumonía probable si el paciente únicamente había sido tratado con antibiótico, distinto a cotrimoxazol, por el médico encargado del paciente.

5. Criterios de gravedad.

Se clasificaron como graves aquellas neumonías bacterianas que cumplían al menos uno de los siguientes criterios de la *American Thoracic Society* ⁸.

- a) Taquipnea.
- b) Insuficiencia respiratoria aguda.
- c) Necesidad de ventilación mecánica.
- d) Afectación radiológica multilobar
- e) Hipotensión o shock séptico.
- f) Insuficiencia renal aguda.

6. Tratamiento antibiótico adecuado

En base a los criterios del *Nacional Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) ¹⁶⁶, se consideró que el tratamiento antibiótico era el adecuado cuando el tratamiento empírico inicial era activo frente al o los microorganismos aislados y se prescribió en la dosis e intervalos óptimos y por una vía adecuada.

III.2.3.2.2. CRITERIOS EVOLUTIVOS

1. Curación. Resolución total (clínica y/o radiológica) del episodio.

2. Muerte. Fallecimiento en relación directa con la neumonía o sus complicaciones y no atribuible a ningún otro proceso patológico subyacente.

III.2.4. MÉTODOS DE LABORATORIO

1. Datos hematimétricos

El recuento de la serie roja (hematíes, hemoglobina, hematocrito), de la serie blanca (leucocitos, linfocitos, monocitos, polimorfonucleares, neutrófilos, basófilos y eosinófilos) y de las plaquetas se obtuvo mediante el analizador Technicon H3 RTC/RTX system (Bayer, Switzerland).

2. Coagulación

Se realizó mediante el analizador BCS Coagulation System (Dade Behring, Germany)

3. Datos bioquímicos

Se determinaron mediante el autoanalizador Hitachi 917 (Boehringer Mannheim, Germany).

4. Velocidad de sedimentación globular

Se cuantificó con el sistema Seditainer en el instrumento Sedisystem (Becton Dickinson, Vacutainer Systems Division Europe) por medio de una variante del método standard Westergren. Se consideró normal hasta 30 mm en la primera hora.

5. Gasometría arterial

La determinación de la gasometría arterial se realizó con el analizador de gasometría arterial modelo 348 CHIRON DIAGNOSTICS (USA).

Se extrajo una muestra de sangre de una arteria periférica, normalmente sangre de arteria radial, procesada antes de los diez minutos de extracción, con una jeringa heparinizada evitando que hubiera aire en contacto con la sangre extraída.

6. Proteinograma

El proteinograma se realizó con soporte de acetato de celulosa y colorante Rojo de Ponceau con tampón de barbitol sódico (pH= 8.6) en un autoanalizador OLYMPUS HITE-SYSTEM 600. Los valores de referencia para la albumina son: 31-52 g/L.

7. Linfocitos T CD4

Las muestras fueron analizadas mediante el citómetro de flujo Epics XL-MCL de Izasa-Coulter (USA).

El porcentaje de cada subpoblación linfocitaria (Sp) se expresó en relación al número total de linfocitos, según la siguiente fórmula:

$$\% Sp = N^{\circ} Sp \text{ por mm}^3 \times 100 / N^{\circ} \text{ total linfocitos por mm}^3$$

III.2.5. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

III.2.5.1. OBTENCIÓN, TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS

1. Muestras respiratorias

Las muestras de esputo se recogieron lo más precozmente posible y antes de iniciar cualquier tratamiento antibiótico, procesándose en el laboratorio antes de las dos horas de la recogida y cuando no fue posible se conservaron en frigorífico a 4° C.

Se realizó fibrobroncoscopia cuando el equipo médico que atendió al paciente así lo consideró necesario. La técnica del lavado broncoalveolar (LBA) se ajustó a las recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica y la Sociedad Española de Patología del Aparato Respiratorio^{167,168}. Así, previa premedicación con atropina, se procedió a la realización de la fibrobroncoscopia. Posteriormente se instiló un volumen total de 150 mL de suero fisiológico a temperatura ambiente en bolos de 50 mL. El líquido recuperado, una vez desechados los primeros 20-30 mL aspirados, se procesó a la mayor brevedad. Cuando no fue posible enviarlo al laboratorio se conservó en frigorífico a 4°C.

2. Hemocultivos

Cuando el paciente presentaba fiebre (> 38° C), y antes de iniciar el tratamiento antibiótico empírico, se extrajeron al menos dos muestras para hemocultivos mediante punción venosa en dos lugares distintos, de forma aséptica y separadas por un intervalo de tiempo no inferior a media hora. Se obtuvo un volumen de 15 a 20 mL de sangre por toma que fueron inoculados en frascos de hemocultivos para microorganismos aerobios y anaerobios, que

se enviaron inmediatamente al laboratorio de microbiología y cuando no fue posible se incubaron en estufa a 35-37° C ¹⁶⁷.

En aquellos pacientes que presentaron derrame pleural significativo se realizó toracocentesis enviándose el líquido lo más rápidamente posible al laboratorio. En el líquido pleural se determinaron parámetros bioquímicos y citológicos y microbiológicamente se realizó tinción de Gram y cultivo para detección de microorganismos aerobios y anaerobios.

III.2.5.2. PROCEDIMIENTOS MICROBIOLÓGICOS

A su llegada al laboratorio, se realizó una tinción de Gram, valorándose celularidad y presencia de microorganismos. En el caso de esputo únicamente fueron admitidas como válidas las que tenían más de 25 leucocitos polimorfonucleares y menos de 10 células epiteliales por campo al microscopio con objetivo débil (x 10) ¹⁶⁵, valorándose también la presencia (abundante o moderada) de un microorganismo predominante.

Las muestras respiratorias se sembraron cuantitativamente en agar CO₂ sangre y agar CO₂ chocolate durante 48 horas y en medio de McConkey durante 24 horas. Ante sospecha de anaerobios, y siempre en líquido pleural, se utilizó agar sangre en anaerobiosis incubado a 35-37 ° C durante 48-72 horas.

Para investigación de *L. pneumophila* se realizó en primer lugar una IFD (MONOFLUO *Legionella pneumophila* IFA Test Kit, BIO-RAD, USA) y cultivo cualitativo en medio Buffer Charcoal Yeast Extracte (BIOMEDICS, Spain)

Los hemocultivos se procesaron mediante sistema BACT-ALERT (BioMérieux, France) manteniéndose en incubación un mínimo de siete días.

En cuanto a la identificación de los microorganismos se realizó mediante morfología microscópica, colonial y pruebas bioquímicas tanto manuales como automatizadas (sistema Vitek-BioMérieux, France).

En los casos en que se solicitó estudio serológico, se determinaron anticuerpos de *C. pneumoniae* (IgG; MRL, USA), *C. burnetti*, (IgG; BioMérieux, France) y *L. pneumophila* (IgG; MRL, USA) por técnicas de inmunofluorescencia indirecta mientras que para *M. pneumoniae* se utilizó la técnica de ELISA (Sayvon diagnostic, Israel).

III.2.5.3. TEST DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA

En todas las cepas aisladas se estudió la sensibilidad antibiótica. Se utilizaron dos métodos distintos: 1) difusión en Disco-placa siguiendo las recomendaciones del NCCLS ¹⁶⁶ y 2) determinación de CMI mediante E-test (AB Biodisk, Sweden) según las recomendaciones del fabricante.

Los puntos de corte para categorizar la sensibilidad antibiótica de los microorganismos aislados fueron los recomendados por el NCCLS ¹⁶⁶.

III.2.6. CÓDIGO DEONTOLÓGICO

El presente trabajo se ha atendido a las recomendaciones para guiar la investigación en seres humanos establecidos en la declaración de Helsinki (1964) y posteriormente en Tokyo (1975), Venecia (1983) y Hong-Kong (1989).

III.2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El tratamiento estadístico se realizó con el programa informático SPSS 9.0 para Windows previa introducción de los datos en un archivo .sav de datos de SPSS.

Para las variables cuantitativas se calcularon la media y la mediana como medidas de tendencia central mientras que la desviación típica y el rango intercuartílico fueron las medidas de dispersión consideradas. La mediana y el rango intercuartílico se usaron cuando las variables no seguían una distribución normal o si existían valores extremos. Así mismo se calculó el intervalo de confianza del 95% para la media de las distintas variables cuantitativas analizadas.

Se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov (corrección de Lilliefors) y la de Shapiro-Wilk (para el caso de muestras con menos de 50 observaciones) para determinar la bondad de ajuste a una distribución normal y la prueba de Levene para analizar la homogeneidad de las varianzas de cada una de las muestras comparadas.

La comparación de medias de dos grupos se realizó mediante la prueba “t” de Student o la prueba no paramétrica “U” de Mann-Whitney, según dichas variables pudieran considerarse o no como normales, aplicando posteriormente la corrección de Bonferroni (para un error α global de 0.05) debido a la propagación del error α a través de las distintas comparaciones.

Para las variables cualitativas se realizó la comparación de proporciones mediante la prueba de la χ^2 , modificada en caso necesario mediante la corrección de Yates, o la prueba exacta de Fisher cuando no se cumplían los

criterios de aplicación (frecuencias esperadas bajas por muestras excesivamente pequeñas).

Por último, se realizó un análisis multivariante mediante la construcción de un modelo de regresión logística, por el procedimiento paso a paso (*stepwise*). En este modelo se incluyeron las variables con significación estadística o cercanas a la significación en el análisis univariante con el fin de ajustar los efectos de las variables de confusión. Para cada variable introducida en el modelo se obtuvo la razón de ventajas, comúnmente conocida como *odds ratio*, para indicar el grado de influencia de cada variable como factor de riesgo o de protección a la hora de predecir la muerte o la recurrencia de los sujetos.

Todas las pruebas fueron de dos colas y el nivel de significación estadística se estableció para toda $p \leq 0.05$.

III.2.8. MÉTODO DE OBTENCIÓN BIBLIOGRÁFICA

Para la revisión bibliográfica se utilizó el Sistema PubMed a través de Internet usando el comando MeSH (*Medical Subject Heading*) del Index Medicus. Los descriptores utilizados fueron: HIV infection; Mortality; Pneumonia, bacterial; Prognosis; Risk factors; Substance abuse, intravenous y Recurrence.