



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD
HOSPITAL DE INFECTOLOGÍA "DR. DANIEL MÉNDEZ HERNÁNDEZ"



UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOLOGÍA E
INFECTOLOGÍA
CENTRO MÉDICO NACIONAL "LA RAZA"

**DETECCION Y DIFERENCIACION DEL COMPLEJO *Mycobacterium avium-intracellulare*
EN CEPAS DE PACIENTES CON SINDROME DE INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA
MEDIANTE REACCION EN CADENA DE POLIMERASA**

TESIS DE POSTGRADO
No. 2007-3506-5

PARA OBTENER EL TITULO DE
ESPECIALISTA EN :
INFECTOLOGÍA Y ECOLOGÍA MEDICA ADULTOS

P R E S E N T A :

DR. EDGAR DEGOLLADO ESTRADA

Asesores:

DRA. GUADALUPE DE LOS ÁNGELES GARCÍA ELORRIAGA
DRA. MARÍA CONCEPCIÓN HERNÁNDEZ GARCÍA
DR. ULISES ÁNGELES GARAY

MÉXICO, D. F.

FEBRERO 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PRESENTACION DE TESIS

Dra. Verónica A. Gaona Flores

Coordinación de Educación e Investigación en Salud H.I.C.M.N.L.R

Dra. Elena Úrdez Hernández

Profesora Titular del Curso de Infectología H.I.C.M.N.L.R.

Dra. Guadalupe de los Angeles García Elorriaga
Doctora en Microbiología Adscrita a la Unidad de Investigación Médica en Inmunología e
Infectología H.I.C.M.N.L.R.

Dra. Maria Concepción Hernández García
Médico Infectologa Adscrita al H.I.C.M.N.L.R.

Dr. Ulises Angeles Garay
Médico Epidemiologo Adscrito al H.E.C.M.N.L.R.

Investigadores asociados.

Dr. Cesar Raúl González Bonilla.

Jefe de la Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología H.I.C.M.N.L.R.

Colaboradores.

Q.B.P. Faustina Ramírez Cruz.

Laboratorio de Microbiología del Hospital de Infectología “Dr. Daniel Méndez Hernández”
H.I.C.M.N.L.R.

Dr. Carlos Cano Dominguez.

Hospital de Infectología “Dr. Daniel Méndez Hernández” H.I.C.M.N.L.R.

Q.B.P. Nancy Cortés Torres.

Instituto Politécnico Nacional.

Dra. Miriam Bobadilla Del Valle.

Laboratorio de Microbiología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”

AGRADECIMIENTOS.

A la Dra. Guadalupe de los Ángeles García Elorriaga mi más profundo agradecimiento por su valioso apoyo y dedicación durante este trabajo. Por su amistad, confianza y tiempo compartido.

A la Dra. María Concepción Hernández García por su gran ejemplo profesional y humanitario, e invaluable guía.

A la Dra. Elena Úrdez Hernández , gracias por su presencia, gran guía tutorial y palabras de aliento.

A la Dra. Verónica A. Gaona Flores por su atención continua, que ha contribuido a mi formación con sus constantes aportaciones.

Al Dr. Ulises Ángeles Garay, por haber enriquecido mí trabajo.

A todos los médicos que contribuyeron a mi formación.

DEDICATORIA

A Dios: gracias por la vida.

A mi familia: este trabajo está hecho con mucho agradecimiento y cariño para ustedes.

A Norma: como un homenaje a nuestro amor.

ÍNDICE	PÁGINA
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	10
OBJETIVO.....	11
SUJETOS, MATERIAL Y METODOS.....	12
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	19
RESULTADOS.....	20
DISCUSIÓN.....	28
CONCLUSIONES.....	30
BIBLOGRAFÍA.....	31
ANEXOS.....	35

RESUMEN

Introducción. Las infecciones por micobacterias no tuberculosis constituyen uno de los principales problemas de salud en pacientes con SIDA. Los agentes etiológicos más importantes pertenecen al complejo MAI, detectados en 50% de los casos durante la fase tardía de la enfermedad o en la autopsia.

Objetivo. Determinar la prevalencia de infección por el complejo MAI utilizando la RCP en pacientes con SIDA atendidos en el Hospital de Infectología “Dr. Daniel Méndez Hernández” Centro Médico La Raza

Material y métodos. Observacional, retrolectivo, retrospectivo, transversal y descriptivo. Se recolectaron 18 cepas de pacientes con SIDA cuyos valores de CD4 fueron inferiores a 100 durante el periodo de un año, previamente identificadas mediante hibridación con sondas de ADN como complejo MAI; y fueron procesadas mediante la técnica de RCP para detectar y diferenciar *M. avium* y *M. intracelullare*. Se revisaron los expedientes de los 18 pacientes involucrados y se describieron las características clínicas, radiológicas, de laboratorio y demográficas que presentaron.

Resultados. Diecisiete (94.4%) correspondieron al género masculino y uno (5.6%) al femenino. La edad promedio fue 39.6 años \pm 10.6. Los principales signos y síntomas referidos fueron fiebre por 18 (100%) pacientes, seguidos por pérdida de peso 17 (94.4%) casos. La candidosis se diagnóstico en todos los pacientes, seguida por la neumonía/neumonitis con siete (38.9%) y los 18 (100%) pacientes resultaron positivos para *Mycobacterium avium*.

Conclusiones. Se identificó *Mycobacterium avium* en los dieciocho pacientes estudiados y no se encontró *Mycobacterium intracellulare*.

ABSTRACT

Introduction. Infections by atypical mycobacterial represent a major health problem in AIDS patients. More important etiologic agents pertain to MAI complex, detected in 50% percent of cases during the latest phase or in autopsy.

Objective. To determine prevalence of MAI complex infection by PCR in AIDS patients attended in Infectology Hospital “Dr. Daniel Méndez Hernández”, Medical Center “La Raza”

Material and methods. Observational, retrolective, retrospective, transversal and descriptive. Eighteen MAI complex strains were collected of patients with AIDS whose values were less than 100 CD 4, during the study period of one year, and were processed with the PCR technique to detect and differentiate complex MAI.

Reviewed the records of patients involved and described the clinical features, radiological, laboratory and demographic presented.

Results. Seventeen (94.4%) patients corresponded to male gender and one (5.6%) to female. Average age was 39.6 years \pm 10.6. Major signs and symptoms referred were fever for 18 (100%) patients, followed by weight lost in 17 (94.4%) cases. Candidiasis was diagnosed in all patients, followed for pneumonia/Pneumonitis with seven cases (38.9%) and all patients resulted positives for *Mycobacterium avium*.

Conclusions. *Mycobacterium avium* was detected in eighteen patients studied and were not found *Mycobacterium intracellulare*.

INTRODUCCIÓN

Micobacterias no tuberculosis (MNT) es el término empleado para distinguir a las micobacterias ambientales de las micobacterias que causan lepra (*Mycobacterium leprae*) y tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*)¹. Las MNT son microorganismos del medio ambiente que se encuentran tanto en el agua libre como en la almacenada. También se encuentran en el suelo, polvo, animales y alimentos². Las micobacterias se benefician de la cloración y ozonificación del agua que matan a otras bacterias cuyo crecimiento es más rápido y compiten con ellas por los nutrientes. El crecimiento lento de las especies de micobacterias y su pared celular relativamente impermeable, debido a la presencia de largas cadenas de ácidos grasos micolíticos, contribuyen en su resistencia a la cloración³. En Europa y Estados Unidos de Norteamérica, el complejo *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAI) es la causa más común de enfermedad pulmonar por MNT. Otras especies también se han encontrado asociadas aunque con menor frecuencia: *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. scrofulaceum*, *M. chelonae*, *M. gordonae*, *M. xenopi*, *M. asiaticum*, *M. flavescens*, *M. malmoense*, *M. szulgai*, *M. haemophilum*, *M. simiae*, *M. genavense* y *M. celatum*⁴.

Las infecciones causadas por las MNT a diferencia de la tuberculosis, no son reportadas estrictamente a las autoridades de salud pública en Estados Unidos ni en otros países como México, por lo tanto, su prevalencia exacta en diferentes áreas geográficas es desconocida. Basados en reportes de laboratorio o algunos estudios de vigilancia, se ha estimado que entre 1981 y 1983 la prevalencia de infecciones por MNT era de 1.8% por 100,000 habitantes^{3,5}.

Las MNT se estimaron como responsables de 1 a 2 % de los casos aparentes de tuberculosis en las décadas de los 50 y 60. Los Centros para el Control de las Enfermedades y Prevención (CDC) reportaron en 1979 y 1980 que un tercio de los aislamientos de micobacterias en los Estados Unidos eran MNT. En Filadelfia durante la década de los 80 la prevalencia de MNT se incrementó. La proporción entre los aislamientos de TB con respecto a los de MNT disminuyó de 3.2:1 entre 1976 y 1981 a 1:1.6 entre 1986 y 1991 en un hospital comunitario del Sur de California. El complejo MAI es la MNT más comúnmente aislada a partir del esputo y especímenes pulmonares^{5,6}.

Aunque existen probablemente cientos de especies de micobacterias en el medio ambiente, sólo alrededor de 60 han sido identificadas en muestras de pacientes⁵. A diferencia de *M. tuberculosis* y *M. leprae*, las MNT son organismos de vida libre y únicamente son patógenos en humanos si existen condiciones de inmunosupresión o si las barreras de la piel o mucosas han sido superadas, no existe evidencia de que su transmisión sea de persona a persona⁶. Comúnmente causan infecciones de la piel, tejidos blandos, linfadenitis, enfermedad pulmonar y originan infecciones diseminadas en pacientes con SIDA^{7,8}.

Con excepción de las enfermedades de la piel y tejidos blandos, la entrada principal de MNT que causan infecciones pulmonares, diseminadas y en otras localizaciones, son las vías gastrointestinal y respiratoria. Los factores de riesgo para desarrollar una infección por MNT son varios: el primero relacionado a condiciones médicas coexistentes que afectan las barreras naturales y/o al sistema inmune como en el SIDA; el segundo tiene que ver con el medio ambiente laboral o de vida y el tercer factor corresponde al ámbito demográfico donde se ha observado que las mujeres en la sexta década de la vida o mayores son consideradas como las más vulnerables a infecciones por MNT especialmente a infecciones pulmonares con *M. avium*. A menudo este fenómeno demográfico esta asociado con varias condiciones predisponentes, tales como anomalías torácicas y enfermedades del tejido conectivo. Es importante enfatizar que el desarrollo de infecciones causadas por MNT pueden manifestarse sin obvias condiciones predisponentes^{6,9,10}.

Con el advenimiento de tratamientos efectivos para la TB, en la década de los 50 las muestras de micobacterias comenzaron a ser cultivadas de manera rutinaria y se reconoció que algunos de los casos aparentes de TB eran debido a infección por MNT.

La prevalencia de TB ha disminuido en países desarrollados con estándares efectivos de control y la proporción de enfermedades por MNT se ha incrementado¹¹.

La frecuencia de la enfermedad por MNT usualmente se estima a partir del número de cultivos positivos¹². Los reportes de laboratorio han mostrado incrementos en el número de MNT aislados. El uso de medios líquidos y sólidos para cultivo de micobacterias ha incrementado el diagnóstico de infección por MNT a partir de muestras humanas¹³.

Dependiendo del tiempo para producir colonias visibles en medios de cultivo sólidos, ya sea en menos de siete o más de siete días, las MNT se dividen en dos grupos; micobacterias de rápido y lento crecimiento¹⁴.

Además del cultivo en medio de Lowenstein-Jensen, existen métodos rápidos para determinar la especie de micobacterias, como: las sondas de ácidos nucleicos, la reacción en cadena de la polimerasa (RCP), cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) y secuenciación de ácidos nucleicos^{15, 16}.

El análisis del polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción (PLFR) puede ser utilizado para identificar todas las especies de MNT. El PLFR y la RCP han ayudado a distinguir a los miembros del complejo MAI de las especies estrechamente relacionadas, tales como, *Mycobacterium scrofulaceum* y pueden distinguir entre los miembros del MAI: *M. intracellulare* y *M. avium* y sus subespecies; *M. avium avium*, *M. avium silvaticum* que infecta a los pájaros, *M. avium paratuberculosis* responsable de infecciones del sistema reproductor, glándulas mamarias e intestinales en los rumiantes salvajes y domésticos y *M. hominissuis* el cual causa las infecciones micobacterianas en humanos y puercos^{17, 18, 19}.

La cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) es también un método confiable para distinguir a las especies de micobacterias. Diversos estudios han corroborado su utilidad con una especificidad del 70 al 95% según la especie. En un estudio comparativo con sondas de ADN se reportó un 100% de especificidad y 99% de sensibilidad a favor del último para la identificación de *M. tuberculosis*²⁰.

Un estudio comparativo reciente de CLAR y RCP encontró resultados discrepantes en 14% de 83 muestras de MNT; la discrepancia en 4% de los casos fue debida a infección polimicobacteriana.²¹

Las técnicas de hibridación de sondas de ácidos nucleicos son altamente sensibles. La identificación de micobacterias mediante la secuenciación del DNA ribosomal 16S, es una nueva herramienta implementada en algunos laboratorios clínicos. Esa técnica provee una determinación de la especie más exacta y es especialmente útil en los casos

donde cualquier combinación de los métodos arriba mencionados no provee una identificación confiable de las micobacterias aisladas²².

La carencia de reportes sobre la enfermedad causada por MNT principalmente en países en desarrollo, está muy probablemente relacionada a los esfuerzos insuficientes para detectar a tales pacientes. En algunas áreas de estos países, el examen de muestras de laboratorio está limitado a microscopía directa de muestras de esputo, y aún en donde el cultivo es rutina de los protocolos de laboratorio, los médicos pueden no estar alerta de esta patología y el número de pacientes sujetos a tal examen esta limitado solamente a aquellos con manifestaciones clínicas y radiológicas de tuberculosis. En contraste, en los Estados Unidos el examen bacteriológico es tan ampliamente solicitado por el médico que sólo alrededor del 5% de los pacientes resultan como positivos para micobacterias. Una de las desventajas en la recuperación de MNT mediante el cultivo en medio de Lowenstein-Jensen, es que el cultivo requiere un tiempo prolongado para el crecimiento de colonias de micobacterias, sin embargo se le considera el estándar de oro en el diagnóstico de las micobacteriosis^{10, 23}.

Las micobacteriosis constituyen uno de los principales problemas de salud en pacientes con SIDA. Los agentes etiológicos más importantes pertenecen al complejo MAI, detectados en 50% de los casos durante la fase tardía de la enfermedad o en la autopsia, y *Mycobacterium tuberculosis*, al cual se le adjudica un efecto sinérgico con el virus de la inmunodeficiencia humana¹.

Antes de la epidemia de SIDA, solo había informados en la literatura 78 casos de micobacteriosis diseminadas². La diseminación del complejo MAI sólo se encuentra reportada en 37 casos, sin embargo MAI se convirtió en infección oportunista frecuente en pacientes con SIDA. En Europa y Estados Unidos se ha logrado aislar entre 17% y 50% y en un 40%-50% en muestras de autopsia, principalmente órganos del sistema retículo endotelial, médula ósea, nódulos linfáticos, pulmón, hígado, bazo, intestino, piel, riñón y cerebro^{2, 3, 4}. En América Latina y el Caribe hay reportes que varían del 4% al 14%⁵.

El grupo de micobacterias conocido como complejo MAI pertenece al género *Mycobacterium*, dentro de las no tuberculosis o ambientales. El pH óptimo de desarrollo

en laboratorio oscila entre 5 y 5.5. Este complejo incluye *Mycobacterium intracellulare* y *Mycobacterium avium*, subespecies *M. avium avium*, *M. avium paratuberculosis* y *M. avium silvaticum*.^{3,6,7}

Los residuos de oligosacáridos de los glucopeptidolípidos de su pared celular les confieren especificidad serológica; basándose en esta especificidad y en estudios de homología del ADN, el complejo ha sido clasificado en dos especies principales: *M. avium* (tipos 1-6, 9-11 y 21) y *M. intracellulare* (tipos 7, 12-20 y 25). Se trata de bacilos grampositivos, ácido-alcohol resistentes y aerobios. Están encuadrados en el grupo III de la clasificación de Runyon, esto es, son de crecimiento lento y no fotocromógenos^{3,6}. El cuadro clínico de la diseminación sistémica de MAI se definió hasta el advenimiento del SIDA³.

Se considera actualmente que las vías de infección principales son a través del tracto gastrointestinal y respiratorio^{3,5}.

El principal factor de riesgo para la infección por MAI en los pacientes con SIDA es la alteración de la inmunidad celular medida por los niveles de los linfocitos T CD4. La infección por MAI ocurre raramente en pacientes con cuentas de linfocitos T CD4 mayores de 100 células³.

La infección por MAI se manifiesta como enfermedad diseminada en los pacientes con estadios avanzados de la infección por VIH que presentan recuentos de linfocitos T CD4 inferiores a 50 células^{3,6}. Esto correlaciona la incidencia de la infección por MAI con la supervivencia de los pacientes a partir del diagnóstico de SIDA. Así, la incidencia de la bacteremia por MAI es del 21% al año, del 43% a 2 años y del 50% a 2.5 años en estudios realizados en Estados Unidos. Por otro lado, la incidencia de MAI, un año después del diagnóstico de SIDA, es de 3% en pacientes con cuentas de linfocitos entre 100 y 199 células³.

No está bien definido el porqué los pacientes con SIDA son tan susceptibles a la infección diseminada por MAI. Hay evidencias que lo relacionan con los mecanismos de activación celular, incluyendo citoquinas. Recientemente se ha postulado que la

proteína de envoltura gp 120 del VIH puede estimular directamente el crecimiento intracelular de *Mycobacterium avium*^{20,21}.

Los signos y síntomas clínicos asociados con la infección diseminada por MAI son: fiebre, sudoración nocturna, pérdida de peso de más del 10% del peso habitual, debilidad progresiva, malestar general, diarrea crónica, dolor abdominal, anemia e incremento en el deterioro de su condición clínica en general. Pueden presentar síntomas no específicos o manifestarse como empeoramiento de una enfermedad previa.

Los hallazgos que a la exploración física frecuentemente se presentan, son: fiebre, caquexia, con o sin manifestaciones a la exploración de tórax, linfadenopatía intraabdominal o hepatoesplenomegalia. La elevación persistente de la fosfatasa alcalina hepática es muy frecuente y se ha considerado como un indicador sensible para la infección diseminada por MAI^{11,13}.

La infección por MAI entre los pacientes con SIDA también puede presentarse como una neumonía localizada, fistulas mediastinales endobronquiales, así como una masa endobronquial, fistulas mediastino-esofágicas con esofagitis, ileítis terminal parecida a la enfermedad de Crohn, pericarditis, meningitis, endoftalmitis, artritis séptica, osteomielitis, abscesos cutáneos e infección en nódulos linfáticos y mucosa rectal asociado a sarcoma de Kaposi³. Otras manifestaciones inusuales son: colecistitis, peritonitis, pseudotumor de apéndice cecal, localizaciones cutáneas, esplénicas, cerebrales y de médula ósea; úlceras palatinas y gingivales, artritis séptica, osteomielitis, endoftalmitis, pericarditis y hemorragias gastrointestinales masivas. El compromiso cutáneo se produce por diseminación vía hematológica⁶.

El defecto inmunológico subyacente relacionado con la diseminación es una lisis alterada de los bacilos fagocitados por macrófagos y respuestas defectuosas en la producción de citoquinas: factor de necrosis tumoral (FNT), Interferón γ (IFN γ), interleucina 12 (IL-12)⁶.

Durante la infección por MAI se encuentran niveles elevados de IL-1-alfa, IL-6, IL-10, FNT alfa, receptor soluble tipo II del FNT y el factor transformador de crecimiento beta⁶.

En los pacientes con infección diseminada por MAI, es posible aislar la bacteria mediante cultivo de líquidos y tejidos incluyendo sangre, heces, orina, esputo, líquido cefalorraquídeo, médula ósea, y otros tejidos. En sangre suele recuperarse la micobacteria hasta en 94% de los casos, heces 61%, esputo 59%⁸.

El diagnóstico convencional de micobacterias tiene como desventajas la baja sensibilidad y especificidad del análisis microscópico, su límite inferior de detección es de 10^4 bacilos por mililitro de muestra, y el lento crecimiento de las micobacterias patógenas en cultivo. Sin embargo, la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) permite la identificación rápida y específica de las micobacterias, con un límite inferior de detección que varía de 1 a 100 bacilos por mililitro de muestra^{11,29}.

La amplificación de moléculas blanco a un nivel detectable, por la RCP, constituye el mejor sistema desarrollado para la detección de micobacterias. Esta técnica no sólo es altamente sensible y rápida, sino que permite identificar las especies de micobacterias si se usan los iniciadores específicos¹¹.

La RCP, es una técnica de biología molecular propuesta en 1985 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular. Esta técnica sirve para amplificar un fragmento de ADN. Tras la amplificación resulta mucho más fácil identificar con una muy alta probabilidad virus o bacterias causantes de una enfermedad^{7,8}.

El proceso de detección de un agente infeccioso por amplificación genética se desarrolla de manera habitual en tres etapas. La primera consiste en la extracción y purificación de los ácidos nucleicos del microorganismo de la muestra biológica, seguido de la amplificación de un segmento seleccionado del genoma del microorganismo mediante RCP. Finalmente, en la tercera etapa se lleva a cabo la detección de los fragmentos amplificados en la RCP por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. En general este proceso suele durar aproximadamente 24 horas⁸.

Un obstáculo para la aplicación de esta tecnología en nuestro medio ha sido el elevado costo de la prueba^{8,9}.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los últimos 10 años es evidente el incremento progresivo de infección por complejo MAI, principalmente en pacientes con inmunocompromiso y en particular en pacientes con SIDA que tienen cuenta de linfocitos T CD4 inferiores a 50 células¹⁹.

Comúnmente es responsable de infecciones diseminadas que afectan a múltiples órganos; y en la mayoría de los casos el diagnóstico se retarda por el lento crecimiento del microorganismo en los medios de cultivo. La RCP es una técnica altamente sensible y rápida para identificar micobacterias²².

En nuestro país no contamos con información epidemiológica ni de presentación clínica en nuestras diferentes áreas geográficas que permita valorar su impacto y comportamiento. Por otro lado no existen bases para la realización de protocolos para la detección de MAI.

Se realizó la detección y diferenciación del complejo MAI a partir de cepas de pacientes con SIDA mediante RCP^{23, 25}.

PREGUNTA DE INVESTIGACION

¿Cuál es la utilidad de la RCP para determinar la prevalencia de infección por *Mycobacterium avium* e *intracellulare* en pacientes con SIDA atendidos en el Hospital de Infectología “Dr. Daniel Méndez Hernández” Centro Médico Nacional La Raza?

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la utilidad de la RCP para determinar la prevalencia de infección por *Mycobacterium avium* e *intracellulare* en pacientes con SIDA atendidos en el Hospital de Infectología “Dr. Daniel Méndez Hernández” Centro Médico Nacional La Raza?

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la prevalencia de infección por el complejo MAI por especie.
2. Determinar la prevalencia de infección por el complejo MAI por sitio de afección.
3. Determinar la prevalencia de infección por el complejo MAI por género.
4. Determinar la prevalencia de infección por el complejo MAI por grupo de edad.

MATERIAL Y METODOS

DISEÑO Y ESTUDIO

Tipo de estudio

Por la manipulación de la variable: Observacional.

Por la recolección de datos: Retrolectivo.

Análisis en el tiempo: Retrospectivo.

Por el número de mediciones: Transversal.

Por el número de grupos: Descriptivo²³.

UNIVERSO

Pacientes con SIDA con cuenta de células CD4 menor o igual a 100.

UBICACIÓN ESPACIO TEMPORAL

Período de estudio

Enero de 2007 a enero de 2008

Lugar del estudio

Unidad de Investigación en Inmunología e Infectología, del Hospital de Infectología “Dr. Daniel Méndez Hernández” Centro Médico Nacional La Raza.

ESTRATEGIA DE TRABAJO

Se identificaron cepas de pacientes con diagnóstico de SIDA, con cuenta de células CD4 menor o igual a 100, que fueron identificadas como complejo MAI mediante hibridación con sondas de ADN, se les realizó RCP para detectar y diferenciar MAI.

MUESTREO

Consecutivo

No probabilístico por conveniencia.

❖ **POBLACION FUENTE**

Todos los pacientes con diagnóstico de SIDA con cuenta de células CD4 menor o igual 100, con cepas identificadas como complejo MAI mediante hibridación con sondas de ADN y derechohabientes del IMSS; en el periodo comprendido de enero de 2007 a enero de 2008.

❖ **POBLACION ELEGIBLE**

Todos los pacientes con diagnóstico de SIDA con cuenta de células CD4 menor o igual 100, con cepas identificadas como complejo MAI mediante hibridación con sondas de ADN que recibieron atención médica en el Hospital de Infectología “Dr. Daniel Méndez Hernández” del Centro Médico Nacional La Raza, en el periodo comprendido de enero de 2007 a enero de 2008.

❖ **POBLACION EN ESTUDIO**

Todos los pacientes con diagnóstico de SIDA con cuenta de células CD4 menor o igual a 100, con cepas identificadas como complejo MAI mediante hibridación con sondas de ADN; derechohabientes del IMSS, en el periodo comprendido de enero de 2007 a enero de 2008 y que reunieron los criterios de selección.

❖ **SELECCIÓN DE LA MUESTRA**

Todos los pacientes con diagnóstico de SIDA con cuenta de células CD4 menor o igual a 100 y con cepas identificadas como complejo MAI mediante hibridación con sondas de ADN, que reunieron los criterios de selección.

❖ CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LAS UNIDADES DE MUESTREO

A. Criterios de inclusión

Pacientes de ambos géneros.

Pacientes mayores de 18 años.

Pacientes con diagnóstico de SIDA y cuenta de linfocitos T CD4 menor o igual a 100.

Pacientes con cepas identificadas como complejo MAI mediante hibridación con sondas de ADN.

B. Criterios de no inclusión

Pacientes con cepas contaminadas.

Pacientes con cepas diferentes al complejo MAI.

C. Criterios de eliminación

Pacientes con cepas del complejo MAI que no cuenten con expediente clínico.

D. Criterios de exclusión.

Pacientes con muestras extraviadas.

Pacientes con muestras contaminadas.

Pacientes con muestras mal procesadas.

❖ DISEÑO Y TAMAÑO DE LA MUESTRA

FÓRMULA PARA DETERMINAR TAMAÑO DE MUESTRA

Poblaciones finitas²⁴.

$$N = \frac{NZ\alpha^2PQ}{\delta^2(N-1) + Z\alpha^2PQ} = \frac{750 \times 3.84 \times 0.02 \times 0.98}{0.0025 \times (750 - 1) + 3.84 \times 0.02 \times 0.98} = 28.98 = 29$$

Donde:

$$N = 750$$

$$Z \alpha_{0.05}^2 = 1.96^2 = 3.8416$$

$$P = 0.02$$

$$Q = 1 - P = 1 - 0.02 = 0.98$$

$$\delta^2 = 0.05^2 = 0.0025$$

Diseño y descripción de las características de los instrumentos de recolección, la naturaleza de los ítems, escalas de medición.

Se utilizaron cepas control de *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium intracellulare*, que fueron donadas por el laboratorio de microbiología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

Se recolectaron cepas identificadas como MAI mediante hibridación con sondas de ADN de los pacientes que reunieron los criterios de selección. De acuerdo a las instrucciones de manufactura, se realizó extracción de ADN a partir de las cepas en estudio, y se procesaron con la técnica de RCP con los iniciadores específicos de *M. avium* y *M. intracellulare*. Los controles negativos, con la exclusión del templado de ADN, así como los controles positivos se incluyeron. Los productos de la RCP se revelaron mediante electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio²⁷.

M. avium-intracellulare

INICIADORES	TAMAÑO DE BANDA
MAV 1	1.3 kb
MAV 2	1.3 kb
MIN 1	1.3 kb
MIN 2	1.3 kb

REGIONES DE ADN A AMPLIFICAR

Gen amplificado	Denominación	Secuencia	Longitud de banda
<i>M. avium</i>	MAV	5'-CCT CAA GAC GCA TGT CTT CT-3' 5'-ACA GCT CCC TCC CAA AAG GG-3'	141 a 160 pb 1400 a 1419 pb
<i>M. intracellulare</i>	MIN	5'-CCT TTA GGC GCA TGT CTT TA-3' 5'- GCA CAG CTC CCT CCC AAG GG-3'	130 a 149 pb 1389 a 1408 pb

PERFIL TERMICO DE PCR PARA *M. avium-intracellulare*

ETAPA PCR	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (min)	CICLOS
Desnaturalizacion	94	1	40
Alineamiento	55	2	
Extension	72	6	
Extension final	72	15	1

EXTRACCION DE ADN

LISIS Y HOMOGENIZACION DE LA MUESTRA

1. Colocar 500 µl de muestra en un tubo Eppendorf 1.5mL. Adicionar 500µl de trizol y homogenizar en el agitador.
2. Incubar las muestras homogenizadas a temperatura ambiente durante 10 minutos.

SEPARACION DE FASES

3. Adicionar 100µl de cloroformo. Tapar los tubos y agitar. Incubar a temperatura ambiente 2 a 3 minutos.
4. Centrifugar a 14000 rpm durante 15 minutos a 4 °C.
5. Separar la fase acuosa que contiene ARN.

PRECIPITACION DEL ADN

6. Precipitar el ADN de la interfase y la fase orgánica con etanol. Adicionar 150 μ l de etanol al 100%. Mezclar por inversión.
7. Incubar de 2 a 3 minutos a temperatura ambiente.
8. Centrifugar a 7500 rpm durante 5 minutos a 4°C.

LAVADO DE ADN

9. Lavar el botón del ADN con una solución de citrato de sodio 0.1M en etanol al 10% utilizar 500 μ l para cada lavado.
10. En cada lavado incubar 30 minutos a temperatura ambiente mezclando.
11. Centrifugar a 7500 rpm durante 5 minutos a 4°C. Eliminar el sobrenadante.

PRECIPITACION DEL ADN CON ETANOL AL 70%

12. Resuspender al ADN con 800 μ l de etanol al 70%.
 13. Incubar a temperatura ambiente 10 a 20 minutos mezclando periódicamente.
 14. Centrifugar a 7500 rpm por 5 minutos a 4°C. Eliminar el sobrenadante.
- Si el sedimento es muy grande o contiene grandes cantidades de material no ADN, se requiere darle otro lavado con citrato de sodio 0.1M (>200 μ l de ADN).
15. Secar el ADN en la centrifuga de vacío durante 11 minutos a 45°C.
 16. Resuspender con 50 o 100 μ l de NaOH a concentración de 8 mM. Tomar posteriormente 8 μ l de la muestra resultante.
 17. Incubar 20 minutos a 65°C.

ESTIMAR LA CONCENTRACION DE ADN

18. Alicuotar 20 μ l en tubos Eppendorf y rotularlos.
19. Congelar a -20 °C.

CUANTIFICACION DE CONCENTRACION DE INICIADORES PARA MYCOBACTERIAS

Iniciadores: MAV1, MAV2, MIN1, MIN 2.

Los iniciadores liofilizados se resuspenden con 500 µl de agua libre de nucleasas, se agitan vigorosamente hasta su completa disolución.

1. Diluir 1:100 para tener un volumen final de 500 µl de cada uno (5µl de iniciador más 495 µl de agua destilada).
2. Incubar 20 minutos a 56 °C.
3. Leer la absorbancia a 260nm.
4. Calcular la concentración en mg/ml con la siguiente formula:

$$\mu\text{g/ml} = (\text{Abs a } 260 \text{ nm}) (\text{Dilución}) (40)$$

Para calcular el volumen que contiene 20 pmol (concentración recomendada).

** (40) es el factor para ADN de cadena sencilla.

** (50) es el factor para ADN de cadena doble.

20 pmol = VOLUMEN QUE SE DESEA PREPARAR

$$\frac{\text{VOLUMEN QUE SE DESEA PREPARAR}}{[\mu\text{g/ml}] [0.008]} = 1$$

0.008= Factor

5. Congelar a -20 °C.

METODO DE RECOLECCION DE DATOS

A partir de la recolección de cepas del complejo MAI, se efectuó la revisión de los expedientes clínicos correspondientes para el llenado de una cédula de recolección de datos por cada paciente que fue ingresado en el estudio, diseñada ex profeso, y que incluyó aspectos demográficos, clínicos, de laboratorio, tipo de muestra clínica de donde se obtuvo el aislamiento de MAI.

Después de la realización de la RCP se registró la especie de micobacterias identificadas.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se capturaron en el paquete Excel y se analizaron mediante estadística descriptiva (frecuencias absolutas y frecuencias relativas), medidas de tendencia central (promedio) y de dispersión (desviación estándar).

RESULTADOS

Se obtuvieron 18 cepas de pacientes con MAI: 17 (94.4%) correspondían al género masculino y uno (5.6%) al femenino. La edad promedio fue 39.6 años \pm 10.6 y la frecuencia mayor se ubicó en el grupo etáreo de 40 – 49 años con seis (33.3%) pacientes. Figura 1.

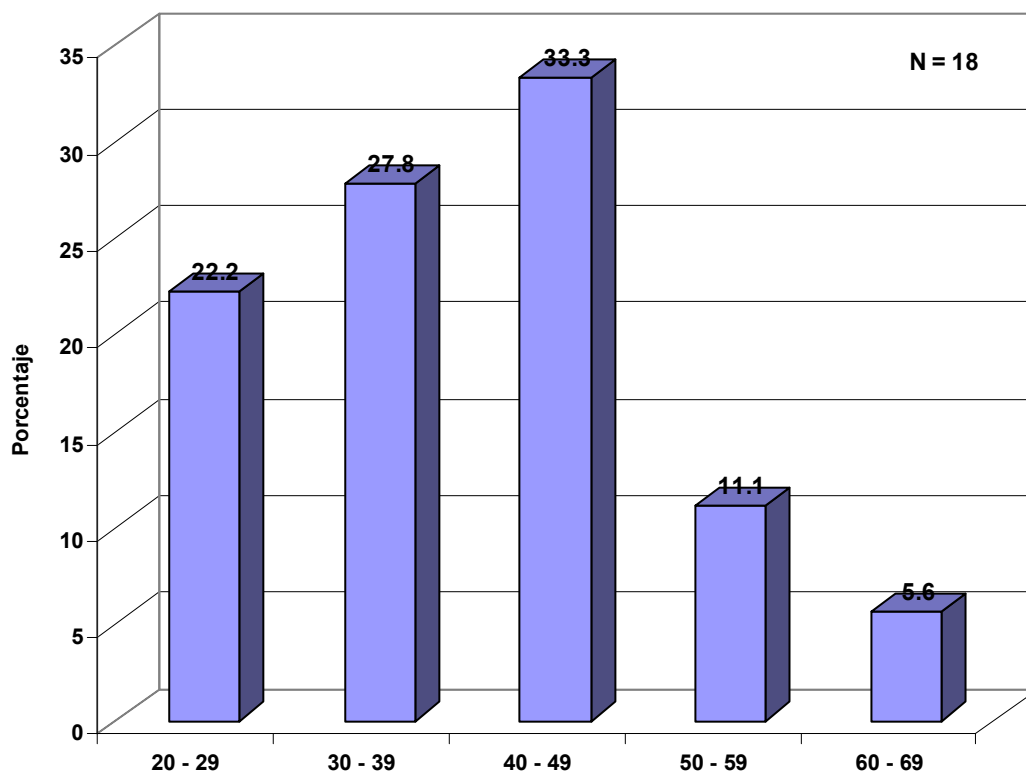


Figura 1. Pacientes con MAI por grupo etáreo

El peso promedio fue 56.9 kilogramos \pm 12.1, la talla promedio fue 1.70 metros \pm 0.10.

La ocupación más comúnmente referida fue empleado por cinco (27.8%) pacientes, seguido por servidor público con cuatro (22.2%). Figura 2

La patología agregada más común fue la candidosis oral y/o esofágica con 17 (94.4%) pacientes, seguida por la neumonía/neumonitis con siete (38.9%). Figura 3

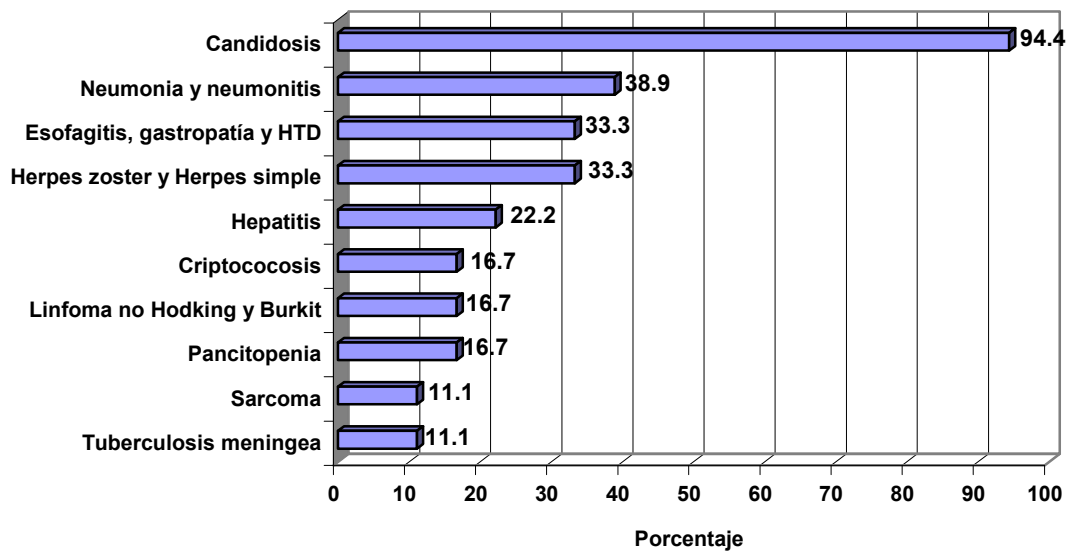
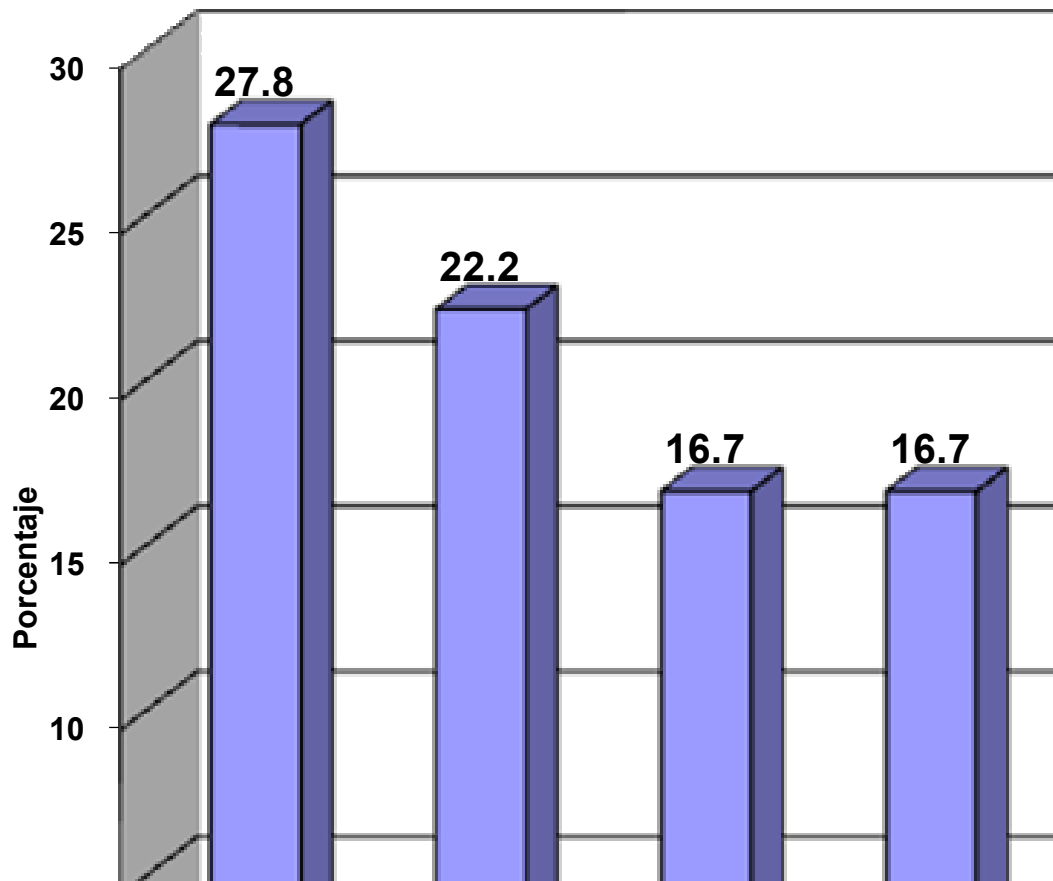


Figura 3. Pacientes con MAI por patología agregada

Los principales signos y síntomas encontrados fueron: fiebre en 18 (100%) pacientes, seguidos por pérdida de peso en 17 (94.4%), fatiga y malestar general en 16 (88.8%). Cuadro I

Cuadro I. Principales signos y síntomas referidos por los pacientes con MAI. (expresados en %)

Fiebre	100	Cianosis	61.1
Diaforesis	55.6	Perdida de peso	94.4
Fatiga	88.9	Linfadenopatía	55.6
Anorexia	72.2	Hepatomegalia	77.8
Diarrea > 2 semanas	55.6	Disnea	55.6
Dolor abdominal	66.7	Esplenomegalia	50
Náusea	50	Cefalea	16.7
Malestar general	88.9	Dermatosis	38.9
Síndrome anémico	66.7	Tos productiva	61.1
Vómito	61.1		

El 61.1% se encontraron con bajo peso, el 27.7% con peso normal y el 11.1% tuvieron sobrepeso.

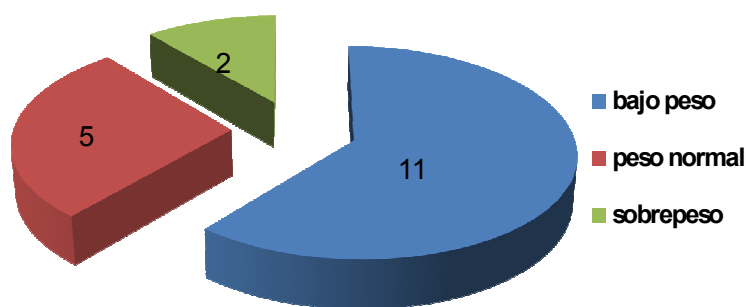


Figura 4. Registro ponderal .

Los valores promedio de las siguientes determinaciones de laboratorio fueron: hemoglobina $9.9 \text{ mg/dl} \pm 2.2$, leucocitos 3801.7 ± 2409.9 , CD4 15.9 ± 14.2 y carga viral 470415.7 ± 235853.0 . Cuadro II y figura 4

Cuadro II. Valores promedio y desviación estándar de las determinaciones de citometría hemática, CD4 y carga viral. (expresados en %)

	Promedio	Desviación estándar
Hemoglobina	9.9	2.2
Hematocrito	29.0	5.6
Leucocitos	3801.7	2409.9
Neutrofilos	2675.4	2031.5
Linfocitos	783.9	576.8
Plaquetas	252733.3	143316.9
CD 4 células/ μ l	15.9	14.2
Carga viral	470415.7	235853.0

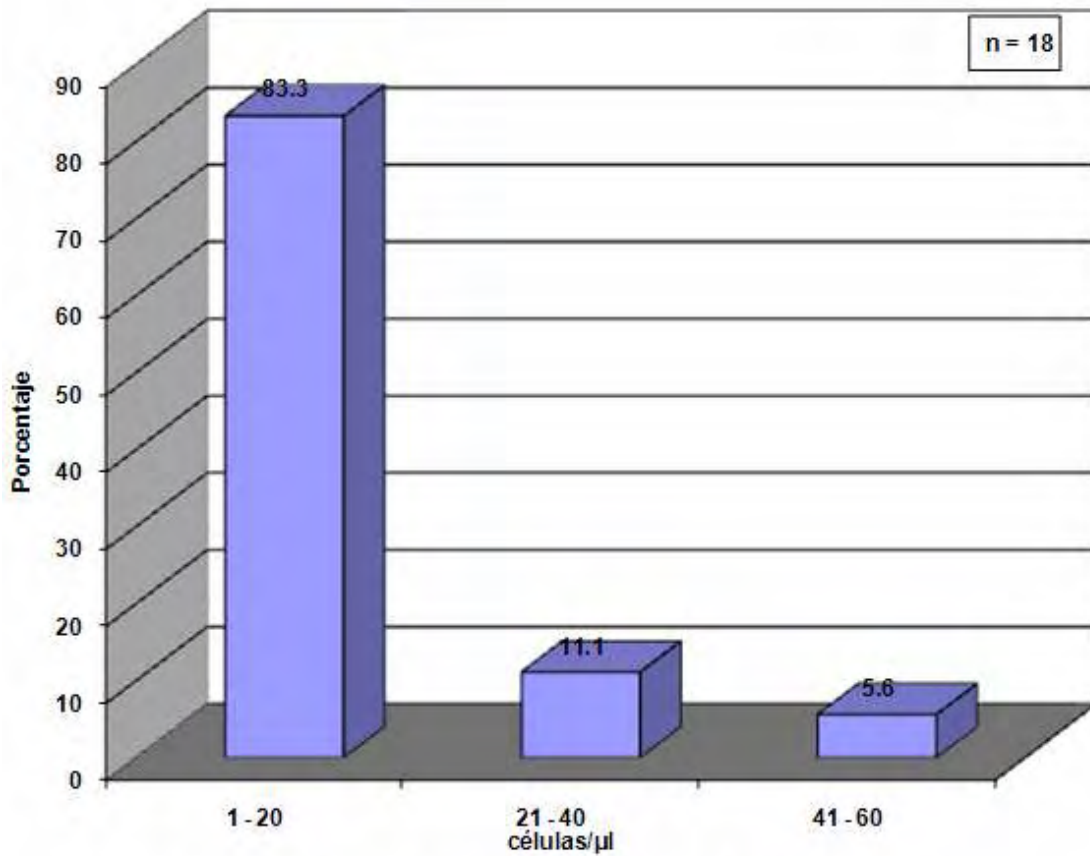


Figura 5. Pacientes con MAI por conteo de linfocitos T CD4

La forma de presentación más frecuente fue la diseminada en 13 (72.2%) pacientes, y los órganos más afectados por MAI en orden de frecuencia fueron: pulmón con 13 (72.2%) pacientes, hígado y médula ósea con 10 (55.6%) pacientes. Cuadro III

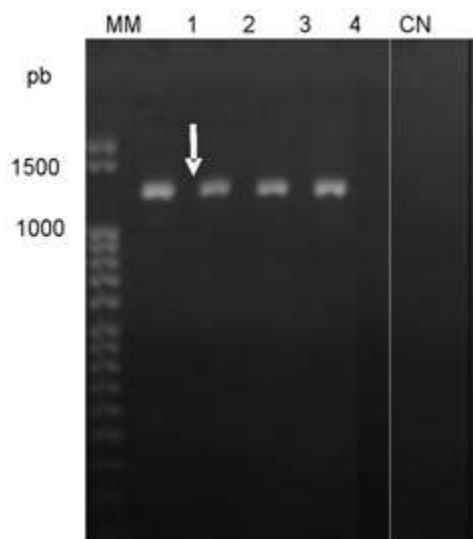
Cuadro III. Órganos afectados en pacientes con MAI (expresados en %)

Pulmón	77.2
Ganglios	44.4
Médula ósea	55.6
Bazo	44.4
Hígado	55.6
Sistema nervioso central	16.7
Digestivo	44.4
Piel y tejidos	5.6
Diseminado	72.2

LECTURA DE LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA.

<i>Mycobacterium avium</i>	18 pacientes	100%
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	0 pacientes	0%

Gel de agarosa con las bandas de 1300 pb



El hemocultivo fue la muestra que proporcionó el mayor porcentaje de aislamientos positivos con 10 (55.6%) casos. Cuadro IV

Cuadro IV. Aislamiento de MAI por sitio de toma de muestra.
(expresados en %)

Hemocultivo	55.6
Mielocultivo	38.9
Ganglio	11.1
Líquido cefalorraquídeo	5.6
Tracto respiratorio	27.8
Biopsia tubo digestivo	11.1

En la telerradiografía de tórax; 14 (77.7%) pacientes presentaron alteraciones, predominando el infiltrado micro y macronodular en 12 (66.6%) casos e infiltrado reticular en 2 (11.1%) casos. Cuatro (22.2%) pacientes tuvieron resultados normales (11.1%). Cuadro V.

Las pruebas de función hepática y la química sanguínea estuvieron dentro de parámetros normales. Cuadro VI

Cuadro V. Principales hallazgos radiológicos en los pacientes con MAI
(expresados en %)

Normal	22.2
Infiltrado intersticial diseminado micro y macronodular	77.7
Infiltrado reticular bilateral	11.1
Infiltrado alveolar	11.1
Consolidación de lóbulo inferior izquierdo	5.6
Infiltrado intersticial bilateral + derrame pleural	5.6
Infiltrado intersticial bilateral difuso	5.6
Infiltrado intersticial focos múltiples	5.6
Infiltrado intersticial micronodular bilateral	5.6
Infiltrado reticulonodular y caverna apical derecha	5.6
Neumonía de focos múltiples	5.6
Sin diagnóstico radiológico	11.1

Cuadro VI. Valores promedio y desviación estándar de pruebas de función hepática y química sanguínea en pacientes con MAI

	Promedio	Desviación estándar
DHL	351.7	234.3
F. alcalina	234.8	119.7
Á. úrico	5.5	2.4
BT	0.6	0.3
BD	0.3	0.2
BI	0.3	0.2
GGT	587.8	536.3
ALT	35.1	25.2
AST	39.0	28.0
Triglicéridos	189.2	53.4
Proteínas totales	5.9	1.2
Albumina	3.2	0.5
Globulinas	2.9	0.8
Relación A/G	1.1	0.2
Colesterol	131.5	37.3
Glucosa	93.1	26.6
Urea	37.7	36.4
Creatinina	1.0	0.5

Un alto porcentaje (72.2%) del total de pacientes, presentó infección por MAI en los primeros cinco años después de establecido el diagnóstico de VIH.

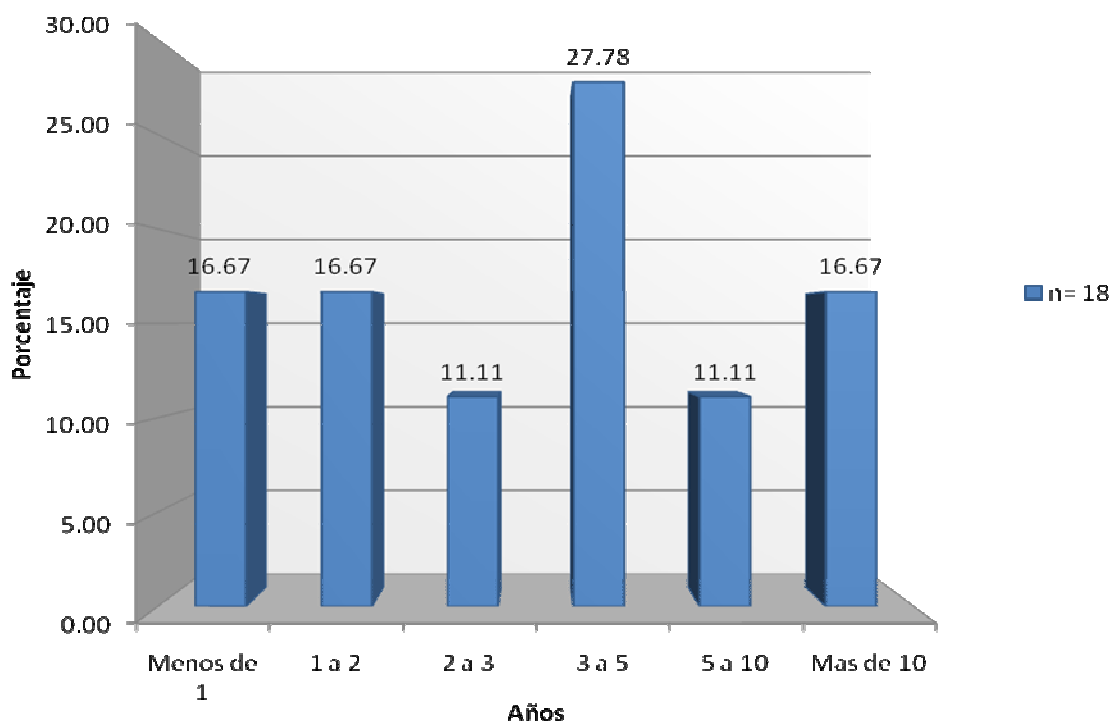


Figura 6. Periodo entre el diagnóstico de VIH y la infección por MAI

Del total de la muestra, el mayor número de pacientes recibía tratamiento antirretroviral antes del diagnóstico de MAI.

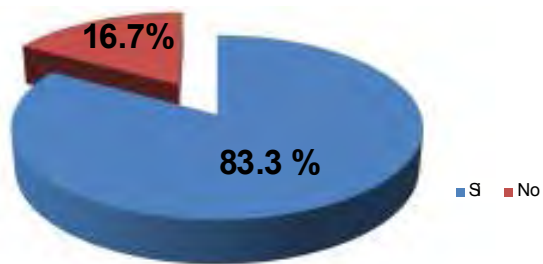


Figura 7. Tratamiento antirretroviral

Se identificó el registro de 3 defunciones, los casos restantes se desconocen por cambio de hospital de atención.

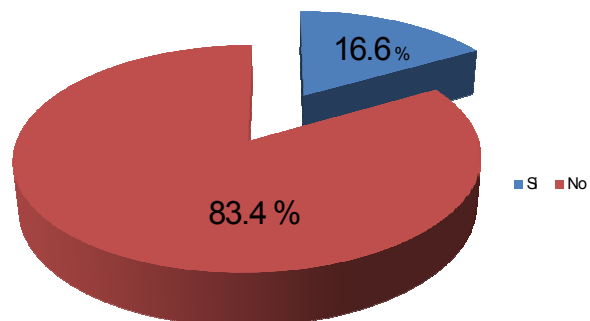


Figura 8. Defunciones

DISCUSIÓN

Los organismos del complejo MAI son ubicuos en el medio ambiente. *Mycobacterium avium* es el agente etiológico en más del 95% de los pacientes con SIDA que desarrollan enfermedad diseminada por MAI.³⁰

Las infecciones causadas por MAI a diferencia de la tuberculosis, no son reportadas estrictamente a las autoridades de salud pública en Estados Unidos ni en otros países como México, por lo tanto, su prevalencia exacta en diferentes áreas geográficas es desconocida.³

En el presente trabajo, se estudiaron 18 pacientes con cepas de MAI identificadas previamente mediante hibridación con sondas de ADN y con diagnóstico de SIDA, y en el 100% de los pacientes se identificó mediante RCP *Mycobacterium avium* como causa de enfermedad, situación semejante a la reportada por Murcia y colaboradores quienes aislaron *M. avium* en cuatro de ocho pacientes estudiados, sin haber identificado *M. intracellulare* en ningún caso.³¹ Con relación al género y el grupo etéreo, los resultados concuerdan con lo reportado en la literatura.³² Al igual que con los órganos afectados.

En cuanto al recuento de CD4 estas se ubicaron muy por debajo de 100 células/ μ l, factor de riesgo para la adquisición de MAI.³³ En general las determinaciones del laboratorio también coinciden con los reportes publicados.³⁴

Los hallazgos radiológicos son semejantes a los descritos por Jacobson.³³

Al considerar la infección por MAI en pacientes con SIDA y tener acceso a pruebas de laboratorio como la RCP, sin duda nos permitió confirmar el diagnóstico en una proporción superior a lo referido por otros autores.³⁵ En la serie de pacientes estudiados, en todos se documentó la existencia del complejo MAI; En el 72.2% de los pacientes el diagnóstico de VIH se estableció antes de 2002, hecho que contradice lo referido por Karakousis *et al* quienes refieren que una condición a favor de MAI es haber sido diagnosticado con SIDA antes de 1986.³⁶

Es recomendable continuar la búsqueda sistemática de MAI en pacientes con SIDA para estar en posibilidades de determinar fehacientemente su magnitud, de tal forma que el personal de salud esté alerta y desarrolle una conducta anticipada para el diagnóstico de MAI. Sin duda el seguimiento de los pacientes con MAI posibilitará dimensionar apropiadamente la prevalencia de MAI entre los pacientes atendidos en nuestro hospital. Por lo anterior, se sugiere continuar con la línea de investigación acerca de MAI en nuestra población, implementando la RCP como prueba de diagnóstico temprano a partir de muestras clínicas de pacientes para detectar y diferenciar MAI en las primeras 72 horas del procesamiento de muestras clínicas y así ofrecer tratamientos oportunos a los pacientes, lo que a largo plazo justifica el mayor costo de la RCP puesto que disminuirá la estancia hospitalaria, el uso de terapia empírica diversa y tendrá impacto en el diagnóstico y terapéutica tempranos así como la curación anticipada de los pacientes.

CONCLUSIONES

1. Se detectó *Mycobacterium avium* en las dieciocho cepas estudiadas.
2. No se identificó en ninguna cepa *Mycobacterium intracellulare*.
3. El género masculino predominó en el 94.4%.
4. El grupo etáreo prevalente correspondió al intervalo de 40 – 49 años, con un promedio de 39.1 años.
5. La fiebre, pérdida de peso y hepatomegalia fueron los signos encontrados con mayor frecuencia.
6. La fatiga y malestar general fueron los síntomas encontrados con mayor frecuencia.
7. La enfermedad diseminada fue la forma de presentación clínica más frecuente.
8. El aparato respiratorio, hígado y médula ósea fueron los sitios más afectados.
9. El hemocultivo fue la muestra de donde se obtuvo el mayor número de aislamientos de MAI.
10. La candidosis oral y/o esofágica se encontró importantemente asociada a MAI.
11. La disminución en la hemoglobina, elevación de la fosfatasa alcalina y linfocitos T CD4 bajos son los parámetros de laboratorio mayormente alterados.
12. El recuento de linfocitos T CD4 fue inferior a 60 células/ μ l con un promedio de 15.9.
13. El infiltrado diseminado micronodular/macronodular e infiltrado reticular fue el hallazgo radiológico mas frecuente.
14. La presencia de infecciones oportunistas previas y la disminución de CD4 por debajo de 50 incrementan el riesgo de enfermedad por MAI.
15. Las infecciones oportunistas dificultan el diagnóstico de MAI por la sobreposición de signos y síntomas.
16. De acuerdo a la Clasificación de Infección por VIH, el total de los pacientes se estadificaron en categoría clínica C3.
17. Se registraron tres defunciones y el resto de los casos se desconocen por haberse derivado a otro hospital.
18. La infección por *Mycobacterium avium* se facilitó por la ausencia de profilaxis en pacientes de alto riesgo.
19. La RCP demostró ser útil en el 100% de los casos al identificar y diferenciar las cepas estudiadas en forma rápida y precisa.

BIBLIOGRAFIA

1. Herdman AV, Steele JC. The new mycobacterial species-emerging or newly distinguished pathogens. *Clin Lab Med* 2004;24:651-690.
2. Falkinham JO. Nontuberculous mycobacteria in the environment. *Clin Chest Med* 2002;23:529-551.
3. Primm TP, Lucero CA, Falkinham JO. Health impacts of environmental mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 2004;17:98-106.
4. Martin-Casabona N, Bahrmand AR, Bennedsen J *et al.* Non-tuberculous mycobacteria: patterns of isolation: a multi-country retrospective survey. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004;8:1186-1193.
5. Tortoli E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of 1990s. *Clin Microbiol Rev* 2003;16:319-354.
6. Subcommittee of the Joint Tuberculosis Committee of the British Thoracic Society. Management of opportunist mycobacterial infections: Joint Tuberculosis Committee guidelines 1999. *Thorax* 2000;55:210-218.
7. Holland SM. Nontuberculous mycobacteria. *Am J Med Sci* 2001;321:49-55.
8. Holland SM. Immune deficiency presenting as mycobacterial infection. *Clin Rev Immunol* 2001;20:121-137.
9. Marras TK, Daley CL. Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria. In: Catanzaro A, Daley CL, eds. *Lung Disease Due to Nontuberculous Mycobacterial Infection*. Philadelphia: WB Saunders; 2003:553-568 *Clinics in Chest Medicine*, Vol 23.
10. Heifets L. Mycobacterial infections caused by nontuberculous mycobacteria. *Semin Respir Crit Care Med* 2004;25:283-295.
11. Miguez-Burbano MJ, Shor-Posner G, Hadrigan S. Non-tuberculous mycobacteria in HIV-infected patients: geographic, behavioural , and immunologic factors. *Lancet Infect Dis* 2005;5:394-395.
12. Reich J, Field SK, Fisher D *et al.* Treatment outcome in *Mycobacterium avium* pulmonary disease: a correction and comment. *Chest* 2005;127:1864-1866.
13. Donnabella V, Salazar-Schicchi J, Bonk S *et al.* Increasing incidence of *Mycobacterium xenopi* at Bellevue hospital: an emerging pathogen or a product of improved laboratory methods? *Chest* 2000;118:1365-1370.

14. Heifets LB, Jenkins PA. Speciation of mycobacteria in clinical laboratories. In: Gangadharam PRJ, Jenkins PA, eds. *Mycobacteria*, Vol. I: Basic Aspects. New York: Chapman and Hall;1998:308-350.
15. Thomsen VO, Andersen AB, Miorner H. Incidence and clinical significance of nontuberculous mycobacteria isolated from clinical specimens during a 2-y nationwide survey. *Scand J Infect Dis* 2002;34:27:180-189.
16. Haverkort F. National atypical mycobacteria survey 2000. *Common Dis Intel* 2003;27:180-189.
17. Barker AF. Bronchiectasis. *N Engl J Med* 2002;346:1383-1393.
18. El Amin NM, Hanson HS, Petterson B, Petrini B, Von Stedink LV. Identification of nontuberculous mycobacteria:16S rRNA gene sequence analysis vs. conventional methods. *Scan J Infect Dis* 2000;32:47-50.
19. Bartos M, Hlozek P, Svastova P *et al.* Identification of members of *Mycobacterium avium* species by Accu-Probes, serotyping and single IS900, IS901, IS1245 and IS 901 flanking region PCR with internal standars. *J Microbiol Methods* 2006;64:333-345.
20. Butler WR, Guthrtz LS. Mycolic acid analysis by high performance liquid chromatography for identification of *Mycobacterium* species. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:704-726.
21. Leite CQJ, da Silva Rocha A, de Andrade Leite SR *et al.* A comparison of mycolic acid analysis for nontuberculous mycobacteria identification by thin-layer chromatography and molecular methods. *Microbiol Inmunol* 2005;49:5721-5728.
22. Desmond E, Loretz K. Use of the Gen-Probe amplified *Mycobacterium Tuberculosis* Direct Test for early detection of *Mycobacterium tuberculosis* in BACTEC 12B medium. *J Clin Microbiol* 2001;39:193-1995.
23. Méndez-Ramírez I, Guerrero DN, Moreno-Altamirano L, Sosa-de Martínez C. El protocolo de investigación. 2^a ed. México: Trillas, 2000.
24. Mejía-Arangure JM, Fajardo-Gutiérrez A, Gómez-Delgado A, Cuevas-Urióstegui MA, Hernández-Hernández DM, Garduño-Espinoza J, Navarrete-Navarro S, Velázquez-Pérez L, Martínez-García MC.. El tamaño de muestra: un enfoque práctico en la investigación clínica pediátrica. *Bol Med Hosp Infant (Mex)* 1995;52:381-391.

25. Sierra R, Cerros MA, Herrera E. Et al. Ventajas del Cultivo en un equipo automatizado y la prueba de PCR para el diagnostico de *Mycobacterium tuberculosis*. *Rev Mex Patol Clin* 2004;51:70-74.
26. Rodríguez A, Palma S, Maestre J, et al. Detección de micobacterias en muestras clínicas mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa. *Rev Biomed* 2000;11:257-262.
27. Chen Z, Butler W, Baumstark B. et al. Identification and Differentiation of *Mycobacterium avium* and *M. intracellulare* by PCR. *J.Clin.Microbiol.* 1996;34:1267-1269.
28. Del Portillo P, Thomas M, Martínez E. et al. Multiprimer PCR for Differential Identification of *Mycobacteria* in Clinical Samples. *J.Clin.Microbiol.* 1996;34:324-328.
29. Murcia MI, Gómez JE, Alvarado F, Bustillo JE, Deivels E, León CI, Triana WA, Vargas EA, Rodríguez E. Prevalencia de micobacterias en pacientes VIH/SIDA positivos en Bogotá D.C. *Rev Colomb Neumol* 2001;13:249-261.
30. Treating Opportunistic Infections Among HIV-Infected Adults and Adolescents. CDC, Infectious Disease Society of America and National Institutes of Health. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2007;56(40):1052-1057.
31. Murcia MI, León CI, de la Hoz F, Saravia J. Asociación micobacterias-VIH/SIDA en pacientes atendidos en un Hospital Universitario en Bogota, Colombia. *Rev Salud pública* 2007;9:86-96.
32. Yazdanpanah Y, Chene G, Losina E, Goldie SJ, Dequae L, Alfandari S, Seage GR, Sullivan L, Marimoutou C, Paltiel AD, Salamon R, Mouton Y, Freedberg KA. Incidence of primary opportunistic infections in two human immunodeficiency virus-infected French clinical cohorts. *Int J Epidemiol* 2001;30:864-871.
33. Jacobson MA, Aberg JA. *Mycobacterium avium* complex and atypical mycobacterial infections in the setting of HIV infection. <http://hivinsite.ucsf.edu/InSite?page=Kb-05-01-05>
34. Gadelha A, Accacio N, Grinztejn B, Veloso V, da Silveira LB, Fandinho F, Saad MH, Lourenco MC, Rolla V. Low incidence of colonization and no cases of disseminated *Mycobacterium avium* complex infection in Brazilian AIDS patients in the HAART era. *Braz J Infect Dis* 2002;6:252-257.

35. Ashitani J, Mukae H, Hiratsuka T, Nakazato M, Kumamoto K, Matsukura S. Plasma and BAL fluid concentrations of antimicrobial peptides in patients with *Mycobacterium avium – intracelulare* infection. *Chest* 2001;119:1131-1137.
36. Karakousis PC, Moore RD, Chaisson RE. *Mycobacterium avium* complex in patients with HIV infection in the era of highly active antiretroviral therapy. *Lancet Infect Dis* 2004;4:557-565.

ANEXO: FORMATO DE CAPTURA DE DATOS

DETECCIÓN Y DIFERENCIACIÓN DEL COMPLEJO *Mycobacterium avium-intracellulare* EN CEPAS DE PACIENTES CON SÍNDROME DE INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA.

Fecha de llenado _____ No. de cama _____

Nombre del paciente _____

Afiliación _____ Edad _____ Sexo _____

Ocupación _____ Lugar de residencia _____

Talla _____ Peso _____

1. El diagnóstico del paciente además de SIDA ¿Incluye otra patología?

Sí () No ()

Cual (es) _____

2. Fecha de infección por VIH _____

3. Condición definitoria de SIDA _____

4. Tiempo de Evolución del Diagnóstico de SIDA a la fecha:

a.) de 0 a 1 año.

b.) De 1 a 2 años.

c.) De 2 a 3 años.

d.) De 3 a 5 años.

e.) De 5 a 10 años.

f.) Más de 10 años

5. Tratamiento ARV que recibe.

6. Estadio de SIDA _____

7. Manifestaciones clínicas:

Fiebre () Diaforesis nocturna () Fatiga () Anorexia () diarrea de 2 o más sem

() Dolor abdominal () Náusea () Vómito () Malestar general () Sx. anémico ()

8. Exploración física:

Pérdida de peso () Linfadenopatía () _____ Hepatomegalia ()

Esplenomegalia () Otros: _____

9. Datos de laboratorio:

Hemoglobina _____ Hematocrito _____ Leucocitos _____

Neutrófilos _____ Linfocitos _____ Plaquetas _____

Albúmina _____ Fosfatasa alcalina _____ CD4 _____

Carga viral _____

10. Sitios de Afección:

Pulmón () Ganglios () Médula Ósea () Bazo () Hígado () Sistema Nervioso ()

Aparato Digestivo () Hueso () Piel y tejidos blandos () Sistema Urinario ()

Diseminada ()

Otros _____

11. Tipo de muestra: _____

12. Resultados RCP:

M. avium ()

M. intracellulare ()

Negativo ()