



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO MEDICO NACIONAL "LA RAZA"
HOSPITAL DE INFECTOLOGÍA
"Dr. DANIEL MÉNDEZ HERNÁNDEZ"

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN
INMUNOLOGIA E INFECTOLOGÍA

**"DETECCION Y DIFERENCIACIÓN DEL COMPLEJO MAC EN SUERO DE
PACIENTES CON SIDA Y MICOBACTERIOSIS DISEMINADA MEDIANTE PCR"**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN:

INFECTOLOGÍA

PRESENTA

MEDICO ALFREDO FRANCISCO VILLAGÓMEZ RUIZ

DIRIGIDO POR

DRA. GUADALUPE DE LOS ANGELES GARCIA ELORRIAGA
INVESTIGADOR ASOCIADO "B" IMSS



MEXICO, D.F. ENERO DEL 2010.



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.



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS
DIRECCIÓN REGIONAL NORTE
DELEGACIÓN NORTE DEL DISTRITO FEDERAL

CENTRO MÉDICO NACIONAL “LA RAZA”
HOSPITAL DE INFECTOLOGÍA
“DR. DANIEL MÉNDEZ HERNÁNDEZ”

SERVICIO DE INFECTOLOGÍA

T E S I S

**“DETECCIÓN Y DIFERENCIACIÓN DEL COMPLEJO MAC EN
SUERO DE PACIENTES CON SIDA Y MICOBACTERIOSIS
DISEMINADA MEDIANTE PCR”**

Número de registro: R-2009-3506-08

AUTOR

DR. ALFREDO FRANCISCO VILLAGÓMEZ RUIZ

Médico residente de Infectología

ASESOR

DRA. GUADALUPE DE LOS ÁNGELES GARCÍA ELORRIAGA

Química, bacterióloga y Parasitóloga. Dr. en Ciencias. Investigador asociado “B”

IMSS- Unidad de Investigación en Inmunología e Infectología.

Centro Médico Nacional “La Raza”

CO ASESOR

DR. CESAR GONZALEZ BONILLA

Jefe de la Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología.

Dr. en Ciencias. IMSS Centro Médico Nacional “La Raza”

PRESENTACIÓN DE TESIS

M.C. Verónica A. Gaona Flores
Coordinación de Educación e Investigación en Salud
CENTRO MÉDICO NACIONAL “LA RAZA”
HOSPITA DE INFECTOLOGÍA “DR. DANIEL MÉNDEZ HERNÁNDEZ”

M.C. Elena Urdez Hernández
Profesora titular del curso de Infectología
CENTRO MÉDICO NACIONAL “LA RAZA”
HOSPITA DE INFECTOLOGÍA “DR. DANIEL MÉNDEZ HERNÁNDEZ”

Doctora Guadalupe de los Ángeles García Elorriaga.
CENTRO MÉDICO NACIONAL “LA RAZA”
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA
EN INMUNOLOGÍA E INFECTOLOGÍA

Doctor Cesar González Bonilla.
CENTRO MÉDICO NACIONAL “LA RAZA”
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA
EN INMUNOLOGÍA E INFECTOLOGÍA

Doctora María Concepción Hernández García.
CENTRO MÉDICO NACIONAL “LA RAZA”
HOSPITAL DE INFECTOLOGÍA “DR. DANIEL MÉNDEZ HERNÁNDEZ”

PERSONAL QUE PARTICIPO EN LA INVESTIGACIÓN

Investigador asesor

Dra. García Elorriaga Guadalupe de los Ángeles.
Doctora en Microbiología. Unidad de Investigación médica en Inmunología e
Infectología H.I.C.M.N La Raza, Instituto mexicano del Seguro Social.

Investigador responsable

Dr. González Bonilla Cesar Raúl.
Jefe de la Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología
C.M.N La Raza, Instituto mexicano del Seguro Social

Un residente de Infectología

Médico Villagómez Ruiz Alfredo Francisco.
Médico residente de primer año de la sub especialidad de Infectología
adscrito al Hospital de Infectología C.M.N. La Raza, Instituto Mexicano del
Seguro Social.

Dos médicos de base.

Dra. Hernández García María Concepción.
Dr. Degollado Estrada Edgar.
Dr. Barriga Angulo Gustavo.
Médicos adscritos al servicio de adulto del Hospital de Infectología C.M.N.
La Raza, Instituto Mexicano del Seguro Social.

Dos químicos bacteriólogo parasitólogo

Q.B.P. Ramírez Cruz Faustina
Q.B.P. Estudiante Arreguin Reséndiz Lilian Estefanía.
Laboratorio de Microbiología del Hospital de Infectología C.M.N. La Raza,
Instituto Mexicano del Seguro Social



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS
Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud
Coordinación de Investigación en Salud

Dictamen de Autorizado

COMITÉ LOCAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD 3506

FECHA 24/08/2009

Estimado César Raúl González Bonilla

P R E S E N T E

Tengo el agrado de notificarle que, el protocolo de investigación en salud presentado por usted, cuyo título es:

DETECCIÓN Y DIFERENCIACIÓN DEL COMPLEJO MAC EN SUERO DE PACIENTES CON SIDA Y MICOBACTERIOSIS DISEMINADA MEDIANTE PCR

fue sometido a consideración del Comité Local de Investigación en Salud, quien de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores consideraron que cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de ética médica y de investigación vigentes, por lo que el dictamen emitido fue de: **A U T O R I Z A D O**.

Habiéndose asignado el siguiente número de registro institucional

No. de Registro
R-2009-3506-8

Atentamente

Dr(a). Manuel Pacheco Ruelas

Presidente del Comité Local de Investigación en Salud Núm 3506

IMSS

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

AGRADECIMIENTOS

A Dios

El misionero entrega mil vidas en la misión para salvar al doliente de su agonía, sin importar la muerte entregando todo con sacrificio y amor, es así con el corazón en la mano le doy gracias en espera de esa libertad que construimos día a día con el fruto de nuestro trabajo....

Por los que ya partieron:

Hoy veo que dieron la vida por la verdad, con su ejemplo sembraron el fruto de un ideal en espera de la felicidad y libertad en aquel que cree. Gracias

A mis padres y mí a tía Mari:

Cansancio, hambre y sed nada les importo para ver para crecer sus pasos fruto de su familia, quien construyen en la entrega y fidelidad siempre por la verdad.

A Sugei mi esposa:

El ejemplo de amor y entrega reflejado en un ser, convertido en una mujer transformado en esperanza para nuestro mañana.

A mis hermanos:

Todos construimos un mundo mejor para salvar día y noche nuestra fe, siguiendo nuestro camino, vemos el sacrificio por el amor y entrega, por ellos estuvieron siempre conmigo en todo momento

A mi maestra:

Gratitud por la esperanza y la confianza prestada, en el trabajo ardua de todos los días en el fortalecimiento del espíritu académico... Gracias Dra. Guadalupe de los Ángeles García Elorriaga.

ÍNDICE

Contenido	Página
AUTORIZACION DE TESIS POR LA DIVISIÒN DE EDUCACION.....	6
DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS.....	7
RESUMEN..... SUMMARY	8
ANTEDECENTES.....	11
JUSTIFICACIÒN.....	18
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... Descripciòn del problema Pregunta de investigaciòn	20
OBJETIVOS.....	21
MATERIAL Y MÈTODOS..... Tipo de estudio Lugar y poblaciòn de estudio Variables Anàlisis estadístico	22
RESULTADOS.....	30
DISCUSIÒN.....	42
CONCLUSIÒN.....	46
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
ANEXOS..... Consentimiento informado Instrumento de evaluaciòn Aspectos éticos	53



REGISTRO NACIONAL DE TESIS DE SUB ESPECIALIDAD

Delegación: **Norte** Unidad de adscripción: **CMN "La Raza" Hospital de Infectología**

Autor:

Apellido paterno: **Villagómez**

Apellido materno: **Ruiz**

Nombre: **Alfredo Francisco**

Matrícula: **9926293**

Especialidad: **Infectología**

Fecha de graduación: **28/2/10**

Título de tesis

"DETECCIÓN Y DIFERENCIACIÓN DEL COMPLEJO MAC EN SUERO DE PACIENTES CON SIDA Y MICOBACTERIOSIS DISEMINADA MEDIANTE PCR"

RESUMEN

Introducción. *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium intracellulare* forman parte del Complejo *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAC) y causan formas diseminadas en 25 a 50% de los pacientes adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). MAC es responsable de infecciones diseminadas que afectan a múltiples órganos con una cuenta de linfocitos T CD4 menor a 70 y en la mayoría de los casos se retrasa el diagnóstico por el lento crecimiento de las micobacterias en los medios de cultivo. La PCR es una técnica altamente sensible y rápida para identificar micobacterias atípicas, permitiendo la identificación rápida y específica de estas, permitiendo el oportuno y temprano tratamiento.

Objetivo. Determinar la utilidad de la PCR para la detección del complejo *Mycobacterium avium e intracellulare* en pacientes con sospecha de enfermedad diseminada con síndrome de inmunodeficiencia adquirida atendido en Hospital de Infectología C.M.N. La Raza.

Material y métodos. Estudio observacional, analítico, prospectivo y transversal que incluye a pacientes con SIDA que acudieron al Hospital de Infectología C.M.N. La Raza con una cuenta de células de linfocitos T sub población CD4/ μ L igual o menor a 70 y con sospecha clínica de micobacteriosis diseminada, entre el periodo de abril a noviembre del 2009. Se evaluó mediante la PCR en sangre periférica y aspirado de medula ósea para la identificación de MAC.

Resultados. El universo de estudio lo conformó 24 pacientes en fase de SIDA y con sospecha de micobacteriosis diseminada a su ingreso, de los cuales 5 (21%) son mujeres y 19 (79%) hombres. La edad promedio fue de 35 años. La cuenta de sub población de linfocitos mínima de 1 y máxima 66, con una media de 23 CD4/ μ L. Sólo el 9 (35%) eran de reciente diagnóstico para VIH. El cuadro clínico identificado al término del estudio clínico del paciente, por frecuencia fue de Pneumocistosis, Tuberculosis pulmonar y las neuroinfecciones. Se identificó *M avium* por medio de la PCR en 3 pacientes en sangre periférica y de estos 2 por aspirado de medula ósea. De los tres casos identificados como *M avium*, su cuenta de linfocitos CD4/ μ L es de 10/11/15.

Conclusiones. Demostró ser útil la identificación por medio de la PCR de *M avium*, para diferenciar de otras micobacteriosis, ya que no se cuenta con ningún otro tipo diagnóstico de forma precisa y rápida.

Palabras clave: *Mycobacterium avium e intracellulare* (MAC)

Número de páginas: 56

ANTECEDENTES

La tuberculosis es un gran problema de salud pública a nivel mundial, se ha estimado por la Organización Mundial de la Salud que afecta a la población mundial en una proporción de uno de tres, afecta a más de 2 billones de personas en toda la urbe¹. La gran mayoría de los casos se presenta por frecuencia en 22 países, China y la India contribuyen en más de 3 millones de casos por año, esta incidencia prevalece en los países pobres².

La epidemiología de la infección y la enfermedad por Micobacterias no tuberculosis (MNT) en general es difícil de describir y precisar por diversas razones, la primera y más importante es que no se reportan de manera oficial, la segunda por que genera confusión para su identificación y aislamiento. La falta de consenso sobre la definición de un síndrome clínico causante de MNT, ha dado pauta a una gran heterogeneidad de reportes y serie de casos de esta condición. Los resultados han sido inciertos sobre la verdadera epidemiología de la enfermedad. Recientemente la ATS a reportado que en las ciudades industrializadas, las MNT se encuentran presente en un numero de 1 a 1.8 por 100,000 habitantes, y los laboratorios de microbiología el aislamiento se ha vuelto mas frecuente que *M. tuberculosis*^{3,13}. En los Estados Unidos el número infección por tuberculosis es de 4.6 por 100 000 habitantes, sin embargo se ha visto discrepancia entre el número de cultivos positivos para MNT y el número de pacientes diagnosticados con la enfermedad⁴. Un reciente estudio basado en intra dermo reacción con antígeno para MNT, se encontró que 1 de 6 norteamericanos a estado en contacto con alguna MNT⁵.

Las Micobacterias no tuberculosis (MNT) es el terminó que se ha empleado para distinguir a las micobacterias ambientales de las micobacterias que causan lepra (*M. leprae*) y tuberculosis (*M. tuberculosis*)⁶. Las MNT son micro organismo del medio ambiente que se encuentran tanto en el agua libre como en la almacenada. También se encuentran en el suelo, polvos, flora, animales y alimentos⁷⁻¹¹. Las micobacterias se benefician de la cloración o zonificación del agua que elimina a otras bacterias de crecimiento más rápido, que compiten 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 a su resistencia a la cloración¹⁰. En Europa y Estados Unidos de Norteamérica, el complejo *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAC) es la causa mas común de enfermedad pulmonar por MNT. Otras especies también se han encontrado asociados con menor frecuencia: *M. cansasii*, *M. fortuitum*, *M. scrofulaceum*, *M. chelonae*, *M. gordonae*, *M. xenopi*, *M. asiaticum*, *M. flascens*, *M. malmoense*, *M. szulgai*, *M. haemophilum*, *M. simiae*, *M. genavence* y *M. celatum*¹².

Las infecciones causadas por las MNT a diferencia de la tuberculosis, no son reportadas estrictamente a las autoridades de salud pública en los Estados Unidos y en otros países como México, por lo tanto, su prevalencia exacta en diferentes áreas geográficas es desconocida¹⁴.

El advenimiento de tratamientos efectivos para la tuberculosis en la década de los 50' y con el aislamiento de micobacterias comenzaron a ser cultivadas de manera rutinaria y se reconoció que algunos de los casos eran debido a infección por MNT. 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), reportan en 1979 a 1980 que un tercio de los aislamientos de micobacterias eran MNT. En Filadelfia entre la década de los 80 la prevalencia del MNT se incremento. La proporción entre los aislamientos de TB con respecto a los MNT disminuyo de 3.2:1 entre 1976 a 1981 a 1:1.6 entre 1986 a 1991 en un hospital comunitario del sur de California. El complejo MAC es la MNT más común aislada a partir del esputo y especímenes pulmonares¹⁵.

Mycobacterium avium y *Mycobacterium intracellulare* forman parte del Complejo *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAC por sus siglas en inglés) y causan formas diseminadas en 25 a 50% de los pacientes adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), que no habían recibido tratamiento antirretroviral (ARV)^{16,17}.

Hay más de 120 especies de micobacteria identificadas que causan enfermedad en el humano¹⁸⁻²¹. *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAC) y *M.kansasii* actualmente son las más frecuentes causantes de enfermedad en el humano^{3,22}. A diferencia de *M. tuberculosis* y *M. leprae*, las MNT son organismos de vida libre y solamente 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 persona¹⁵. Comúnmente causan infecciones de la piel, tejidos blandos, linfadenitis, enfermedad pulmonar y originan infecciones diseminadas en pacientes con SIDA^{17, 23-24}.

Con excepción de las enfermedades y tejidos blandos, la entrada principal de MNT que causan enfermedad pulmonar diseminada y en otras localizaciones son las vías gastrointestinales y respiratorias. Los factores de riesgo para desarrollar la infección por MNT son varios: el primero relacionado a condiciones medicas coexistentes que afectan las barreras naturales o al sistema inmune como el HIV; el segundo tiene que ver con el ambiente laboral o de vida; el tercer corresponde al ámbito demográfico donde se a 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 *M. avium*. A

menudo este fenómeno demográfico está asociado a varias condiciones predisponentes como anormalidades torácicas y enfermedades del tejido conectivo. Es importante enfatizar que el desarrollo de infecciones causadas por MNT pueden manifestarse sin obvias condiciones predisponentes^{15, 25-26}.

La prevalencia de Tuberculosis ha disminuido en países desarrollados por estándares efectivos de control, pero la proporción de la enfermedad por MNT se ha incrementado en los últimos años²⁷.

La frecuencia por la enfermedad de MNT usualmente se estima a partir del número de cultivos positivos²⁸. Los reportes de laboratorio han mostrado incrementos en el número de MNT aislados. El uso de medios líquidos y sólidos para el cultivo de micobacterias a incrementado el diagnostico de infección por MNT a partir de muestras humanas²⁹. Dependiendo del tiempo para producir colonias visibles en medios de cultivos sólidos, ya sean en menos de 7 o más de 7 días, la MNT se dividen en dos grupos; micobacterias de rápido y lento crecimiento³⁰.

Además del cultivo en medio de Lowenstein-Jensen, existen métodos rápidos para determinar la especie de micobacterias como las sondas de ácido nucleicos, la reacción de cadena de la polimerasa (PCR), cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) y secuenciación de ácidos nucleicos^{31, 32}.

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 PCR han ayudado a distinguir a los miembros del complejo MAC de las especies estrechamente relacionadas, tales como *Mycobacterium scrofulaceum* y pueden distinguir entre los miembros de MAC: *M. intracellulare* y *M. avium* y sus sub especies; *M. avium*, *M. avium subsp. sensu lato* que infecta a los pájaros, *M. avium paratuberculosis* responsable de enfermedades del sistema reproductor, glándulas mamarias e intestinales en los rumiantes domésticos y salvajes, *M. hominissuis* el cual causa las infecciones micobacterianas en humanos y puercos³³⁻³⁵.

La cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) es también un método confiable para distinguir las especies de micobacterias. Diversos estudios han corroborado su utilidad con una especificidad del 70-95% según la especie. En un estudio comparativo con sondas de ADN se reporto un 100% de especificidad y 99% de sensibilidad a favor del último para la identificación de *M. tuberculosis*³⁶.

Un estudio comparativo reciente de CLAR y PCR encontró con resultados discrepantes en 14% de 83 muestras de MNT; la discrepancia en el 4% de los casos fue debida a infección polimicobacteriana³⁷.

Las técnicas de hibridación de sondas de ácidos nucleicos son altamente sensibles. La identificación de micobacterias mediante la secuenciación de 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 aisladas³⁸.

La carencia de reportes sobre la enfermedad causada por MNT son 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 microscopia directa de muestras de esputo, y aun 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 está 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 solo alrededor de 5% de los paciente resulta 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, sin embargo se le considera el estándar de oro en el diagnostico de las micobacterias²⁶.

Las micobacterias constituyen uno de los principales problemas de salud en pacientes con SIDA. Los agentes etiológicos más importantes pertenecen al complejo MAC, detectados en 50% de los casos durante la fase tardía de la enfermedad o en la autopsia. *Mycobacterium tuberculosis* se le adjudica un efecto sinérgico con el virus de la inmunodeficiencia humana⁶.

Antes de la epidemia de SIDA, solo había registrado en la literatura 78 casos de micobacteriosis diseminadas⁷. La diseminación del complejo MAC solo se encuentra reportada en 37 casos, sin embargo MAC se convirtió en una 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, medula ósea, nódulos linfáticos, pulmón, hígado, bazo, intestino, piel, riñón y cerebro^{7, 10, 12}. En América Latina y el Caribe hay reportes que varían del 4% al 14%¹³.

El grupo de micobacterias conocido como complejo MAC pertenece al género *Mycobacterium* no tuberculosas o ambientales. El pH óptimo de desarrollo, en laboratorios oscila entre 5 y 5.5. Este complejo incluye *Mycobacterium intracellulare* y *Mycobacterium avium*, subespecies *M. avium*, subespecies *M. avium avium*, *M. avium paratuberculosis* y *M. avium silvaticum*^{10, 15, 23}.

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 gram positivos, ácido-alcohol resistente y aerobios. Están encuadrados en el grupo III de la clasificación de Runyon, esto por su crecimiento lento y no foto cromógenos^{10, 15}. El cuadro clínico de la diseminación sistemática de MAC se definió hasta el advenimiento del SIDA^{4, 10}.

Se considera actualmente que las vías de infección principales son a través del tracto gastrointestinal y respiratorio^{4, 10, 13}.

El principal factor de riesgo para la infección por MAC en los pacientes con SIDA es la alteración de la inmunidad celular medida por los niveles de los linfocitos T CD4. La infección por MAC ocurre raramente en pacientes con cuentas de linfocitos T CD4 mayores de 100 células¹⁰. Nuestro grupo de trabajo encontró la presencia de MAC con una cuenta inferior de linfocito T CD4 menor a 70⁵⁴.

La infección por MAC se manifiesta como una enfermedad diseminada en los pacientes con estadios avanzados de VIH que presentan un recuento de linfocitos T CD4 inferior a 50 células^{27,35,50,51,54}. El cuadro clínico se presenta con frecuencia por fiebre, pérdida de peso, anorexia y escalofríos nocturnos⁴⁰. La incidencia de la infección por MAC se correlaciona con la supervivencia de los pacientes a partir del diagnóstico de SIDA. Así, la incidencia de la bacteriemia por MAC 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 MAC, un año después del diagnóstico de SIDA es de 3% en pacientes con cuentas de linfocitos entre 100 y 199 células¹⁰. Actualmente la incidencia de pacientes con SIDA con infección por MAC se ha presentado en un rango de 10.5% a 21.6% en algunas ciudades de los Estados Unidos, comparado con el 2.4% y 2.6% en Trinidad y Kenia respectivamente^{8, 48}.

No está bien definido el porqué los pacientes con SIDA son tan susceptibles a la infección diseminada por MAC, 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*^{36, 37}.

Los signos y síntomas clínicos asociados con la infección diseminada por MAC 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^{39, 40}. Pueden presentar síntomas no específicos o manifestarse como empeoramiento de una enfermedad previa.

Los hallazgos a la exploración física frecuentemente que se presentan son fiebre, caquexia con o sin manifestaciones a la exploración de tórax, linfadenopatía intra abdominal o hepato esplenomegalia. La elevación persistente de la fosfatasa alcalina hepática es muy frecuente y se ha considerado como un indicador sensible para la infección diseminada por MAC^{27, 29}.

Mycobacterium avium se ha identificado como la causa más frecuente de MNT con afección pulmonar a nivel mundial^{32, 40-43}. MAC puede causar linfadenitis (usualmente en niños), afección en tejidos blandos y enfermedad diseminada en pacientes inmuno suprimidos por VIH con SIDA⁴⁴⁻⁴⁷.

La infección por MAC 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 e ileitis 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 Kaposi¹⁰. Otras manifestaciones inusuales son: colecistitis, peritonitis, pseudo tumor de apéndice cecal, localizaciones cutáneas, esplénicas, cerebrales, y de medula ósea; úlceras palatinas y gingivales, artritis séptica, osteomielitis, endoftalmitis, pericarditis y hemorragias gastrointestinales masivas. El compromiso cutáneo se produce por diseminación vía hematogena⁴⁹.

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 (TNF), Interferón gamma (IFN γ), Interleucina 12 (IL-12)⁴⁹.

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

En los pacientes con infecciones diseminadas por MAC, es posible aislar la bacteria mediante cultivo de líquidos y tejidos incluyendo sangre, heces, orina, esputo, líquido cefalorraquídeo, medula ósea, y otros tejidos. En sangre suele recuperarse la micobacteria hasta en 94% de los casos, heces 61%, esputo 59%^{24, 50}.

El diagnóstico convencional de micobacterias tiene como desventajas la baja sensibilidad y especificidad del análisis microscópico, su límite inferior de detección es de 10 000¹² bacilos/mL de muestra, y el lento crecimiento de las micobacterias patógenas en cultivo. Sin embargo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 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^{27, 51}.

La amplificación de moléculas blanco a un nivel detectable, por la PCR, constituye el mejor sistema desarrollado para la detección de micobacterias. Esta técnica no solo es altamente sensible y rápida, sino que permite identificar las especies de micobacterias si se usan los iniciadores específicos^{27, 52}.

La PCR 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 enfermedad⁵³.

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 PCR. Finalmente, en la tercera etapa se lleva a cabo la detección de los fragmentos amplificados en la PCR por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. En general este proceso suele durar aproximadamente 24 horas⁵³.

Un obstáculo para la aplicación de esta tecnología en nuestro medio ha sido el elevado costo de la prueba.

JUSTIFICACIÓN

La carencia de reportes sobre la enfermedad causada por micobacterias no tuberculosis (MNT) principalmente en países en desarrollo, está relacionada a los esfuerzos insuficientes para identificar a estos agentes. Afectando a la población económicamente productiva⁴⁸. En algunas áreas de estos países, el examen de muestras de laboratorio está limitado a microscopia directa y la realización del ZN de muestras de esputo, aun en donde el cultivo es rutina de los protocolos de laboratorio, los médicos pueden no estar alerta de esta patología. El número de pacientes sujetos a tal examen está limitado solamente a aquellos con manifestaciones clínicas y radiológicas de tuberculosis. En contraste, en los Estados Unidos el examen bacteriológico está ampliamente solicitado por el médico que solo alrededor de 5% de los pacientes resulta como positivos para micobacteria no tuberculosis. 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, siendo el estándar de oro para el diagnóstico de las micobacterias²⁶.

Antes de la epidemia de SIDA, solo había registrado en la literatura 78 casos de micobacteriosis diseminada⁷. La diseminación del complejo MAC solo se encuentra reportada en 37 casos, sin embargo el complejo MAC se convirtió en infección oportunista 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, medula ósea, nódulos linfáticos, pulmón, hígado, bazo, intestino, piel, riñón y cerebro^{7, 10, 12}. En América Latina y el Caribe hay reportes que varían del 4% al 14%¹³.

En los últimos 10 años es evidente el incremento de infecciones por complejo MAC, principalmente en pacientes con inmuno comprometido y en particular en pacientes con SIDA que tienen cuenta de linfocitos T CD4 inferiores a 50 células^{35, 40, 54}.

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 PCR es una técnica altamente sensible y rápida para identificar micobacterias atípicas³⁸.

En nuestro país no contamos con información epidemiológica ni de la presentación clínica en nuestras diferentes áreas geográficas que permita valorar su impacto y comportamiento.

El diagnóstico convencional de micobacterias tiene como desventajas la baja sensibilidad y especificidad del análisis microscópico, su límite inferior de detección es de 10 000 bacilos/mL¹² de muestra, y el lento crecimiento de las micobacterias patógenas en cultivo. Sin embargo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 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^{27, 51}. Por otra parte una oportuna y temprana identificación del agente permite un tratamiento de elección, lo que permitirá al clínico una temprana intervención.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los últimos 10 años es evidente el incremento progresivo de infección por complejo MAC, principalmente en pacientes con inmuno compromiso y en particular en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida que tienen una cuenta de linfocitos T CD4 inferiores a 50 células^{35, 40}.

El complejo MAC es responsable de infecciones diseminadas que afectan a múltiples órganos, y en la mayoría de los casos el diagnóstico se retarda por la técnica de diagnóstico microbiológico de cultivo convencional. La PCR es una técnica altamente sensible y rápida para identificar micobacterias³⁸.

En nuestro país no se cuenta con información epidemiológica ni de presentación clínica, que permita valorar su impacto y comportamiento, por otro parte no se cuenta con estudios previos para la detección de complejo MAC.

Realizamos la identificación por medio de PCR del complejo *Mycobacterium avium e intracellulare* en los pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida con sospecha de enfermedad por micobacteriosis diseminada^{38, 55}.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Es de utilidad la PCR para la detección del complejo *Mycobacterium avium e intracellulare*, en suero de los pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida con sospecha clínica que acuden al Hospital de Infectología C.M.N. La Raza?

OBJETIVO

OBJETIVO GENERAL

Determinar la utilidad de la PCR para la detección del complejo *Mycobacterium avium e intracellulare* en pacientes con sospecha de enfermedad diseminada con síndrome de inmunodeficiencia adquirida, atendidos en el Hospital de Infectología C.M.N. La Raza.

MATERIAL Y METODOS

DISEÑO DE ESTUDIO

Tipo de estudio

Por la manipulación de la variable: Observacional.

Por la recolección de datos: Prolectivo.

Análisis en el tiempo: Prospectivo.

Por el número de mediciones: Transversal.

Por el número de grupos: Analítico.

UNIVERSO

Está constituido por el total de pacientes con SIDA que acuden al Hospital de Infectología C.M.N. La Raza con una cuenta de células de linfocitos T CD4 igual o menor a 70^{54} y con sospecha clínica de micobacteriosis diseminada.

UBICACIÓN ESPACIO TEMPORAL

Periodo de estudio

Abril de 2009 a noviembre del 2009.

Lugar del estudio

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

VARIABLES

Variable independiente

- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Variable dependiente

- Complejo *Mycobacterium avium e intracellulare* (MAC).

SELECCIÓN DE LA MUESTRA

Población fuente.

Se identificó a los pacientes con diagnóstico de SIDA con una cuenta de linfocitos T CD4 igual o menor a 70, con sospecha clínica de micobacteriosis diseminada por parte de su médico tratante, siendo estos derechohabientes del IMSS; en el periodo comprendido de abril de 2009 a noviembre del 2009. La selección fue consecutiva por un método no probabilístico por conveniencia.

DETERMINACIÓN ESTADÍSTICA DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA

La característica del protocolo de investigación por ser un estudio piloto analiza los datos de un grupo de pacientes en un momento determinado dentro de la historia natural de la enfermedad, de los cuales se sospeche la infección por el complejo MAC. Actualmente no se cuenta con una base de datos sobre la prevalencia de estas entidades en nuestro país para su identificación, y mucho menos en nuestra unidad por lo que el cálculo no es factible de la muestra. Nuestro grupo de estudio identifico en el periodo comprendido del 2006 al 2007 sólo 19 casos obtenidos de cultivos y no directamente del paciente.

CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LAS UNIDADES DE MUESTREO

A. Criterios de inclusión

- Pacientes de ambos géneros.
- Pacientes igual o mayores de 18 años.
- Derechohabientes del Instituto Mexicano del Seguro Social.
- Pacientes con atención médica en el Hospital de Infectología “Dr. Daniel Méndez Hernández” CMN La Raza, hospitalizados o vistos en la consulta externa.
- Pacientes con diagnóstico de SIDA y cuenta de linfocitos T CD4 menor o igual a 70.
- Sospecha clínica de micobacteriosis diseminada por parte de su médico tratante.
- Pacientes con falta de respuesta clínica al tratamiento de *Mycobacterium tuberculosis* sin identificación o aislamiento de esta.

B. Criterios de no inclusión.

- No derechohabientes.
- Pacientes con una cuenta de linfocitos CD4 igual o mayor de 71.

C. Criterios de exclusión.

- Pacientes con identificación o aislamiento de *Mycobacterium tuberculosis*.
- Pacientes con identificación diferente al complejo MAC.

PROCEDIMIENTO

Iniciamos el estudio con previa aprobación del Comité de investigación Coordinación de Educación e Investigación en Salud C.M.N. "LA RAZA", Hospital de Infectología "Dr. Daniel Méndez Hernández". Se procedió a identificar a los pacientes con sospecha de micobacteriosis diseminada que cumplieran con los criterios de inclusión. A los cuales se les tomo como parte de su protocolo de estudio la toma de muestra periférica para la obtención de suero y mielocultivo para la identificación de MAC por PCR.

DISEÑO Y DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN, NATURALEZA DE LOS ITEMS Y ESCALA DE MEDICIÓN.

Se identificaron a los pacientes hospitalizados o en la consulta externa con SIDA y sospecha clínica de micobacteriosis diseminada con una cuenta de linfocitos T CD4 igual o menor de 70, a los que como parte del protocolo de estudio se les realizó toma de muestras para identificación del agente en sospecha.

La recolección de muestras y especímenes se realizó en todos los pacientes como parte del protocolo de investigación con sospecha de micobacteriosis diseminada, obteniendo suero de la toma de muestra periférica y mielocultivo, al igual en los casos de toma de cultivo de tejidos dirigidos.

Se recolectaron varios especímenes para identificación del complejo MAC mediante PCR de los pacientes que reunieron los criterios de selección. Se realizó la extracción de ADN a partir de la toma de suero, y se procesaron con la técnica de PCR 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. Los productos de la PCR se revelaron mediante electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio⁵⁶.

M. avium-intracellulare

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

REGIONES DE ADN A AMPLIFICAR

Gen amplificado	Denominación	Secuencia	Posición
<i>M. avium</i>	MAV	5'-CCT CCA 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
Desnaturalización	94	1	40
Alineamiento	55	2	
Extensión	72	6	
Extensión final	72	15	1

EXTRACCION DE ADN LISIS Y HOMOGENIZACION DE LA MUESTRA

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

SEPARACION DE FASES

3. Adicionar 100 µl de cloroformo. Tapar los tubos y agitar. Incubar a temperatura ambiente 2 a 3 minutos.
4. Centrifugar a 1400 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 150µl 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 0.1 M en etanol al 10% utilizar 500 µl 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. Se resuspendió el ADN con 800 µl 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 sobrante. 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 (>200µl de ADN).
15. Secar el ADN en la centrifuga de vacio durante 11 minutos a 45°C.
16. Re suspender con 50 o 100µl de NaOH a concentración de 8 mm. Tomar posteriormente 8µl de la muestra resultante.
17. Incubar 20 minutos a 65°C.

ESTIMAR LA CONCENTRACION DE ADN

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

CUANTIFICACION DE CONCENTRACION DE INICIADORES PARA MYCOBACTERIAS

Iniciadores: MAVI, MAV2, MIN 1, MIN 2.

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

1. Diluir 1:100 para tener un volumen final de 500µl de cada uno (5 µl de iniciador mas 495 µl de agua destilada).
2. Incubar 20 minutos a 56 °C.
3. Leer la absorbencia a 260 nm.
4. Calcular la concentración en mg/ml con la siguiente fórmula:
$$\mu\text{g/ml} = (\text{Abs a } 260\text{nm}) (\text{Dilución}) (40)$$

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.

$$20 \text{ pmol} = \frac{\text{VOLUMEN QUE SE DESEA PREPARAR}}{[\mu\text{g/ml}]} \times \frac{1}{[0.008]} = 1$$

0.008= Factor

5. Congelar a -20 °C.

TECNICA DE CORRIMIENTO DE LAS MUESTRAS

Una vez obtenida la extracción del DNA de las muestras problemas se procedió a la hidratación de estas (volumen estimado de 2.5µL). Se agregaron 12.5µL de Maxter Mix por cada muestra, así como de 0.5µl de iniciadores, tanto para el control positivo y negativo. El control negativo se le excluye la muestra de DNA del suero problema.

El control positivo se cuenta con DNA para MAC a una dilución de 1:100, extraída directamente de la cepa tipo, una vez obtenida las diluciones se corrierón en el termociclador en un tiempo de 6,25hrs

Una vez realizado los ciclos de temperaturas para la [reacción de la cadena de la polimerasa](#) de amplificación, se montaron en gel de agarosa aun volumen de 3µL con 2µl de Buffer por un tiempo de 45min a 70 volts. En la primera banda se colocaron los pesos moleculares como referencia.

Los productos de la PCR se revelaron mediante electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio.

METODO DE RECOLECCION DE DATOS

A partir de la recolección de los especímenes de los pacientes hospitalizados o en la consulta externa, se precedió a la separación del suero para la identificación del complejo MAC. Realizamos 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, morbilidad, laboratorio y el tipo de muestra clínica.

ANALISIS 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) así como de dispersión (desviación estándar).

RESULTADOS

El universo de nuestra muestra consiste en 24 pacientes que se obtuvieron en el periodo del mes de abril a noviembre del 2009, los cuales se hospitalizaron por diferentes causas agregadas a la infección por VIH en el Hospital de Infectología del CMN "La Raza" IMSS. La distribución de acuerdo a género fue de 19 hombres (79.2%) y 5 mujeres (20.8%). En la figura 1 se aprecia la distribución por género.

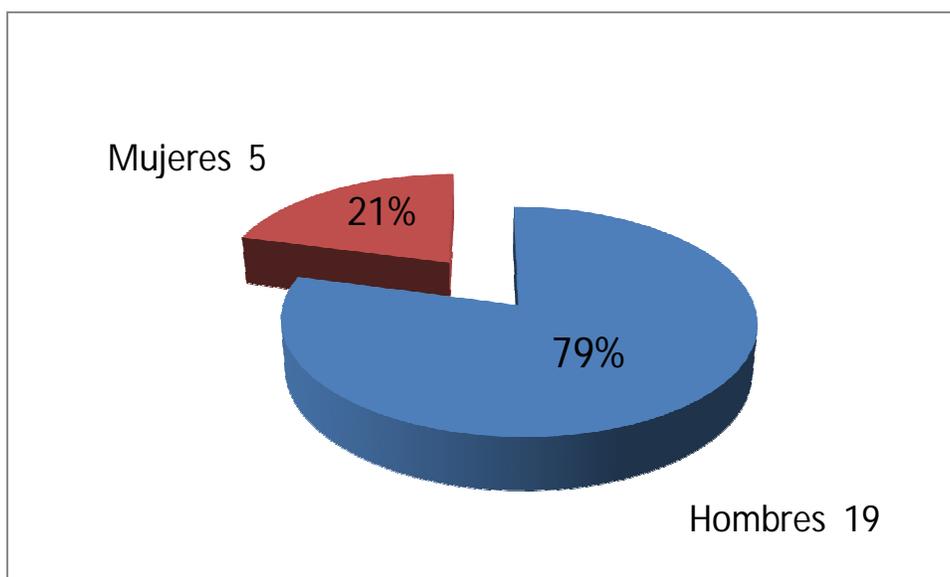
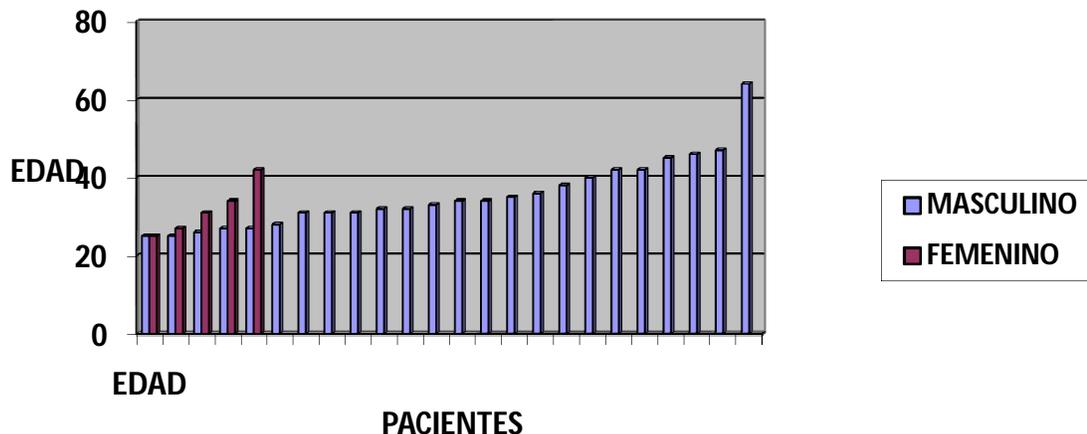


Figura 1. Género

Nuestro estudio piloto fue parte del protocolo de estudio en pacientes con VIH en fase de SIDA y sospecha de micobacteriosis diseminada, como parte de la búsqueda del agente etiológico que afecta a estos pacientes.

En el grupo de estudio, se identificó que la edad menor fue de 25 años y la máxima de 64 años, con una media de 35 años como se aprecia en la figura 2.



Gráfica No 2. Edad por género

El Índice de masa corporal (IMC) su mínima es de 13 con una máxima de 24 y su media del grupo fue de 18.9 ± 3 como se muestra en la figura 3. El bajo peso por IMC lo observamos en la figura 3.1 donde el 71% (17) se encuentran con peso normal y sólo el 29% (7) se considera con bajo peso.

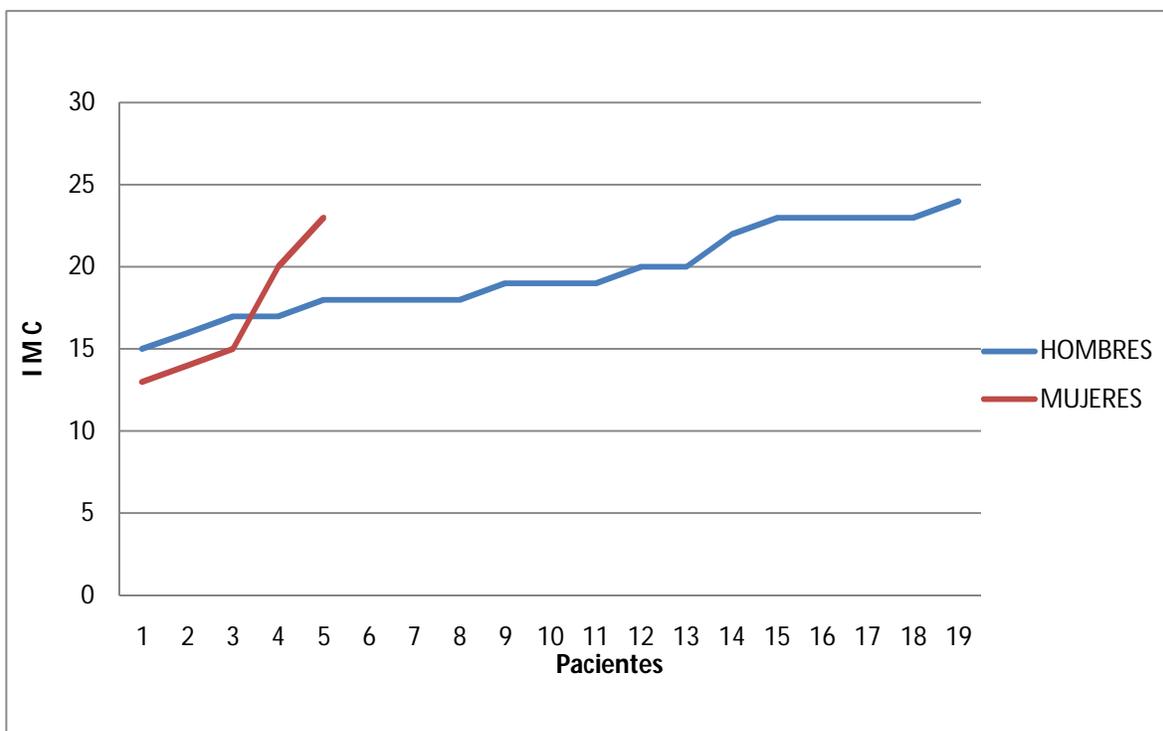


Figura No 3. Índice de masa corporal

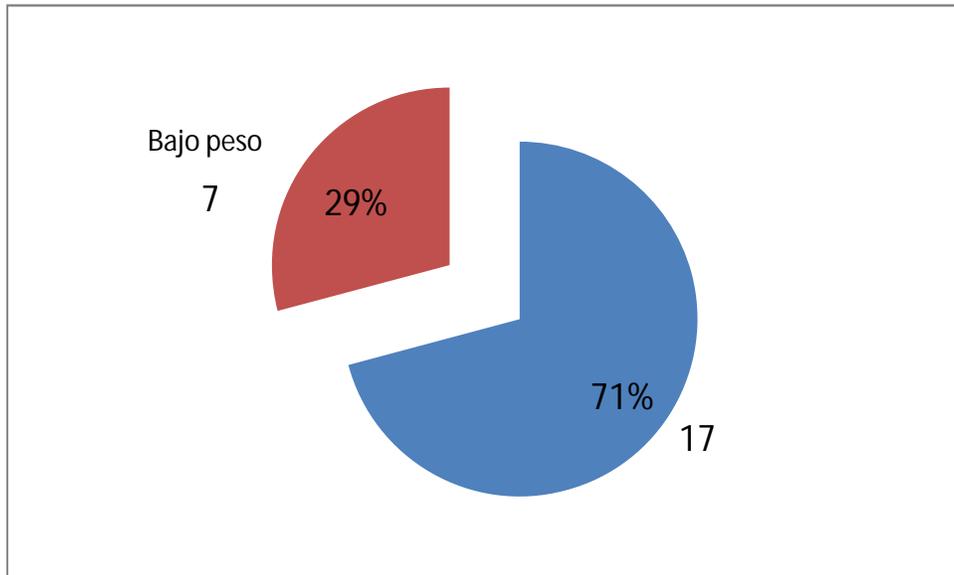


Figura No 3.1 IMC

La cuenta de la sub población de linfocitos CD4 a su ingreso al hospital, se encontró con una mínima de 1 y máxima de 66 CD4 / μ L y su media de 23 CD4/ μ L, con una desviación estándar de DE 18.22 como se muestra en la figura 4. Las muestras se procesaron una vez obtenidos los resultados de la cuenta de la sub población de linfocitos, como parte de los criterios de inclusión.

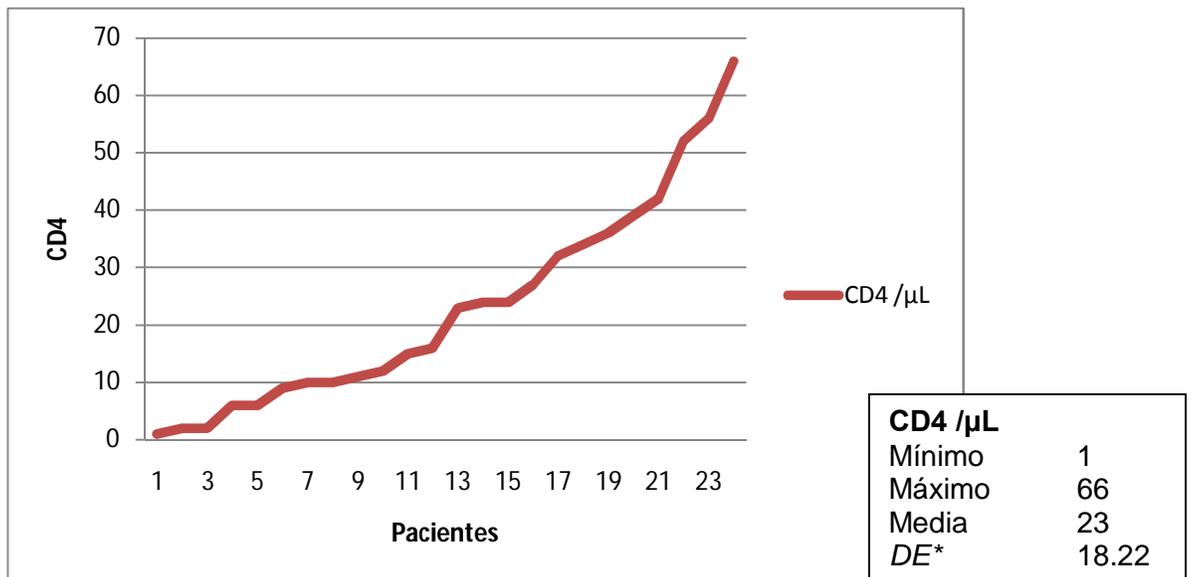


Figura No 4. CD4

*DE= Desviación estándar

El cuadro clínico identificado en la población se describe en la figura 5, donde la fiebre se presentó en todos los casos 100% (24), la tos en 87.5% (21), la

diaforesis en el 83.3% (20), la diarrea en el 45.8% (11), la disfgia en el 25% (6), la viceromegalia 25% (6), la linfadenopatía 20.8% (5) y la hemoptisis 16.6% (4). Se tendrá en cuenta que la presencia de la disfgia se asocia a la presencia de moniliasis.

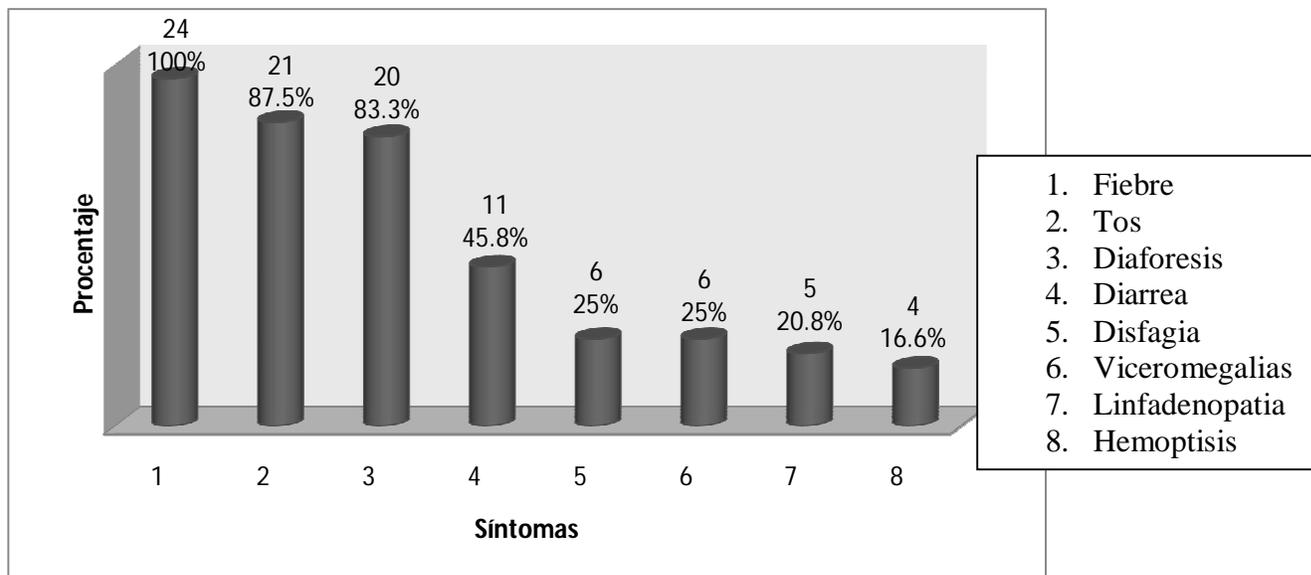


Figura No 5. Cuadro clínico

Se encontró que los pacientes con diagnóstico reciente de VIH son el 37.5% (9) figura 6. Este grupo es enviado de un segundo nivel de atención para protocolo ya que inicialmente no contaban con insumos para su manejo o no se contaba con la experiencia para manejo de estos pacientes en sus unidades, el resto del grupo ya se conocía como portador del virus.

En la figura 7 se muestra el tiempo a partir del diagnóstico de VIH, y al momento en que acuden a los servicios de salud para su atención médica. El promedio es de 4 años 5 meses de los 15 pacientes con tratamiento ya establecido, excluyendo a los de reciente diagnóstico. Se tomo en cuenta que los pacientes se conocían sero positivos y bajo algún esquema de tratamiento; por algún motivo estaban en falla inmunológica y virológica por falta de apego o abandono de este.

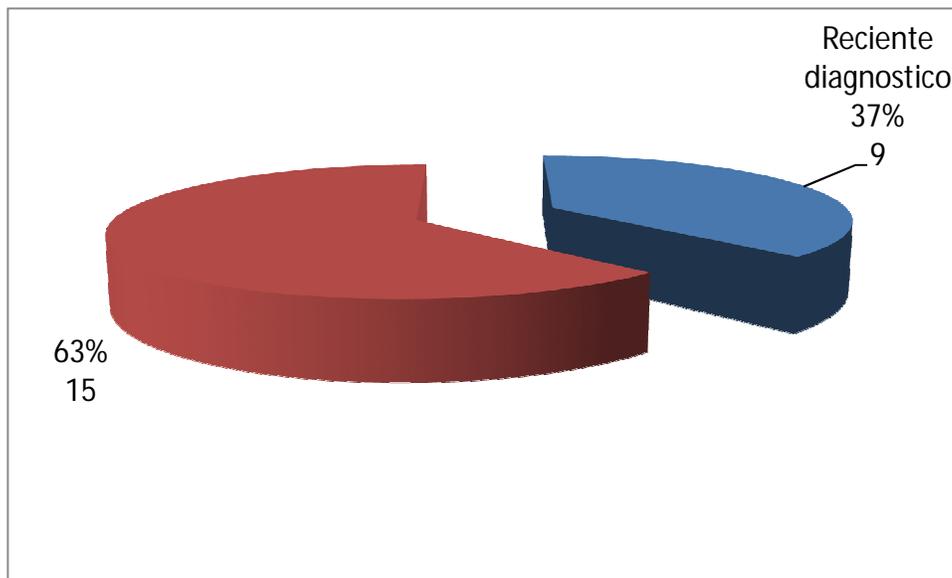


Figura No 6. Reciente diagnóstico

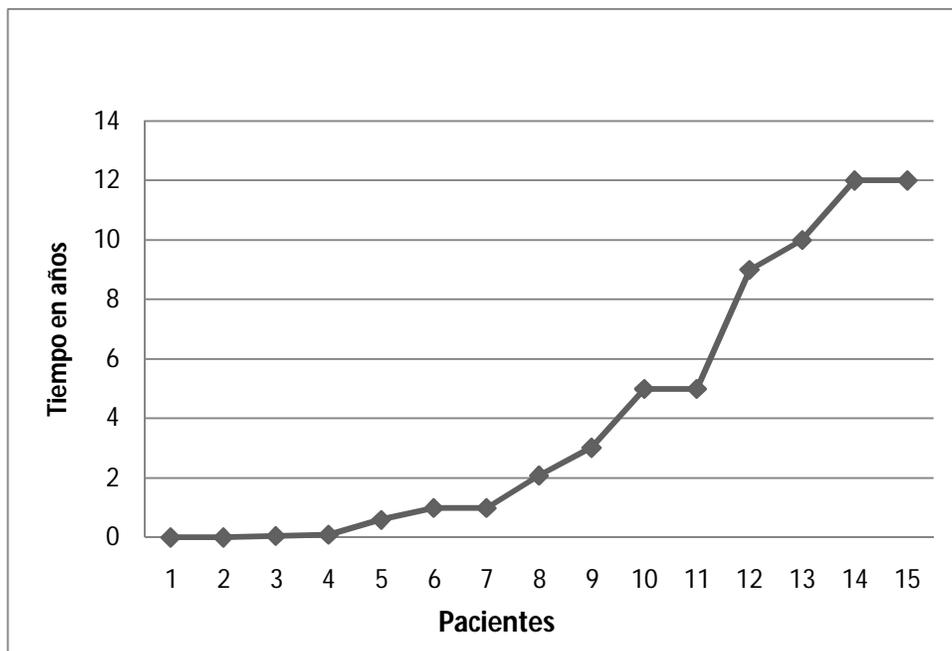


Figura No 7. Tiempo transcurrido a partir del diagnóstico

En la tabla 1 se establece la media de acuerdo a cada uno de los parámetros determinados en la biometría hemática, así como la determinación de proteínas y DHL (deshidrogenasa láctica), por el tamaño de la población no se

puede establecer pruebas estadísticas mas robustas, sin embargo prevaleció la elevación de la DHL y la anemia

Tabla 1. Distribución de la Biometría y bioquímica

N = 24	Mínimo	Máximo	Media
Hemoglobina	7.8	17.1	11.496
Leucocitos	1680	23400	5810.42
Neutrofilos	750	8290	3588.08
Linfocitos	278	1720	704.17
Eosinofilos	0	299	37.71
Basofilos	0	78	24.96
Plaquetas	15	667	223.04
Proteínas totales	3.3	9.4	6.129
Albumina	2.2	4.4	3.162
DHL*	139	969	394.38

*DHL=Deshidrogenasa láctica

En nuestra población con sospecha de micobacteriosis diseminada con inmunodeficiencia, identificamos tres casos con *Micobacterium avium*, el aislamiento se realizó mediante la PCR. Muestras obtenidas de sangre periférica donde se obtuvo el suero para iniciar la extracción, y de igual manera, en los tres casos se realizó la identificación de *M avium* por medio del aspirado de medula ósea, dando como resultado sólo en dos casos positivos de este. En los tres casos se confirmó mediante cultivo de Lowenstein-Jensen. La determinación de la sub población de linfocitos en cada uno de los casos fue de 10/11/15 CD4 / μ L (Tabla 2).

Cuatro pacientes fallecieron durante su estudio y hospitalización por complicaciones propias de las enfermedades agregadas y su estado constitucional, desafortunadamente uno de ellos falleció en los primeros días sin poder lograr aislamiento alguno por complicaciones respiratorias. De estos casos se les realizó la identificación por medio de la PCR en sangre periférica y aspirado de medula ósea para MAC siendo negativo para los cuatro casos (Figura 9).

Tabla 2. General de datos por paciente.

Pacientes	Edad	CD4/ μ L	IMC*	MAC*	Defunción
1	27	23	20		
2	26	24	19		
3	47	39	18		
4	35	2	17		
5	42	16	15		
6	25	2	19		†
7	40	24	22		
8	64	34	15		
9	42	66	23		†
10	31	1	13		
11	27	36	18		
12	45	56	23		†
13	38	9	24		
14	46	11	20	MAC	
15	34	10	23	MAC	
16	25	15	14	MAC	
17	33	6	20		
18	36	6	19		†
19	32	12	23		
20	34	32	23		
21	31	10	18		
22	28	42	17		
23	32	52	18		
24	31	27	16		

* MAC=*Mycobacterium avium complex*; IMC=Índice de masa corporal

En la tabla 3 se muestra el aislamiento etiológico por paciente, así como el diagnóstico final del protocolo de estudio. Tendremos en cuenta que a su ingreso al estudio se cumplió el criterio de sospecha de micobacteriosis, ya que no contaban con antecedentes de tuberculosis pulmonar o cuadro clínico, al final del protocolo de estudio se identificaron por medio de cultivo de Lowenstein-Jensen a 6 pacientes portadores de *Mycobacterium tuberculosis* de los cuales 5 por medio de espécimen pulmonar y uno de sangre periférica con manifestación sistémica (micobacteriosis sistémica).

Tabla 3. Diagnostico final por paciente y aislamiento

Paciente	Aislamiento	Diagnostico clínico
1	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberculosis pulmonar
2	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Micobacteriosis diseminada
3	Sin aislamiento	Linfoma
4	<i>Toxoplasma gondii</i>	Toxoplasmosis cerebral
5	<i>Pneumocystis jiroveci</i>	Pneumocistosis
6†	<i>Pneumocystis jiroveci</i>	Pneumocistosis / finado
7	Sin aislamiento	Linfoma
8	<i>Pneumocystis jiroveci</i>	Pneumocistosis
9†	Sin aislamiento	Finado
10	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> / <i>Cryptosporidium</i>	Tuberculosis pulmonar / Leucemia mieloblastica crónica
11	<i>Cryptococcus sp</i>	Neuroinfección
12†	Sin aislamiento	Neuroinfeccion / finado
13	<i>Staphylococcus aureus</i>	Meningo encefalitis
14	<i>Pneumocystis jiroveci</i> / <u><i>Mycobacterium avium</i></u>	Pneumocistosis / Micobacteriosis
15	<i>Pneumocystis jiroveci</i> / <u><i>Mycobacterium avium</i></u>	Pneumocistosis / Micobacteriosis
16	<i>Nocardia asteroides</i> / <u><i>Mycobacterium avium</i></u>	Nocardiosis pulmonar / Micobacteriosis
17	<i>Pneumocystis jiroveci</i>	Pneumocistosis
18†	<i>Cytomegalovirus</i>	CMV diseminado / finado
19	<i>Pneumocystis jiroveci</i>	Pneumocistosis
20	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberculosis pulmonar
21	<i>Histoplasma capsulatum</i>	Histoplasmosis diseminada
22	<i>Treponema pallidum</i>	Neurosifilis
23	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberculosis pulmonar
24	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberculosis pulmonar

En la figura 8 se muestra los diagnósticos de acuerdo a los aislamientos por paciente, tomando en consideración que se aisló uno o dos agentes como entidades etiológicas por paciente.

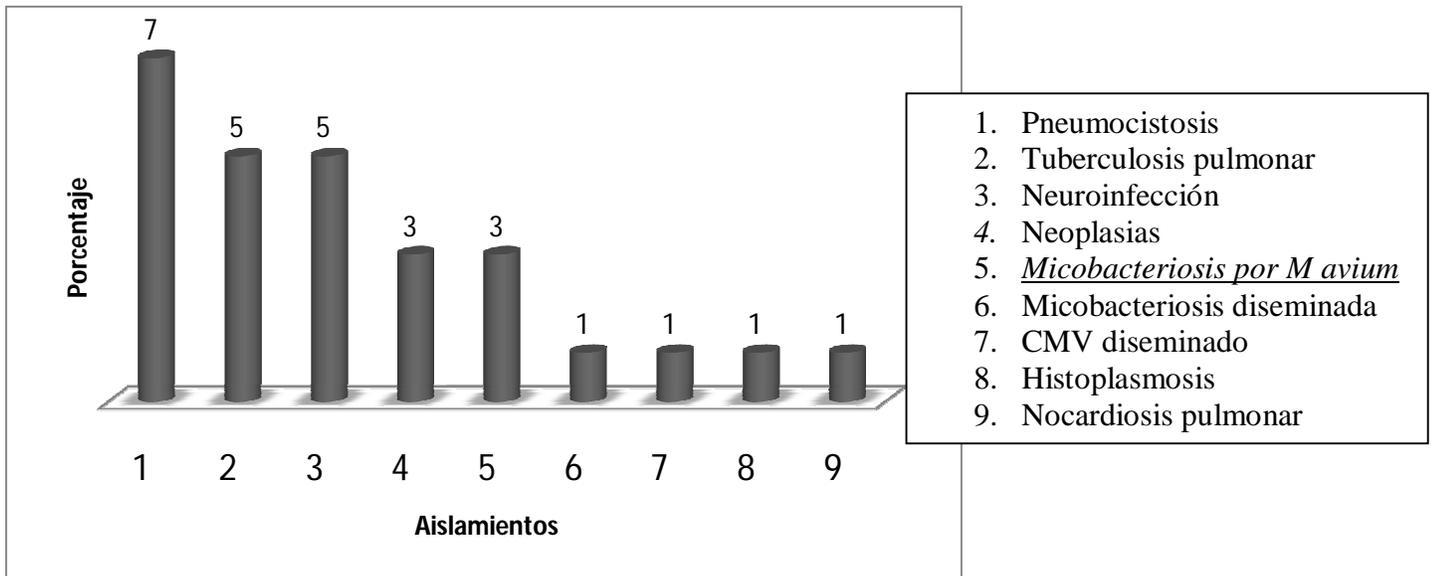


Figura No 8. Diagnostico etiológico

En 7 pacientes se identificó *Pneumocystis jiroveci* como el principal agente que afectó a este grupo de pacientes, seguido por *Mycobacterium tuberculosis* identificado en espécimen de origen pulmonar (5) y las neuroinfecciones (5), este último grupo incluyendo *Treponema pallidum*, *Staphylococcus aureus*, *Cryptococcosis sp.* y *Toxoplasma gondii* (neurosifilis, meningoencefalitis, meningitis y toxoplasmosis cerebral). El tercer grupo está constituido por tres pacientes cada uno, conformando el de micobacteriosis por *Mycobacterium avium* y las neoplasias (linfomas y leucemia mieloblastica crónica). El último grupo conformado por solo un aislamiento por paciente que lo conformo *Mycobacterium tuberculosis* (micobacteriosis diseminada), *Citomegalovirus* (CMV diseminado), *Histoplasma capsulatum* (Histoplasmosis pulmonar) y *Nocardia asteroides* (Nocardiosis pulmonar).

En la figura 9 se muestra las 4 defunciones que se presentaron en el grupo, de los cuales sólo en dos no se obtuvo aislamiento, uno de ellos falleció en las primeras 48hrs de su ingreso por complicaciones respiratorias y el segundo por una neuroinfección. Se tendrá en cuenta que a los 4 se les realizó la determinación de la PCR para *M. avium*, siendo negativo en sangre periférica y aspirado de medula ósea. De los 2 pacientes restantes uno falleció por complicaciones respiratorias de Pneumocistosis y otro por CMV diseminado.

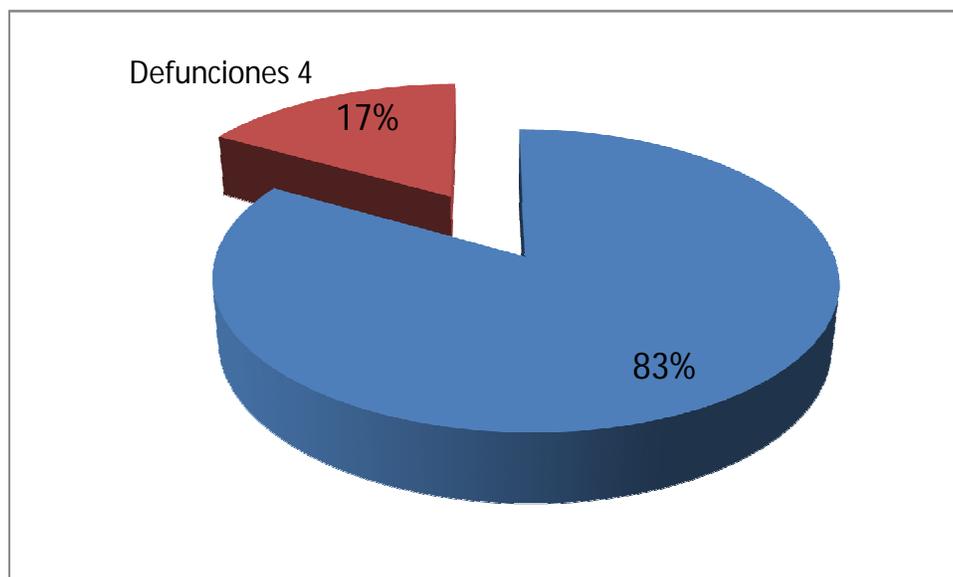


Figura No 9. Defunciones

En la tabla 4 se hace una alusión a los pacientes con aislamiento realizados con *M avium* y *M tuberculosis*. Los aislamientos de *M tuberculosis* fueron en total 6, de los cuales 5 en espécimen de pulmón y uno en sangre periférica. En 3 pacientes fueron los aislamientos de *M avium* de sangre periférica y en dos en aspirado de medula ósea. Hacemos la observación que en los tres pacientes se les tomó muestras en sangre periférica y aspirado de medula ósea, sin embargo en el paciente número 16 dio negativa la PCR en AMO.

Tabla 4. Comparativo de los aislamiento de micobacterias y sus CD4/ μ L

Pacientes	Edad	CD4/ μ L	IMC*	<i>M avium</i>	<i>M tuberculosis</i>	Aislamiento Obtenido en
1	27	23	20		<i>M tuberculosis</i>	Espécimen pulmonar
2	26	24	19		<i>M tuberculosis</i>	Espécimen pulmonar
10	31	1	13		<i>M tuberculosis</i>	Sangre
14	46	11	20	<i>M avium</i>		Sangre / AMO
15	34	10	23	<i>M avium</i>		Sangre / AMO
16	25	15	14	<i>M avium</i>		Sangre / AMO (-)
20	34	32	23		<i>M tuberculosis</i>	Espécimen pulmonar
23	32	52	18		<i>M tuberculosis</i>	Espécimen pulmonar
24	31	27	16		<i>M tuberculosis</i>	Espécimen pulmonar

*IMC= Índice de masa corporal, AMO= Aspirado de médula ósea.

En la tabla 5 se describe las características propias de los pacientes con aislamiento de *M avium*, donde la determinación de la media de sub población de linfocitos CD4/ μ L es de 12 con una desviación estándar de 2.64. Se observa que no sólo se realizó un aislamiento, sino que se identificó *Pneumocystis jiroveci* en dos pacientes y *Nocardia asteroides* en uno.

Tabla 5. Descripción de los casos con *M avium*

Paciente	Aislamiento	CD4/ μ L	PCR		Aislamiento agregado
			Suero	AMO*	
14	<i>M avium</i> (S*/AMO)	11	+	+	<i>Pneumocystis jiroveci</i>
15	<i>M avium</i> (S*/AMO)	10	+	+	<i>Pneumocystis jiroveci</i>
16	<i>M avium</i> (S*)/AMO-	15	+	-	<i>Nocardia asteroides</i>

*S=sangre periférica, AMO= Aspirado de médula ósea.

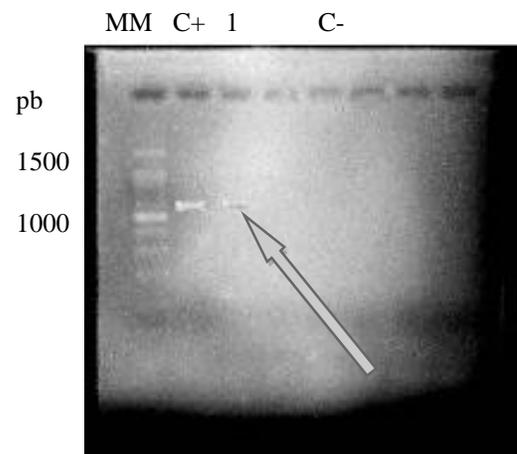
Paciente	CD4/ μ L	Media	DE*
14	11		
15	10		
16	15		
		12	
			2.64

*DE= Desviación estándar

LECTURA DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

<i>Micobacterium avium</i>	3 pacientes	12.5%
Otros aislamientos	19 pacientes	79.1%
Sin aislamiento	2 pacientes	8.3%

Gel de agarosa con las bandas 1300 pb



DISCUSIÓN

Mycobacterium avium y *Mycobacterium intracellulare* forman parte del Complejo *Mycobacterium avium-intracellulare*, causando formas diseminadas en 25 a 50% de los pacientes adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), que no habían recibido tratamiento antirretroviral (ARV)^{16,17}; y no solamente afectando a este grupo sino ante la presencia de la existencia de inmunosupresión¹⁵.

Las infecciones causadas por las MNT a diferencia de la tuberculosis, no son reportadas estrictamente a las autoridades de salud pública en los Estados Unidos y en otros países como México, por lo tanto, su prevalencia exacta en diferentes áreas geográficas es desconocida¹⁴.

En el presente trabajo, se estudiaron a 24 pacientes que ingresaron al hospital con sospecha de micobacteriosis diseminada en fase de SIDA, sin antecedentes de Tuberculosis pulmonar o clínica. Dentro del protocolo de estudio se realizó toda la batería de estudios pertinentes a identificar la etiología, por parte de nuestro trabajo se realizó la identificación de *M avium* a través de la PCR⁵⁶ en suero y aspirado de médula ósea (AMO) en todos los pacientes. Se incluyeron a todos aquellos que tenían una cuenta menor de la sub población de linfocitos de ≤ 70 CD4 / μ L^{10, 54}.

La identificación por medio de la PCR se realizó en 3 (12.5%) pacientes, tomando en consideración que a través de esta prueba, permite la identificación rápida y específica de las micobacterias, con un límite inferior de detección de 1 a 100 bacilos por mililitro de muestra^{27, 51}. Se identificó en los tres pacientes que la cuenta de CD4 / μ L no fue mayor de 15, situación es semejante a la reportada por los trabajos de Miguez-Burbano²⁷, Bartos et al³⁵ y Murcia et al⁵¹. Nos permite determinar como una prueba altamente sensible y rápida^{27, 52}. En los tres pacientes se confirmó mediante cultivo de Lowenstein-Jensen. Las muestras de estos tres pacientes fueron obtenidas por espécimen de sangre periférica y

aspirado de medula ósea. Los aislamientos de *M avium* fueron en los tres pacientes de sangre periférica y en dos en aspirado de medula ósea. Hacemos la observación que en el paciente número 16 dio negativa la PCR en AMO.

Actualmente nuestra unidad cuenta con técnicas de hibridación de sondas de ácidos nucleicos, para la identificación de *M avium* y *M intracellulare*, sin embargo se tendrá que esperar al crecimiento de la cepa, por lo que en cambio por medio de la PCR tenemos la ventaja de rapidez en la identificación, apoyando el trabajo del grupo de la Dra. García y colaboradores⁵⁴.

Se identificó 6 (25%) pacientes portadores de *M tuberculosis* en cultivo y por técnicas de hibridación de sondas de ácidos nucleicos, 5 de los cuales por medio de espécimen pulmonar y uno de sangre periférica, comparando con la identificación de *M avium* 3 (12.5%) por medio de la PCR, se concluye que la PCR tiene la ventaja en la rapidez de la detección de las muestras clínicas y aunque es pequeña la muestra no hay positivos falsos en aislamiento en suero ante la sospecha de micobacteriosis diseminada. Lo descrito por Bhambri et al⁵⁰ al recuperar la micobacteria en 94% de los casos en sangre periférica.

La distribución de acuerdo a género fue de 19 hombres (79.2%) y 5 mujeres (20.8%). En los datos descriptivos de los pacientes se encontró que la edad menor fue de 25 años y la máxima de 64 años con una media de 35 años. El promedio del IMC del grupo fue de 18.9 ± 3 , con una mínima de 13 y máxima de 24, sólo 7 (29%) se consideró con bajo peso.

La cuenta de la sub población de linfocitos a su ingreso al hospital es de 23 como media, con una cuenta mínima de 1 y máxima de 66 CD4 / μ L, su desviación estándar de 18.22. Lo que no difiere en lo descrito en la literatura.^{27,35,50,51,54} Tendremos en cuenta que en los 3 casos que se identificó *M avium* la cuenta de CD4 / μ L fue de 10/11/15 (DE 2.64), mientras que en la identificación de *M tuberculosis* la cuenta de CD4 / μ L fue de 23/24/1/32/52/27 (DE16.42).

En el grupo de trabajo de la Dra. García⁵⁴ identificaron un promedio de CD4/ μ L de 15.9 (DE14.2) en pacientes con *M avium*, lo que no diere con lo identificado en nuestro trabajo

El cuadro clínico identificado en la población es inespecífico no bien definido, por lo que se someten a protocolo de estudio. Estos signos y síntomas clínicos asociados con la infección diseminada, se presentaron en todos los casos, la fiebre 24 (100%), la tos en 21 (87.5%), la diaforesis en 20 (83.3%), la diarrea en 11 (45.8%), la disfagia en 6 (25), la viceromegalia 6 (25%), la linfadenopatía 5 (20.8%) y la hemoptisis 4 (16.6%). Los hallazgos son semejantes a lo reportado en la literatura.^{39, 40}

Se identificó que los pacientes con diagnóstico reciente de VIH fue el 37.5% (9), de este grupo enviado de un segundo nivel de atención para protocolo ya que inicialmente no contaban con insumos para su manejo o no se contaba con la experiencia para manejo de estos pacientes, el resto del grupo ya se conocía como portador del virus, de los ya conocidos con diagnóstico de VIH se encontraban bajo algún tipo de tratamiento anti retro viral, el promedio de este 4 años 5 meses.

Cuatro pacientes fallecieron durante su hospitalización por complicaciones propias de las enfermedades agregadas y su estado constitucional, de estos en dos no se llegó a la identificación del agente etiológico, desafortunadamente uno de ellos falleció en los primeros días sin poder lograr aislamiento alguno, por complicaciones respiratorias y el otro por una neuroinfección. Se tomará en cuenta que a los pacientes se les realizó la PCR en suero y aspirado de medula ósea, siendo negativa para *M. avium*.

En 7 pacientes se identificó *Pneumocystis jiroveci* como el principal agente que afectó a este grupo de pacientes, seguido por 6 aislados de *Mycobacterium tuberculosis* y 5 por neuroinfección. El cuarto grupo estuvo constituido por tres pacientes cada uno, conformando por *Micobacterium avium* y las neoplasias.

Se contempló en los tres casos en que se identificó *M avium*, en dar aviso a los médicos tratantes, para que dieran oportunamente tratamiento dirigido para esta entidad, sólo en dos se otorgó manejo específico, para el mes de noviembre al cierre del estudio se encontraban en buenas condiciones de salud en los dos pacientes que se dio tratamiento dirigido, el otro se perdió desconocemos la causa.

Desafortunadamente durante la realización del estudio nos encontramos ante la contingencia de Influenza H1N1, por lo que disminuyó el ingreso de este tipo de pacientes al Hospital, lo que la población disminuyó y no nos permitió ver la realidad de nuestra unidad.

Es importante continuar con la búsqueda intencional sistemática de MAC en pacientes con SIDA para estar en la posibilidad de determinar fehacientemente su magnitud, de tal forma que el personal de salud esté alerta y desarrolle una conducta anticipada para el diagnóstico y la toma de decisiones apropiadas.

Deberá considerarse como rutina la implementación de PCR como prueba diagnóstica temprana para la identificación y diferenciar MAC en sospecha de micobacteriosis diseminada, lo que reflejaría una corta hospitalización abatiendo los costos y justificando estos para la prueba, traduciendo una curación temprana y oportuna.

CONCLUSIONES

1. Se identificó *M avium* en tres pacientes con sospecha de micobacteriosis diseminada de 24.
2. Se identificó *M avium* por medio de la PCR en 3 pacientes en sangre periférica y de estos 2 por aspirado de medula ósea.
3. De los tres casos identificados como *M avium*, cuentan con una sub población de linfocitos CD4/ μ L es de 10/11/15.
4. Demostró ser útil la identificación por medio de la PCR de *M avium*, para diferenciar de otras micobacteriosis, ya que no se cuenta con ningún otro tipo diagnóstico de forma precisa y rápida.
5. El género masculino predominó en el grupo de estudio 79% (19).
6. El cuadro clínico identificado en los pacientes al final del protocolo de estudio clínico, por frecuencia fue de Pneumocistosis, Tuberculosis y las neuroinfecciones.
7. El recuento de la media de la sub población de linfocitos es de 23 CD4 / μ L en toda la población.
8. La presencia de bajo peso por medio del IMC se encontró en el 29% (7) de la población.
9. Los síntomas clínicos privativos en nuestros pacientes fue la fiebre, tos y diaforesis.
10. Los pacientes de reciente diagnóstico de sero positividad para VIH, con sospecha de micobacteriosis diseminada, se encontró en el 37% (9).
11. De los pacientes ya conocidos sero positivos para VIH con tratamiento anti retro viral, presentaron manifestaciones de cuadro clínico de micobacteriosis diseminada con una media en el tiempo de 4 años 5 meses.
12. Se registraron 4 defunciones durante el estudio, de las cuales en dos no se logró la identificación de agente etiológico.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Dye C, Watt CJ, Bleed DM, et al. Evolution of tuberculosis control and prospects for reducing tuberculosis incidence, prevalence, and deaths globally. *JAMA* 2005. 293; 22: 2767–75.
- 2.- WHO. Global tuberculosis control-surveillance, planning, financing. Geneva (Switzerland): WHO; 2007.
- 3.- Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2007.175;4: 367–416.
- 4.-Schluger NW. Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Infections in Older Adults. *Clin Chest Med.* 2007; 28: 773–781
- 5.- Khan K, Wang J, Marras TK. Nontuberculous mycobacterial sensitization in the United States: national trends over three decades. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176: 306–13.
- 6.- Herdman AV, Steele JC. The new mycobacterial species-emerging or newly distinguished pathogens. *Clin Lab Med* 2004; 24: 651-690.
- 7.-Falkinham JO. Nontuberculous mycobacteria in the environment. *Clin Chest Med* 2002;23: 529-551.
- 8.-Fordham von Reyn C, Arbeit RD, Tosteson AN, et al. The international epidemiology of disseminated *Mycobacterium avium* complex infection in AIDS. International MAC Study Group. *AIDS* 1996. 10; 9: 1025–32.
- 9.-Von Reyn CF, Waddell RD, Eaton T, et al. Isolation of *Mycobacterium avium* complex from water in the United States, Finland, Zaire, and Kenya. *J Clin Microbiol* 1993.31; 12: 3227–30.
- 10.-Primm TP, Lucero CA, Falkinham JO 3rd. Health impacts of environmental mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 2004.17; 1: 98–106.
- 11.-Vaerewijck MJ, Huys G, Palomino JC, et al. Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health. *FEMS Microbiol Rev* 2005. 29; 5: 911–34.
- 12.-Martin-Casabona N, Bahrman AR, Bennedsen J *et al.* Non-tuberculous mycobacteria: patterns of isolation: a multi-country retrospective survey. *Int J Tuber Lung Dis* 2004; 8: 1186-1193.

13.-Tortoli E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of 1990s. Clin Microbiol Rev 2003; 16: 319-354.

14.-CDC. Reported tuberculosis in the United States, 2005. Atlanta (GA): Department of Health and Human Services; 2006.

15.- 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.

16.-Young LS, Inderlied CB, Berlin OG, Gottlieb MS. Mycobacterial infections in AIDS patients, with emphasis on the *Mycobacterium avium* complex. Rev Infect Dis. 1986; 8: 1024-33.

17.-Morales JJ. Infección por micobacterias no tuberculosas en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana. Bol Med Hosp Infant Mex 2007; 64: 192-197.

18.-Horsburgh CR Jr. Epidemiology of Mycobacterium avium complex. In: Korvick JA, Benson CA, eds. Mycobacterium avium Complex Infection: Progress in Research and Treatment. New York, NY: Marcel Dekker; 1996:1-22.

19.-Von Reyn CF, Waddell RD, Eaton T, et al. Isolation of Mycobacterium avium complex from water in the United States, Finland, Zaire, and Kenya. J Clin Microbiol. 1993;12: 3227-3230.

20.-Good RC. From the Center for Disease Control. Isolation of nontuberculous mycobacteria in the United States, 1979. J Infect Dis. 1980;142: 779-783.

21.-Tortoli E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. Clin Microbiol Rev. 2003;16:319-354.

22.- Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. Am J Respir Crit Care Med. 2007; 175:367-416

23.-Holland SM. Nontuberculous mycobacteria. Am J Med Sci 2001; 321: 49-55.

24. Holland SM. Immune deficiency presenting as mycobacterial infection. Clin Rev Immunol 2001;20:121-137.

25.-Marras T, Daley CI, Catanzaro A, Daley CL, Saunders WB, Luna. Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria. In: Disease Due to Nontuberculous Mycobacterial Infection. Clinics in Chest Medicine. 2003; 23: 553-568.

26.-Heifets L. Mycobacterial infections caused by nontuberculous mycobacteria. *Semin Respir Crit Care Med* 2004; 25: 283-295.

27.-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 .

28.-Reich j, Field Sk, Fisher D *et al.* Treatment outcome in *Mycobacterium avium* pulmonary disease: a correction and comment. *Chest* 2005;127: 1864-1866.

29.-Donnabella V, Salazas-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.

30.-Heifets LB, Jenkins PA, Gangadharam PR, Jenkins PA, eds. Speciation of mycobacteria in clinical laboratories. In: *Mycobacteria Basic Aspects*.1998; 1: 308-350.

31.-Thomsen VO, Andersen AB, Miorner H. Incidence and clinical significance of non-tuberculous mycobacteria isolated from clinical specimens during a 2-y nationwide survey. *Scand J. Infect Dis* 2002; 34: 27:180-189.

32.-Haverkort F. National atypical mycobacteria survey 2000. *Common Dis Intel* 2003;27: 180-189.

33.-Barker AF. Bronchiectasis. *N Engl J Med* 2002; 346: 1383-1393.

34.-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.

35.-Bartos M, Hlozek P, Svastova P *et al.* Identificacion of members of *Mycobacterium avium* species by Accu-Probes, serotyping and single IS900, IS901, IS1245 and IS901 Flanking región PCR with internal standars. *J Microbiol Methods* 2006; 64: 333-345.

36. Butler WR, Guthrtz LS. Mycolic acid analysis by high performance liquid chromatography for identification of *Mycobacterium* species. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14:704-726.

37.-Leite CQJ, da Silva Rocha A, de Andrade Leite SR *et al.* A comparison of mycolic acid analysis for nontuberculos mycobacteria identification by thin-layer chromatography and molecular methods. *Microbiol Inmunol* 2005; 49: 5721-5728.

38.-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.

39.- Gazzola L, Zanini F, Zerbi P, Franzetti F, Gori A. The usefulness of PCR assay in diagnosing disseminated mycobacterial infection in AIDS patients Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2008; 27: 163–166

40.-Stephen KF, Cowie RL. Lung Disease Due to the More Common Nontuberculous Mycobacteria CHEST 2006; 129: 1653-1672.

41.-Thomsen VO, Andersen AB, Miorner H. Incidence and clinical significance of non-tuberculous mycobacteria isolated from clinical specimens during a 2-y nationwide survey. Scand J Infect Dis 2002; 34: 648–653

42.-Butler WR, Crawford JT. NTM reported to the public health laboratory information system by state public health laboratories United States 1993–1996, July 1999. Available at: www.cdc.gov/ncidod/dastlr/mycobacteriology.htm. Accessed July 1, 2005

43.-Martin-Casabona N, Bahrmand AR, Bennedsen J, et al. Non-tuberculous mycobacteria: patterns of isolation: an multi-country retrospective survey. Int J Tuberc Lung Dis 2004; 8:1186–1193

44.- Lincoln EM, Gilbert LA. Disease in children due to mycobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis*. Am Rev Respir Dis 1972; 105: 683–714

45.-Horsburgh CR. Epidemiology of human disease caused by *Mycobacterium avium* complex. Can J Infect Dis 1994; 5: 5B–9B

46.-Hawkins CC, Gold WM, Whimbey E, et al. *Mycobacterium avium*-complex infections in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Ann Intern Med 1986; 105:184–188

47.-Nightingale SD, Byrd LT, Southern PM, et al. Incidence of *Mycobacterium avium intracellulare* in human immunodeficiency virus-positive patients. J Infect Dis 1992; 165:1082–1085

48.-Abrantes E, Mello De Capitani E, Coelho E, Costa A, Augusto O, Carvalho M. Mycobacterium tuberculosis and nontuberculous mycobacterial isolates among patients with recent HIV infection in Mozambique J Bras Pneumol. 2008;34(10):822-828

49.- Glassroth J. Pulmonary Disease Due to Nontuberculous Mycobacteria CHEST 2008; 133: 243–251

- 50.- Bhambri S, Bhambri A, Del Rosso J. Atypical Mycobacterial. *Cut Infect Derm Clin.* 2009; 29: 63–73
- 51.-Murcia MI, Gómez JE, Alvarado F, Bustillo JE, Alvarado F, Bustillo JE et al. Prevalencia de micobacterias en pacientes VIH/SIDA positivos en Bogotá D.C. *Rev Colomb Neumol* 2001; 13: 249-261.
- 52.- Park CM, Heo SR, Park KU, Song J, Lee JH, Lee CT. Isolation of nontuberculous mycobacteria using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Korean J Lab Med.* 2006; 26:161-7.
- 53.- Cuchacovich R. Clinical Applications of the Polymerase Chain Reaction: An Update *Infect Dis Clin N Am.* 2006; 20: 735-758.
- 54.-García G, Hernández C, Ángeles U, Degollado E. Detección y diferenciación del complejo *Mycobacterium avium-intracellulare* en cepas de pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida mediante reacción en cadena de polimerasa. Tesis de posgrado.2008.UNAM.IMSS
- 55.-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.
- 56.- 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.
- 57.-Mejía-Arangure JM, Fajardo-Gutiérrez A, Cuevas-Uriostegui MA, Hernández-Hernández DM, Garduño-Espinoza J. Navarrete-Navarro S, Velázquez –Pérez L, Martínez-García MC.. El tamaño de muestra: un enfoque practico en la investigación clínica pediátrica. *Bol Med Hosp Infan (Mex)* 1995;52:381-391.
- 58.-Rodriguez A, Palma S, Maestre J, *et al* Deteccion de micobacterias en muestras clínicas mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa. *Rev Biomed* 2000;11:257-262.
- 59.-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.
- 60.-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.
- 61.-Murcia MI, León CI, de la Hoz F, Saravia J. Asociacion micobacterias-VIH/SIDA en pacientes atendidos en un Hospital Universitario en Bogota, Colombia. *Rev Salud pública* 2007;9:86-96.

62.-Yazdanpanah Y, Chene G, Losina E, Goldie SJ, Dequae L, Alfandari S, Seage GR, Sullivan L, Marimoutou C, Paltiel AD, Salomon 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.

63.-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>

64.-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.

65.-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 – intracellulare* infection. *Chest* 2001;119: 1131-1137.

66.-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

HOJA DE CAPTURA DE DATOS

No de control _____/_____

SEXO _____

EDAD		
CD4		
IMC ²	Peso Talla
FIEBRE		
TOS		
DIAFORESIS		
DIARREA		
DISFAGIA		
LINFADENOPATIAS		
HEMOPTISIS		
VICEROMEGALIAS		
TUBERCULOSIS PREVIA		
TIEMPO DE DX DE VIH		
TX ARV INICIO ESQUEMA		
AISLAMIENTO ESPECIMEN (MUESTRA)		
CULTIVOS		

HB LEU NEU LIN EOS BAS PLT PT ALB DHL
--

CUADRO CLINICO	CULTIVOS
RX DE TORAX	ORGANO AFECTADOS
TAC	FACTORES DE RIESGO (RESIDENCIA, VIAJES, ETC.)

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN

Lugar y fecha México Distrito Federal mayo 2008

Por medio de la presente yo

Autorizo participar en el protocolo de investigación titulado: “Detección y diferenciación del complejo MAC en suero de pacientes con SIDA y micobacteriosis diseminada mediante PCR”.

Registrado ante el Comité Local de Investigación o la CNIC con el número:

El objetivo del estudio es Determinar la utilidad de la PCR para la detección del complejo Mycobacterium avium e intracellulare en pacientes con sospecha de enfermedad diseminada con síndrome de inmunodeficiencia adquirida, atendidos en el Hospital de Infectología C.M.N. La Raza.

Se me ha explicado que mi participación consistirá en En la toma de muestras sanguínea en antebrazo, así como aspirado de medula ósea en caso de requerirlo, siendo anónima la participación.

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio, que son los siguientes:

El presente estudio tiene como finalidad la realización de una toma de sanguínea como parte del protocolo de estudio en todo paciente con sospecha de micobacteriosis diseminada para identificación del agente causal, así como aspirado de medula ósea. Se me ha informado que las posibles molestias que pueden presentarse se relacionan a la punción de una vena en mi brazo sin mayor riesgo para mi salud y la inversión de 10 a 15 minutos para la realización del aspirado de medula ósea. Mi participación es totalmente voluntaria. La participación en este proyecto de investigación se espera obtener resultados que permitan proporcionar la identificación del agente causal de mi enfermedad, con el objetivo de iniciar tempranamente tratamiento dirigido así como instaurar políticas para la realización de esta prueba de rutina.

El Investigador Responsable se ha comprometido a darme información oportuna sobre cualquier procedimiento alternativo adecuado que pudiera ser ventajoso para mi tratamiento, así como a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación o con mi tratamiento.

Entiendo que conservo el derecho de negarme al estudio, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el Instituto.

El Investigador Responsable me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque esta pudiera hacerme cambiar de parecer respecto a mi permanencia de mi representado (a) en el mismo.

Nombre y firma del participante.

Nombre, firma y matrícula del Investigador Responsable.

DR CESAR GONZÁLEZ BONILLA

Números telefónicos a los cuales se puede comunicar en caso de emergencia y/o dudas y preguntas relacionadas con el estudio:
57245900 ext. 24318

Testigos

Testigos

ASPECTOS ETICOS

El estudio cumple con las normas nacionales e internacionales en materia de investigación biomédica en seres humanos. Este proyecto no modifica las normas institucionales establecidas en protocolos con humanos.

Se cumplió con las normas éticas establecidas por el IMSS, el reglamento de La Ley General de Salud en materia de investigación y con las estipulaciones establecidas en la Declaración de Helsinki de 1975, enmendada en Tokio Japón en 1989.

Es un proyecto sometido a revisión y a aprobación por parte de un Comité Científico y se expondrá de manera explícita en un protocolo de investigación.

Toda la realización de toma de muestras de especímenes están en base al protocolo de rutina realizado en todos los pacientes con sospecha de micobacteriosis diseminada.