



Identificación del complejo *Mycobacterium avium-intracellulare* por PCR en SIDA y micobacteriosis diseminada

Guadalupe García-Elorriaga,^a Edgar Degollado-Estrada,^b
Alfredo Villagómez-Ruiz,^b Nancy Cortés-Torres,^a Arreguín-Reséndiz L,^a
Guillermo del Rey-Pineda,^c César González-Bonilla^a

Identification of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex by PCR of AIDS and disseminated mycobacteriosis

Objective: The aim of this study is to differentially identify MAC by PCR in patients with AIDS and disseminated mycobacteriosis.

Methods: A cross sectional study was conducted in Mexico to identify MAC by Molecular Biology. Two sets of primers were synthesized: MAV and MIN, for *M. avium* and *M. intracellulare*, respectively. Whole-cell DNAs obtained from 29 clinical isolates and clinical serum specimens from other 24 patients with AIDS and disseminated mycobacterial infection were extracted and amplified by PCR with the MAV and MIN primers. The MAV and MIN primers each amplified one highly specific 1.3-kb segment of the homologous DNA, respectively.

Results: Twenty-nine DNAs from MAC clinical isolates identified by Gen-Probe AccuProbes were amplified with the MAV primers. Of the 24 clinical samples, 3 were positive for *M. avium* and 6 for *M. tuberculosis*.

Conclusions: Our results demonstrated that PCR technique could be applied for the differentiation of *M. avium* and *M. intracellulare* by specific 16S rRNA primers. In patients with advanced stage AIDS and in whom disseminated mycobacteriosis is suspected, the presence of anemia (even with negative cultures), elevated alkaline phosphatase and a median CD4 count of 15.9/mL, the diagnosis of infection by MAC should be strongly considered; we suggest that in accordance with our findings, a more precise stratification of patients in terms of their CD4 T cell counts is warranted.

Keywords Palabras clave

Polymerase chain reaction	Reacción en cadena de la polimerasa
Acquired immunodeficiency syndrome	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
Mycobacterium infections, nontuberculous	Infecciones por micobacterias no tuberculosas
<i>Mycobacterium avium</i> complex	Complejo <i>Mycobacterium avium</i>

La epidemiología de la infección por micobacterias no tuberculosis (NTM), a diferencia de la tuberculosis (TB) es, en general, difícil de describir y precisar por diversas razones, la primera y más importante es que no se reportan de manera oficial en Estados Unidos ni en otros países, como México;¹ la segunda es porque su identificación y aislamiento genera confusión. La falta de consenso sobre la definición de un síndrome clínico causado por NTM, ha dado pauta a una gran heterogeneidad de reportes y series de casos de esta condición. Los resultados han sido inciertos sobre la verdadera epidemiología de la enfermedad. Recientemente la American Thoracic Society (ATS) reportó que en las ciudades industrializadas, las NTM se encuentran presentes en un número de 1 a 1.8 por cada 100 000 habitantes, y en los laboratorios de microbiología su aislamiento se ha vuelto más frecuente que el de *M. tuberculosis*.²

El complejo MAC (*Mycobacterium avium-intracellulare*) es la NTM más comúnmente aislada a partir de esputo y muestras pulmonares.³ El MAC causa formas diseminadas en 25 a 50 % de los pacientes adultos infectados por VIH que no han recibido tratamiento antirretroviral (ARV).⁴ Es frecuente que los pacientes con recuento bajo de células T CD4 que inician ARV tengan una infección oportunista (IO). En Estados Unidos, las IO típicas que surgen en este contexto incluyen enfermedad diseminada por MAC, TB, retinitis por citomegalovirus, neumonía por *Pneumocystis* y sarcoma de Kaposi.⁵

Antes de la epidemia del SIDA, se habían notificado únicamente 78 casos de micobacteriosis diseminada en la literatura; El MAC ahora se ha convertido en una infección oportunista frecuente en estos pacientes. El cuadro clínico de la diseminación sistémica de MAC se definió hasta la llegada de SIDA.^{6,7} *M. avium* es el agente etiológico en más del 95 % de los pacientes con SIDA que adquieren enfermedad diseminada por MAC.⁸

El grupo de micobacterias conocido como MAC pertenece a las NTM o ambientales. El pH óptimo de desarrollo en el laboratorio oscila entre 5 y 5.5. Este

^aUnidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología, Hospital de Infectología

^bHospital de Infectología

^cBanco de Sangre

Centro Médico Nacional La Raza, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, México

Comunicación con: Guadalupe García-Elorriaga

Teléfono: (55) 5724 5900, extensión 24321

Correo electrónico: gelorriaga@webtelmex.net.mx

Recibido: 24/10/2014

Aceptado: 26/01/2015

Introducción: el objetivo de este artículo es Identificar y diferenciar el complejo MAC por PCR en pacientes con SIDA y micobacteriosis diseminada.

Métodos: se llevó a cabo un estudio transversal para identificar MAC por biología molecular. Se sintetizaron dos conjuntos de iniciadores: MAV y MIN, para *M. avium* y *M. intracellulare*, respectivamente. El ADN total de células obtenidas de 29 aislados clínicos y muestras de suero de otros 24 pacientes con SIDA e infección micobacteriana diseminada fue extraído y se amplificó por PCR con los iniciadores MAV y MIN. Cada uno de los iniciadores MAV y MIN amplificó un segmento altamente específico de 1.3 kb del ADN homólogo, respectivamente.

Resultados: veintinueve ADN de los aislados clínicos de MAC identificadas por Gen-Probe AccuProbes se

amplificaron con los iniciadores MAV (*M. avium*). De las 24 muestras clínicas, 3 fueron positivas para *M. avium* y 6 para *M. tuberculosis*.

Conclusiones: nuestros resultados demostraron que la técnica de PCR se puede aplicar para la diferenciación de *M. avium* y *M. intracellulare* por iniciadores específicos 16S rRNA. En pacientes con estadio avanzado de SIDA y en quienes se sospecha micobacteriosis diseminada, la presencia de anemia (incluso con cultivos negativos) fosfatasa alcalina elevada y una mediana de CD4 de 15.9/ml, se debe considerar seriamente el diagnóstico de infección por MAC; sugerimos que, de acuerdo con nuestros resultados, se justifica una estratificación más precisa de los pacientes en términos de sus recuentos de células T CD4.

Resumen

complejo incluye *M. avium* ssp. *avium*, *M. avium* ssp. *paratuberculosis*, *M. avium* ssp. *silvaticum* y *Mycobacterium intracellulare*.⁷

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 a 100 células/mL.⁷ La infección por MAC se manifiesta como una enfermedad diseminada en los pacientes con estadios avanzados de infección por HIV que presentan un recuento de linfocitos T CD4 inferior a 50 células/mL.⁹⁻¹¹ 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.¹²⁻¹³ Los hallazgos a la exploración física son 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 MAC.¹⁴

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 citocinas: factor de necrosis tumoral (TNF), interferón gamma (IFN γ) e interleucina 12 (IL-12). Durante la infección por MAC se encuentran elevados los niveles de IL-1alfa, IL-6, IL-10, TNF, receptor soluble tipo II del TNF (sTNFR-II) y el factor transformador de crecimiento beta (TGF-beta).¹⁴

En los pacientes con infecciones diseminadas por MAC es posible aislar la bacteria mediante cultivo de líquidos y tejidos. En sangre suele recuperarse la micobacteria hasta en el 94 % de los casos.¹¹ Comparada con el diagnóstico convencional, 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.¹⁵

El presente estudio describe un ensayo de PCR que implica el uso de dos pares de iniciadores que se alinean a diferentes fragmentos genómicos del MAC. El sistema nos ha permitido discriminar entre *M. avium* y *M. intracellulare*, proporcionando un diagnóstico exacto, ya que en nuestro país carecemos de la diferenciación de especies.

Métodos

Iniciamos el estudio con aprobación previa del Comité local de investigación del Hospital de Infectología de la Ciudad de México, así como el consentimiento informado por escrito de todos los pacientes.

Cepas bacterianas

Se recolectaron 29 cepas identificadas como MAC mediante hibridación con Gen-Probe AccuProbes, de pacientes hospitalizados con SIDA y sospecha clínica de micobacteriosis diseminada con una cuenta de linfocitos T CD4 igual o menor a 70 cel/mL. Los aislados clínicos de referencia se proporcionaron por el Laboratorio de Microbiología Clínica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (Ciudad de México, México).

Procesamiento de muestras clínicas

Se tomaron 24 muestras adicionales de otros pacientes, y se analizaron. Las muestras se digirieron y descontaminaron por el método de Petroff modificado y se concentraron por centrifugación a 3000 g por 15 minutos. Después de la neutralización, las muestras se dividieron para tinción de Zhihl-Nielsen y cultivo en medio selectivo (Lowenstein-Jensen y botellas

BACTEC 12B). A cada paciente se le tomó además muestra de sangre para la determinación de biometría hemática, química sanguínea, carga viral, linfocitos *T* CD4 y obtención de suero, así como aspirado de médula ósea para la extracción del ADN y amplificación por PCR.

Extracción de ADN

El ADN se aisló utilizando el reactivo de TRIzol con tiocianato de guanidina y fenol, usando 500 μ L de acuerdo con el procedimiento descrito por Chomczynski.¹⁶ El ADN se resuspendió en 50 μ L de agua destilada después de su precipitación con etanol al 75 %. Esta solución se calentó a 55 °C por 20 minutos, su absorbancia se determinó a 260/280 nm, y se tomaron 5 μ L para la amplificación de ADN por PCR. El ADN obtenido se almacenó a -20 °C para PCR.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se usaron secuencias publicadas de ADN que codifican para la región 16S rRNAs de *M. avium*, *M. intracellulare*. Estos dos iniciadores se evaluaron para su especificidad usando 14 cepas de referencia vía amplificación por PCR y electroforesis. Posteriormente los iniciadores se evaluaron con 10 cepas previamente identificadas de *M. avium* y *M. intracellulare*.¹⁷

El análisis del ADN por computadora mostró un alto grado de homología con las 14 cepas de referencia. Se identificaron *M. avium* y *M. Intracellulare*, con

respecto a otras especies entre el 93.7 al 99.7 %. El juego de iniciadores MAV, específicos para *M. avium* (sense, 5'-CCT CAA GAC GCA TGT CTT CT-3' [positions 141 to 160 bp]; antisense, 5'-ACA GCT CCC TCC CAA AAG GG-3' [positions 1,400 to 1,419 bp]), y los iniciadores MIN, específicos para *M. intracellulare* (sense, 5'-CCT TTA GGC GCA TGT CTT TA-3' [positions 130 to 149 bp]; antisense, 5'-GCA CAG CTC CCT CCC AAG GG-3' [positions 1,389 to 1,408 bp]) se designaron como correspondientes a las dos regiones de las secuencias del 16S rRNA que contienen el número mayor de bases no coincidentes. La posición del nucleótido 1 en la numeración antes mencionada se refiere a Escherichia coli 16S rRNA, en la posición 161.¹⁷⁻¹⁹

Todas las reacciones se llevaron a un volumen final de 50 μ L conteniendo 100 ng de ADN purificado de la cepa de referencia así como de cada muestra clínica, el buffer de reacción 1X, 2.5 U de Taq polimerasa, 0.2 mM de cada desoxinucleósido trifosfatado, y 20 pM de cada iniciador. La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Biometra). En cada corrida se incluyeron controles. Los ciclos incluyeron desnaturalización inicial a 94 °C por 1 minuto, alineamiento a 55 °C por 2 minutos y extensión a 72 °C por 6 minutos. Se agregó un periodo de extensión a 72 °C por 15 minutos después de 40 ciclos. Se incluyeron controles negativos sin ADN, así como controles positivos. Después de la amplificación, se analizó 1/10 de la mezcla de reacción de PCR por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % con 0.5 mg/mL de bromuro de etidio.

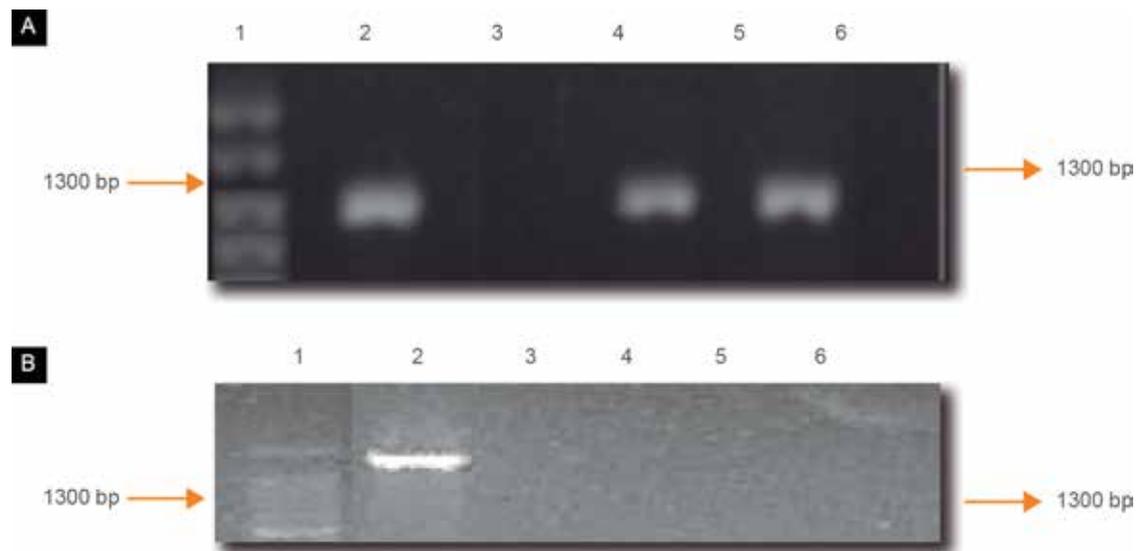


Figura 1 Electroforesis de PCR diferenciando *M. avium* de *M. intracellulare*. A) Amplificación con iniciadores MAV1/MAV2. Carril 1, marcador (Promega) de 100 bp; carril 2, ADN (control positivo) de *M. avium*; carril 3, ADN de *M. intracellulare*; carriles 4 y 5, ADN de cepas desconocidas; carril 6, agua (control negativo). B) Amplificación con iniciadores MIN1/MIN2. Carril 1, marcador (Promega) de 100 bp marker; carril 2, ADN de *M. intracellulare* (control positivo); carril 3, ADN de *M. avium*; carriles 4 y 5, ADN de cepa desconocida; carril 6, agua (control negativo)

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) así como de dispersión (desviación estándar). Asimismo, se utilizó *t* de Student para muestras no pareadas.

Resultados

De las 29 cepas de MAC aisladas de pacientes e identificadas por Gen-Probe AccuProbes, el 100 % correspondió a *M. avium* confirmado por PCR. Después de la estandarización del ensayo de PCR con las cepas de *M. avium* y de *M. intracellulare*, quisimos evaluar su utilidad en la identificación directa de muestras clínicas de suero y aspirado de médula ósea. El diagnóstico se hizo por técnicas microbiológicas convencionales.

De las 24 muestras de suero pertenecientes a otros pacientes, en 3 de ellos se detectó la presencia de *M. avium* por PCR durante las primeras 72 horas, sin necesidad de esperar hasta su desarrollo en los medios de cultivo de la muestra de sangre, la cual se confirmó después de varias semanas de incubación. Únicamente en dos muestras de aspirado de médula ósea resultó la PCR positiva para *M. Avium*, así como su posterior desarrollo en medio de cultivo. De los iniciadores MAV y MIN, cada uno amplificó un segmento altamente específico de 1300 bp del ADN homólogo, respectivamente (figura 1).

De los 32 pacientes estudiados con *M. avium*, la mayoría se ubicó en el grupo etario de 40-49 años con 11 pacientes (34 %). El peso promedio fue de 56.9 kg \pm 12.1, la talla promedio fue 1.70 m \pm 0.10. La ocupación mayormente referida fue empleado, por 9 pacientes (28 %). La pérdida de peso se presentó en 30 pacientes (94.4 %), la fatiga y el malestar general en 28 (87.5 %) en ambos casos. Una patología agregada común fue neumonía/neumonitis en 12 pacientes (37.5 %). El valor promedio de leucocitos fue de 3801.7/mm³ \pm 2409.9. La forma de presentación más frecuente fue la diseminada en 23 pacientes (71.8 %), y los órganos más afectados por *M. avium* en orden de frecuencia fueron: pulmón con 23 pacientes (71.8 %), hígado y médula ósea con 18 pacientes (56.2 %) en ambos casos. El hemocultivo fue el tipo de muestra con el mayor porcentaje de aislamientos positivos con 18 casos (56.2 %), seguido del mielocultivo con 12 (38.9 %). En la tele de tórax en 25 pacientes (78 %) se observaron alteraciones, predominando el infiltrado diseminado micronodular/macronodular. En el cuadro I se presentan las características de los pacientes del estudio.

Cuadro I Características de los pacientes con SIDA y micobacteriosis diseminada

Variables	Pacientes (n = 32)
Hombre/mujer	30 (94 %)/2 (6 %)
Edad	39.6 \pm 10.6*
Índice de masa corporal	19.68 (15.92-26.26 Kg/m ²)
HAART	27 (84.3 %)
Estadio C3	31 (96 %)
Fiebre	32 (100 %)
Candidiasis oroesofágica	30 (94 %)
Carga viral	470 415.7 copias/mL \pm 235 853*

* Media \pm SD

La mayoría de los pacientes con MAC, presentó cifras de hemoglobina bajas y de fosfatasa alcalina altas, asimismo presentaron un valor medio de T CD4 de 15.9/mL, resultando significativo al comparar con las células de pacientes con TB, (cuadro II). De los 32 pacientes, 5 fallecieron (15.6 %).

De las 24 muestras clínicas estudiadas, en 7 pacientes se identificó *Pneumocystis jiroveci* como el principal agente que afectó a este grupo de pacientes, seguido por *M. tuberculosis* identificado en 6 pacientes, neuroinfecciones en 5 pacientes, incluyendo: *Treponema pallidum*, *Staphylococcus aureus*, *Cryptococcus sp.* y *Toxoplasma gondii*. El cuarto grupo estuvo constituido por 3 pacientes con micobacteriosis por *M. avium*.

Discusión

En el presente trabajo se estudiaron 29 pacientes con cepas de MAC identificadas previamente mediante

Cuadro II Datos de los principales indicadores diagnósticos

Indicador	Pacientes con <i>M. avium</i> (n = 32)	p**
Hemoglobina	9.9 mg/dL \pm 2.2*	< 0.01
Fosfatasa alcalina	234.8 U/L \pm 119.7*	
CD4	15.9/mL \pm 14.2*	
Pacientes con <i>M. tuberculosis</i> (n = 6)		
CD4	26.5/ μ L \pm 16.4*	< 0.01

* Media \pm SD

**Valor de *p* a través de *t* de student para muestras no pareadas, comparando las medias de los valores de CD4

Valores de referencia de hemoglobina: 14-18 g/dL

Valores de referencia de fosfatasa alcalina: 40-150 U/L

hibridación con sondas de ADN, con diagnóstico de SIDA y micobacteriosis diseminada, y en el 100 % de los pacientes se identificó mediante PCR

M. avium. Con relación al género y al grupo etario, los resultados concuerdan con lo reportado en la literatura.²⁰

En cuanto al recuento de T CD4, estas se ubicaron muy por debajo de las 100 células/ μ L, factor de riesgo para la adquisición de MAC.^{9,10,21,22} En general, las determinaciones del laboratorio también coinciden con los reportes publicados.²³ Los hallazgos radiológicos son semejantes a los descritos.²¹

Al considerar la infección por MAC en pacientes con SIDA y tener acceso a pruebas de laboratorio como la PCR, sin duda nos permitió confirmar la sospecha diagnóstica en una proporción de pacientes superior a lo referido por otros autores.²⁴ En todos los pacientes estudiados se documentó la existencia del complejo MAC, estableciendo un diagnóstico temprano en una tercera parte de ellos, hecho que contradice lo referido en publicaciones previas.²⁵

Con respecto a las 24 muestras clínicas, en 3 pacientes se detectó *M. avium* por PCR y se confirmó por cultivo. Tanto la PCR como el cultivo fueron positivos en las 3 muestras de suero y sangre respectivamente, y solo en 2 de aspirado de médula ósea, es necesario estudiar un mayor número de pacientes, pero su detección pareciera ser más factible a partir del suero, lo cual representa la ventaja de no ser una toma de muestra invasiva, como se demostró en nuestros resultados de estandarización de la PCR en suero. Coincidiendo con lo reportado en la literatura, en las muestras clínicas de pacientes con SIDA y micobacteriosis diseminada, la micobacteria más común fue *M. tuberculosis* y en segundo término *M. avium*.²⁶

La mayoría de los pacientes presentó aumento en los niveles de la fosfatasa alcalina, así como anemia, en esto coincidimos con la mayor parte de los reportes,²⁷⁻³⁰ pero divergimos de otro.³¹

Por lo tanto, en pacientes con SIDA en estadio avanzado y en quienes se sospechaba la presencia de micobacteriosis diseminada, la aparición de anemia

(aún en cultivos negativos),³² elevó los valores de fosfatasa alcalina y la cuenta de CD4 con una media de 15.9/mL, por lo tanto, debemos sospechar fuertemente de una infección causada por MAC. Proponemos que, de acuerdo con nuestros hallazgos, se haga una estratificación de pacientes más precisa en cuanto a cuentas de T CD4, ya que con un valor de corte por debajo de los 50/mL, como proponen varios autores,⁷⁻⁹ podríamos tener tanto pacientes con MAC como con TB. Es necesario continuar este estudio con una muestra mayor, considerando tanto a pacientes con infección por MAC, como por TB y comparar en ambos las cifras de hemoglobina, fosfatasa alcalina y cuentas de T CD4, los cuales pueden servir como indicadores y/o pronóstico, sobre todo en países en desarrollo o sitios en los que no se cuente con técnicas de biología molecular, lo que permita aplicar el tratamiento de forma oportuna y apropiada; el tratamiento difiere en ambos casos, ya que para MAC se ha sugerido un régimen combinado de fármacos incluyendo claritromicina.^{33,34}

Actualmente, nuestra unidad cuenta con técnicas de hibridación de sondas de ácidos nucleicos, para la identificación de *M. avium* y *M. intracellulare*, sin embargo es necesario esperar al crecimiento de la cepa, mientras que con la técnica PCR directa en la muestra clínica tenemos la ventaja de la rapidez en la identificación. Las enfermedades causadas por *M. avium* y *M. intracellulare*, son indistinguibles clínicamente, por lo que el tratamiento es el mismo; por lo tanto la importancia de la diferenciación entre especies es principalmente epidemiológica.

En conclusión, nuestros resultados demostraron que la técnica de PCR puede aplicarse para la diferenciación de *M. avium* and *M. intracellulare* por iniciadores específicos 16S rRNA.

Declaración de conflicto de interés: los autores han completado y enviado la forma traducida al español de la declaración de conflictos potenciales de interés del Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas, y no fue reportado alguno que tuviera relación con este artículo.

Referencias

1. CDC. Reported tuberculosis in the United States, 2005. Atlanta (GA): Department of Health and Human Services; 2006.
2. 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.
3. Management of opportunistic mycobacterial infections: Joint Tuberculosis Committee guidelines 1999. *Thorax* 2000; 55: 210-218.
4. 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.
5. Masur H, Brooks JT, Benson CA, Holmes KK, Pau AK, Kaplan JE. Prevention and treatment of opportunistic Infections in HIV-infected adults and adolescents: Updated Guidelines From the Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health, and HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. *CID* 2014; 58: 1308-1311.

6. Schluger NW. Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Infections in Older Adults. *Clin Chest Med*. 2007; 28: 773–781.
7. Primm TP, Lucero CA, Falkinham JO 3rd. Health impacts of environmental mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17: 98–106.
8. Panel on opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents. Guidelines for the prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents: recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. Available at http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/adult_oi.pdf. Accessed (12/17/2014). [Page numbers 87-96].
9. 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.
10. 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 IS901 flanking region PCR with internal standards. *J Microbiol Methods* 2006; 64: 333-345.
11. Bhambri S, Bhambri A, Del Rosso JQ. Atypical mycobacterial cutaneous infections. *Dermatol Clin*. 2009; 29: 63–73.
12. Stephen KF, Cowie RL. Lung Disease Due to the More Common Nontuberculous Mycobacteria. *CHEST* 2006; 129: 1653-1672.
13. Gazzola L, Zanini F, Zerbi P et al. The usefulness of PCR assay in diagnosing disseminated mycobacterial infection in AIDS patients *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2008; 27: 163–166.
14. Glassroth J. Pulmonary Disease Due to Nontuberculous Mycobacteria *Chest* 2008; 133: 243–251.
15. Park CM, Heo SR, Park KU et al. Isolation of nontuberculous mycobacteria using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Korean J Lab Med*. 2006; 26:161-7.
16. Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 1993; 15(3): 532-7.
17. 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.
18. Boddingtonhaus B, Rogall T, Flohr T et al. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *J Clin Microbiol* 1990; 28:1751–1759.
19. Rogall T, Wolters J, Flohr T et al. Towards a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus *Mycobacterium*. *Int J Syst Bacteriol* 1990; 40:323–330.
20. Yazdanpanah Y, Chene G, Losina E et al. Incidence of primary opportunistic infections in two human immunodeficiency virus-infected French clinical cohorts. *Int J Epidemiol* 2001; 30:864-871.
21. Jacobson MA, Aberg JA. *Mycobacterium avium* complex and atypical mycobacterial infections in the setting of HIV infection. 2006. <http://hivinsite.ucsf.edu/InSite?page=kb-05-01-05>
22. Murcia MI, Gómez JE, Alvarado F et al. Prevalencia de micobacterias en pacientes VIH/SIDA positivos en Bogotá D.C. *Rev Colomb Neumol* 2001; 13:249-261.
23. Gadelha A, Accacio N, Grinztejn B et al. 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.
24. Ashitani J, Mukae H, Hiratsuka T et al. Plasma and BAL fluid concentrations of antimicrobial peptides in patients with *Mycobacterium avium* – intracellulare infection. *Chest* 2001; 119:1131-1137.
25. 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.
26. Khosravi AD, Alavi SM, Hashemzade M et al. The relative frequency of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* infections in HIV positive patients, Ahvaz, Iran. *Asian Pac J Trop Med* 2012; 5:71-74
27. Kravcik S, Toye BW, Fyke K et al. Impact of *Mycobacterium avium* complex prophylaxis on the incidence of mycobacterial infections and transfusion-requiring anemia in an HIV-positive population. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1996; 13(1):27-32.
28. Góngora-Biachi RA, Castro-Sansores CJ, González-Martínez P et al. Infección por *Mycobacterium avium* en pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida en la Península de Yucatán. *Rev Biomed* 1997; 8:139-147.
29. Hsieh S, Hung CH, Chen M et al. Clinical features and outcome in disseminated mycobacterial diseases in AIDS patients in Taiwan. *AIDS* 1998; 12: 1301–1307.
30. Beteta-López A, Casallo-Blanco S, Vega-Prado L et al. Enfermedad Diseminada por *Mycobacterium avium* en Paciente Infectado por el VIH. A Propósito de un Caso y Revisión de la Literatura. *MEDICRIT* 2009; 6(1):46-53.
31. Hayashi M, Takayanagi N, Kanauchi T et al. Prognostic Factors of 634 HIV-Negative Patients with *Mycobacterium avium* Complex Lung Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012; 185(5):575-83.
32. Alvarez-Uria G, Falcó V, Martín-Casabona N et al. Non-tuberculous mycobacteria in the sputum of HIV-infected patients: infection or colonization?. *Int J STD AIDS* 2009; 20:193-195.
33. Chu J, Sloan CE, Kenneth A Freedberg KA et al. Drug efficacy by direct and adjusted indirect comparison to placebo: An illustration by *Mycobacterium avium* complex prophylaxis in HIV. *AIDS Res Ther* 2011, 8:14.
34. Kim EY, Chi SY, Oh IJ et al. Treatment Outcome of Combination Therapy Including Clarithromycin for *Mycobacterium avium* Complex Pulmonary Disease. *Korean J Intern Med* 2011; 26: 54-59.