

Tesis Doctoral

FluoFagos de segunda generación para detección y determinación de susceptibilidad a antibióticos en *Mycobacterium tuberculosis*

Rondón Salazar, Liliana

2017-03-23

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Rondón Salazar, Liliana. (2017-03-23). FluoFagos de segunda generación para detección y determinación de susceptibilidad a antibióticos en *Mycobacterium tuberculosis*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Rondón Salazar, Liliana. "FluoFagos de segunda generación para detección y determinación de susceptibilidad a antibióticos en *Mycobacterium tuberculosis*". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017-03-23.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad De Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

"FluoFagos de segunda generación para detección y determinación de susceptibilidad a antibióticos en *Mycobacterium tuberculosis*"

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

MSc. Liliana Rondón Salazar

Directora: Dra. Mariana Piuri

Consejero de Estudios: Julia Pettinari

Lugar de trabajo: Laboratorio de Bacterias Gram positivas, sus Fagos y Estrés.

Departamento de Química Biológica, IQIBICEN, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
Universidad de Buenos Aires.

Fecha de Presentación: 23 de Marzo del 2017

Buenos Aires, Marzo del 2017



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad De Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

"FluoFagos de segunda generación para detección y determinación de susceptibilidad a antibióticos en *Mycobacterium tuberculosis*"

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

MSc. Liliana Rondón Salazar

Directora: Dra. Mariana Piuri

Consejero de Estudios: Julia Pettinari

Lugar de trabajo: Laboratorio de Bacterias Gram positivas, sus Fagos y Estrés.

Departamento de Química Biológica, IQUIBICEN, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, Marzo del 2017

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	3
SITUACIÓN ACTUAL DE LA TUBERCULOSIS.....	4
CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS MICOBACTERIAS.....	6
CARACTERÍSTICAS DE LA ENVOLTURA CELULAR DE LAS MICOBACTERIAS.....	8
DEFINICIONES Y CAUSAS DE RESISTENCIA.....	9
RESISTENCIA A FÁRMACOS EN <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	11
BASES PARA EL TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS.....	12
MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE SUSCEPTIBILIDAD A FÁRMACOS ANTITUBERCULOSOS.....	16
<i>Métodos fenotípicos basados en el crecimiento micobacteriano</i>	20
Método de las proporciones.....	20
Resazurina.....	22
MGIT 960.....	22
Metodologías basadas en el empleo de bacteriófagos.....	23
Amplificación de fagos.....	24
Fagos Reporteros de Luciferasa.....	26
Fagos reporteros de genes fluorescentes.....	27
<i>Métodos genotípicos</i>	29
RESULTADOS PREVIOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	30

OBJETIVOS.....	32
OBJETIVO GENERAL.....	33
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
CEPAS Y MEDIOS DE CULTIVO.....	35
PLÁSMIDOS, FÁSMIDOS Y FAGOS.....	37
OLIGONUCLEÓTIDOS.....	38
PREPARACIÓN DE CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES DE <i>E. coli</i> JM109.....	39
PREPARACIÓN DE CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES DE <i>M. smegmatis</i> mc ² 155.....	39
TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES.....	39
ENSAYOS PARA LA INCORPORACIÓN DE TAGS EN LA CÁPSIDE DEL FLUOFAGO.....	40
Ensayos de BRED.....	40
Construcción de un plásmido que expresa el STAG-gp9 de TM4.....	41
Preparación de stocks de FluoFagos.....	42
Titulación de micobacteriófagos.....	43
Western Blot.....	43
ELISA (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas).....	44
Inmunoelectromicroscopía.....	44
Eficiencia de captura de partículas de fago libre usando perlas magnéticas recubiertas de Strep-Tactin.....	45
Recuperación de complejos fago-bacteria usando perlas magnéticas recubiertas de Strep-Tactin.....	45

Microscopía de Fluorescencia.....	46
EVALUACIÓN DE PARÁMETROS DE IMPORTANCIA EN EL PROCESO DE INFECCIÓN CON FLUOFAGOS.....	47
Viabilidad de <i>M. tuberculosis</i> usando diferentes protocolos de descontaminación de muestras clínicas (esputos).....	47
Efecto del pH.....	48
Infección usando <i>M. tuberculosis</i> en diferentes estado metabólico.....	49
Seguimiento de la fluorescencia en el tiempo.....	49
Fijación de micobacterias con paraformaldehído (PFA)	49
COMPARACIÓN DE LA <i>PERFORMANCE</i> DE FLUOFAGOS PARA LA DETECCIÓN DE <i>M. tuberculosis</i> Y DETERMINACIÓN DE RESISTENCIA A RIFAMPICINA EN MUESTRAS CLÍNICAS (ESPUTOS).....	50
Diferenciación de <i>M. tuberculosis</i> de otras micobacterias usando PNB.....	52
Ensayo de resistencia extendida con Φ mCherry _{bomb}	53
ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-EPIDEMIÓLOGICAS DE LA POBLACIÓN PARTICIPANTE.....	53
Individuos participantes.....	53
Análisis estadístico.....	54
APÉNDICE MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES.....	56
RESULTADOS	57
CAPÍTULO I. INCORPORACIÓN DE TAGS EN LA CÁPSIDE DE FLUOFAGOS.....	58
BRED: una forma simple de modificar genomas de bacteriófagos.....	58
Modificación de la cápside de TM4 empleando BRED.....	61

Adición de una etiqueta de afinidad a la cápside de TM4.....	63
Captura por afinidad de complejos fago-bacteria.....	68
CAPÍTULO II. EVALUACIÓN DE PARÁMETROS DE IMPORTANCIA EN EL PROCESO DE INFECCIÓN CON FLUOFAGOS.....	71
Efecto de diferentes protocolos de descontaminación de muestras clínicas (esputo) en la viabilidad micobacteriana.....	71
Fijación de las micobacterias con PFA.....	74
Efecto del pH en el proceso de infección.....	76
Influencia del estado metabólico micobacteriano en el proceso de infección.....	78
Estabilidad de la fluorescencia en infecciones usando Φ mCherry _{bomb}	81
CAPÍTULO III. EVALUACIÓN DE LA <i>PERFORMANCE</i> DE FLUOFAGOS PARA LA DETECCIÓN Y DETERMINACIÓN DE RESISTENCIA A RIFAMPICINA DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i> DIRECTAMENTE EN ESPUTOS.....	83
Diseño I. Diagnóstico de <i>Mycobacterium spp.</i> directamente en muestras de esputo.....	83
Diseño II. Diagnóstico y determinación de resistencia a rifampicina de <i>Mycobacterium spp.</i> directamente en muestras de esputo.....	85
Relación entre el número de bacilos fluorescentes detectados y el número de UFC presentes en la muestra.....	92
Evaluación de muestras discordantes a partir de cultivos.....	94
Infección con FluoFagos en muestras contaminadas.....	95
Diferenciación entre especies del complejo tuberculosis y micobacterias no tuberculosas.....	96
Determinación de resistencia a diferentes fármacos a partir de aislamientos clínicos XDR empleando FluoFagos.....	99

CAPÍTULO IV. ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-EPIDEMIÓLOGICAS DE LOS INDIVIDUOS PARTICIPANTES.....	101
Distribución por edad y género.....	102
Nacionalidad.....	104
TB Vs. VIH-SIDA y Diabetes (DBT).....	107
Otras enfermedades.....	109
Ocupaciones.....	112
Adicciones.....	115
Contacto.....	117
Clasificación del paciente al ingreso y tipo de alta.....	119
DISCUSIÓN.....	124
CONCLUSIONES.....	147
BIBLIOGRAFÍA.....	150

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tasa estimada de incidencia de tuberculosis en el 2015.....	5
Figura 2. Componentes básicos de la pared celular de las micobacterias.....	9
Figura 3. Resistencia Adquirida.....	10
Figura 4. Etapas de la replicación de bacteriófagos de ciclo lítico.....	24
Figura 5. Metodología FASTPlaqueTB.....	25
Figura 6. Representación esquemática del empleo de micobacteriófagos reporteros de genes fluorescentes.....	28
Figura 7. Representación esquemática del uso de FluoFagos para la detección de <i>M. tuberculosis</i> y determinación de resistencia a RIF en esputos.....	52
Figura 8. Pasos generales para la construcción de mutantes de bacteriófagos por BRED.....	60
Figura 9. Representación esquemática de la estrategia usada para incorporar un STAG en el extremo C-terminal de la proteína gp9 de TM4 usando BRED.....	62
Figura 10. Detección por PCR de la inserción del STAG en gp9.....	62
Figura 11. Representación esquemática de pNIT gp9-STAG.....	63
Figura 12. Curva de crecimiento de <i>M. smegmatis</i> mc2155 (pNIT gp9-STAG).....	64
Figura 13. Western Blot de la expresión de gp9-STAG.....	64
Figura 14. Western Blot para evaluar la incorporación de un STAG de afinidad en la cápside de phAE87:: <i>hsp60-EGFP</i>	65
Figura 15 ELISA para evaluar la incorporación de un STAG de afinidad en la cápside de phAE87:: <i>hsp60-EGFP</i>	66

Figura 16. Electroinmunomicroscopía para evaluar la incorporación de un STAG de afinidad en la cápside de <i>phAE87::hsp60-EGFP</i>	67
Figura 17. Representación esquemática del protocolo propuesto para la infección de <i>M. smegmatis</i> con STAG-gfp Φ y recuperación de complejos fago-bacteria con perlas magnéticas recubiertas de Strep-Tactin.....	68
Figura 18. Imágenes de microscopía de fluorescencia después de la elución de los complejos fago-bacteria usando perlas magnéticas recubiertas de Strep-Tactin.....	69
Figura 19. Imágenes de microscopía electrónica de la captura de complejos fago-bacteria.....	70
Figura 20. Relación de la recuperación/viabilidad de <i>M. tuberculosis</i> mc ² 6230 comparando dos protocolos de descontaminación de muestras clínicas.....	73
Figura 21. Evaluación de la viabilidad bacteriana posterior a la exposición con PFA 2% final a diferentes tiempos usando el método colorimétrico de resazurina.....	75
Figura 22. Evaluación de la viabilidad bacteriana posterior a la exposición con PFA 2% final a diferentes tiempos corroborada por cultivo en medio Middlebrook 7H11.....	75
Figura 23. Imágenes de microscopía de fluorescencia de las infecciones expuestas a variación de pH.....	77
Figura 24. Imágenes de microscopía de fluorescencia de las infecciones usando <i>M. tuberculosis</i> mc ² 6230 en diferentes estados metabólicos.....	80
Figura 25. Seguimiento de la fluorescencia de <i>M. tuberculosis</i> mc ² 6230 posterior a la infección con Φ mCherry _{bomb}	82
Figura 26. Microfotografía de una infección de esputo realizada con Φ mCherry _{bomb} en presencia de RIF 4 μ g/ml.....	92
Figura 27. Relación entre el número de bacilos infectados con Φ mCherry _{bomb} a las 48 horas post-recuperación y las UFC desarrolladas en medio Lowenstein Jensen.....	93
Figura 28. Relación entre el número de bacilos infectados con Φ mCherry _{bomb} a las 96 horas post-recuperación y las UFC desarrolladas en medio Lowenstein Jensen.....	94

Figura 29. Infección con FluoFago de cultivo proveniente del MGIT correspondiente al paciente p5317.....	95
Figura 30. Microfotografías de infecciones en muestras de esputo con FluoFagos	96
Figura 31. Efecto del PNB en la inhibición de micobacterias.....	98
Figura 32. Distribución de la edad Vs. género	103
Figura 33. Relación de la presencia de TB Vs. Edad.....	104
Figura 34. Frecuencia de los casos de TB Vs. Nacionalidades.....	106
Figura 35. Frecuencia de los casos de TB Vs. VIH y DBT.....	108
Figura 36. Relación entre enfermedades presente en la población en estudio.....	111
Figura 37. Relación de las ocupaciones desempeñadas por las personas participantes en el presente estudio y el desarrollo de la enfermedad tuberculosa.....	114
Figura 38. Interacción de las diferentes adicciones presentadas en la población en estudio respecto al diagnóstico de tuberculosis.....	116
Figura 39. Relación entre el desarrollo de TB y el estudio de contactos.....	118
Figura 40. Clasificación de los pacientes a su ingreso al Lab. de la TBC.....	121
Figura 41. Tipo de alta de los pacientes del presente estudio con diagnóstico de TB (+).....	123

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los fármacos empleados en el tratamiento de la tuberculosis.....	12
Tabla 2. Probabilidad de aparición de mutantes resistentes a diferentes fármacos.....	13
Tabla 3. Métodos de diagnóstico de susceptibilidad a fármacos de <i>M. tuberculosis</i>	17
Tabla 4. Captura de bacteriófagos usando perlas magnéticas recubiertas de Strep-Tactin.....	68
Tabla 5. Eficiencia del FluoFago Φ mCherry _{bomb} en la detección de <i>Mycobacterium spp.</i> en muestras de esputo comparado con el cultivo Lowenstein Jensen.....	84
Tabla 6. Datos globales de la detección de <i>Mycobacterium spp.</i> infectadas a las 48 horas post-recuperación usando el método del FluoFago Vs. Cultivo en medio Lowenstein Jensen usando diferentes puntos de corte.....	86
Tabla 7. Datos globales de la detección de <i>Mycobacterium spp.</i> infectadas a las 96 horas post-recuperación usando el método del FluoFago Vs. Cultivo en medio Lowenstein Jensen usando diferentes puntos de corte.....	87
Tabla 8. Evaluación de la <i>performance</i> para el diagnóstico de tuberculosis con el FluoFago Φ mCherry _{bomb} Vs. Cultivo en medio Lowenstein Jensen.....	88
Tabla 9. Datos globales de la determinación de resistencia a RIF en muestras de esputo infectadas a las 48 horas post-recuperación usando el método del FluoFago Vs. Cultivo en medio Lowenstein Jensen usando diferentes puntos de corte.....	90
Tabla 10. Datos globales de la determinación de resistencia a RIF en muestras de esputo infectadas a las 96 horas post-recuperación usando el método del FluoFago Vs. Cultivo en medio Lowenstein Jensen usando diferentes puntos de corte.....	90
Tabla 11. Evaluación de la <i>performance</i> para la determinación de <i>Mycobacterium spp.</i> resistente a RIF usando el método del FluoFago Φ mCherry _{bomb} Vs. Método de las proporciones.....	91

Tabla 12. Determinación de los patrones de resistencia a partir de aislamientos clínicos usando el método del FluoFago.....	99
--	----

RESUMEN

"FluoFagos de segunda generación para detección y determinación de susceptibilidad a antibióticos en *Mycobacterium tuberculosis*"

El diagnóstico actual de la tuberculosis (TB) se realiza por técnicas lentas y laboriosas que llevan desde semanas a meses o con métodos moleculares rápidos pero de alto costo. El desarrollo de FluoFagos, se basa en el uso innovador de fagos que acarrean genes fluorescentes que permiten la detección específica y sensible de *Mycobacterium spp.* viables y la determinación del perfil de susceptibilidad a antibióticos directamente en muestras clínicas de pacientes con sospecha de la enfermedad. La aparición de fluorescencia define la viabilidad de la bacteria, lo que es crucial para determinar el tratamiento a seguir. En este contexto existe una necesidad apremiante de métodos diagnósticos rápidos y económicos que combinen sensibilidad, especificidad, bioseguridad, y la determinación rápida de susceptibilidad a los fármacos y que puedan ser aplicados en centros de atención primaria de países en desarrollo donde la incidencia de la TB es alta. Por lo anteriormente planteado, el objetivo principal de esta tesis es validar nuevas metodologías basadas en el uso de FluoFagos para la detección y testeo de susceptibilidad a antibióticos en *Mycobacterium tuberculosis*. Se realizó la incorporación de *tags* en la cápside del fago para su empleo en la captura de complejos fago-bacteria comprobando su incorporación mediante western-blot, ELISA e inmunoelectromicroscopía. Los lisados de fagos que acarrean el "tag" se emplearon para recuperar complejos fago-bacteria usando *Mycobacterium smegmatis* y se evaluó la afinidad de captura mediante microscopía de fluorescencia. Además, se estudiaron algunos parámetros que pueden afectar el proceso de infección entre ellos los métodos de decontaminación de las muestras clínicas empleados de forma rutinaria en los centros de salud. Por otra parte, se comparó la *performance* de FluoFagos optimizados, reporteros del gen que codifica para la proteína mCherry_{bomb} para la detección y determinación de resistencia a rifampicina en muestras clínicas (esputos), relacionando la sensibilidad y especificidad con los obtenidos por el método de las proporciones usado como método de referencia. Las muestras clínicas empleadas en este estudio fueron

facilitadas por el Laboratorio de bacteriología de la TBC (Inst. Vaccarezza-Hospital Muñiz). Finalmente, se propuso realizar el estudio de las características clínico-epidemiológicas de los pacientes incluidos en la presente investigación con el fin de conocer los aspectos más relevantes asociados a la tuberculosis en la República Argentina. Los resultados obtenidos resaltan la utilidad de los FluoFagos para ser implementados como un método rápido, económico, sensible y específico para diagnosticar la tuberculosis y la resistencia a rifampicina directamente en muestras de esputo, facilitando el tratamiento y prevención de la diseminación de cepas resistentes.

ABSTRACT

"Second generation FluoPhage detection and antibiotic susceptibility testing in *Mycobacterium tuberculosis*"

The current diagnosis of tuberculosis (TB) is performed by slow and laborious techniques that take from weeks to months or rapid and expensive molecular methods. The development of FluoPhages is based on the innovative use of phages that carry fluorescent genes allowing specific and sensitive detection of viable *Mycobacterium spp.* and determination of antibiotic resistance profile directly in clinical samples of patients suspected of having the disease. The appearance of fluorescence correlates with the viability of the bacteria, which is crucial to decide the course of treatment. In this context, there is an urgent need for quick and inexpensive diagnostic methods that combine sensitivity, specificity, biosafety, and the rapid determination of susceptibility to antibiotics that could be applied in primary care centers of developing countries where the incidence of TB is high. Taking this in consideration, the main aim of this thesis is to validate new methodologies based on the use of FluoPhages for detection and antibiotic susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. A tag was added to the phage capsid to allow the capture of phage-bacteria complexes. Incorporation of the tag was checked by Western blot, ELISA and immunoelectromicroscopy. Also, some parameters that can affect the process of infection were studied including methods of decontamination of clinical samples routinely employed in health centers. Phage lysates that carry the tag were used to capture phage-bacteria complexes using *Mycobacterium smegmatis* and the affinity of the capture was evaluated by fluorescence microscopy. Furthermore, we compared the performance of an optimized FluoPhage, carrying mCherry_{bomb} reporter gene, for detection and identification of rifampicin resistance bacteria in clinical samples (sputum). The sensitivity and specificity was compared with the proportion method used as gold standard. The samples used in this study were provided by the Laboratory of bacteriology of tuberculosis (Vaccarezza Institute - Muñiz Hospital). Finally we did an epidemiological study of patients included in this study in order to know the most important aspects associated with tuberculosis disease in Argentina. The results highlight

the utility of Fluophages to be implemented as a fast, inexpensive, sensitive and specific method for tuberculosis diagnosis and detection of rifampicin resistance directly in sputum samples, facilitating the treatment and prevention of the spread of resistant strains.

A mis padres, hermanos y esposo

AGRADECIMIENTOS

Los grandes retos se logran en equipo y ustedes forman parte!

A la Dra. Mariana Piuri, porque fuiste parte importante para entrar en este mundo de la tuberculosis y los fagos, no solamente en estos 5 años de formación sino desde años atrás cuando me brindabas asesoría y resolvías mis dudas por internet cuando nos separaban kilómetros y kilómetros de distancia. Gracias por permitirme formar parte de este grupo, por tu excelente predisposición para que todo se dé de la mejor manera, por ser una directora presente sin importar si es lunes o domingo. Hoy, quiero agradecerte especialmente por entender mis ausencias, todo ha sido más fácil contando con tu apoyo y comprensión.

Al equipo del Laboratorio de la Tuberculosis del Hospital Muñiz. Este trabajo hubiese sido imposible sin la colaboración de ustedes. Dra. Susana Poggi, gracias por el tiempo dedicado para compartir conmigo tus conocimientos, por tu colaboración e interés para que pudiera desarrollar todas mis actividades. Al Dr. Mario Matteo y Cecilia Latini, ustedes fueron parte importante para el desarrollo y culminación de este trabajo, gracias por la compañía en las horas de trabajo, por los cafés, por los momentos de catarsis. A ti, Mónica García, porque siempre estabas atenta a guardarme las muestras, gracias por esas interminables charlas de todo. Vicky e Inesita, a ustedes muchas gracias porque se involucraron en este trabajo desinteresadamente.

Al Dr. Sergio Nemirovsky, por la asesoría en el análisis de los resultados, y su excelente predisposición en las largas jornadas.

Para ti, Dra. Carmen Sánchez mil gracias! Me quedan los mejores recuerdos tuyos no solo como excelente profesional entregando su vida entera a la investigación sino como persona; imposible olvidar el primer día cuando emprendí esta aventura y tú abriste las puertas de tu casa desinteresadamente, haciéndome sentir como en casa.

A ti Dra. Sandra Ruzal mi mayor admiración, siempre con una sonrisa y dispuesta a colaborar en todo, desde buscar aquel "socotroco" que solamente tú sabes dónde está guardado, hasta las excelentes sugerencias para que los experimentos salgan mejor.

Tefiu y Euge, compañeras de camino desde el inicio, porque el trabajo se hace más ameno compartiéndolo con ustedes, porque siempre absolutamente siempre están presentes dispuestas a colaborar, a sacar una sonrisa o sencillamente a prestar sus oídos para las descargas.

A ti Shor, por hacerme reír con tus historias y locuras, por tu buena vibra siempre, por los miles de cultivitos largados, por las placas sacadas de la estufa, por no olvidar de colocar el PFA a mis muestras y sobre todo gracias por llegar en el momento justo cuando ya empezaba a colapsar con la tesis. Genia, mil gracias!

A las más recientes generaciones, Lachito y Flor, es poco el tiempo compartido pero el necesario para darme cuentas las grandes personas que son, éxitos en este camino que emprenden.

Se viene el dúo dinámico, Dr. Acosta y Joaqui. Por colocarle ritmo caribeño, buena vibra y solo sonrisas a la vida y al trabajo; me hicieron sentir como en casa!

Marianita, mi conciencia y Mer la paz y el equilibrio=ustedes son la balanza de mis emociones académicas y científicas! Gracias chicas. Pablito, gracias por tu compañía en esos días en donde mis jornadas se hacían más largas, gracias por tus técnicas de relajación, cuanto me sirvieron y cuanto me hicieron falta al final de esta etapa.

A Matito, Dani, José y Manu; ustedes sí que contribuyeron con este trabajo, gracias chicos! Porque ustedes entienden que no todo es carnavalesco, también hay que aportar a la ciencia.

A los chicos de Genética Bacteriana, porque las mesitas no son las mesitas sin ustedes, por los momentos compartidos, por la solidaridad que siempre brindan que hace que ustedes y nosotros seamos casi un mismo laboratorio.

A todos los "sin filtro", gracias chicos ustedes también hicieron parte de mi historia, de esta historia.

A esas personas incondicionales en mi vida, a ustedes que me acompañan todos los días a pesar de la distancia, a ustedes que siempre me brindan su apoyo y amor, gracias infinitas gracias familia. A ti José, que me acompañas desde hace 9 años, brindándome tu apoyo e incondicionalidad, gracias por acompañarme en este camino cuando se hizo todo tan difícil al inicio y aquí estamos, logrando nuestros objetivos.

ABREVIATURAS

µl	microlitro
ADN	ácido desoxirribonucleico
AM	amikacina
ATP	adenosina trifosfato
BAAR	bacilos ácido alcohol resistentes
BRED	bacteriophage recombineering of electropored DNA
BSA	albúmina de suero bovino
Cfz	clofazimina
CM	capreomicina
D.O	densidad óptica
DBT	diabetes
DEL	diodos emisores de luz
ETB	etambutol
FQ	fluoroquinolona
GFP	proteína verde fluorescente – Green Protein Fluorescent
HRP	horse radish peroxidase
INDEC	instituto nacional de estadística y censos
INH	isoniacida
Kan	kanamicina
Kan ^R	kanamicina resistente
LB	luria bertani
LJ	lowenstein Jensen
<i>M. tb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Mfx	moxifloxacina
mM	milimolar
Mm	milímetro
MODS	ensayo de susceptibilidad a fármacos mediante observación microscópica <i>Microscopic-Observation Drug Susceptibility Assay</i>
ng	nanogramos
nm	nanómetros
OFLO	ofloxacina
OMS	organización mundial de la salud
OPS	organización panamericana de la salud
PANTA	polimixina B, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprima, azlocilina
Pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PFA	paraformaldehído
pmol	Picomoles
PNB	p-nitrobenzoic acid – ácido p-nitrobenzoico
Pto	Protionamida
PZA	Pirazinamida
RIF	Rifampicina
rpm	revoluciones por minuto

SNVS	sistema nacional de vigilancia de la salud
STR	Estreptomina
TAES	tratamiento acortado estrictamente supervisado
TB	Tuberculosis
TB-MDR	tuberculosis multi drogo resistente
TB-TDR	tuberculosis totalmente drogo resistente
TB-XDR	tuberculosis extremadamente resistente
TMB	Tetrametilbencidina
UFC	unidades formadoras de colonias
UFP	unidades formadoras de placas
UV	Ultravioleta
VIH	virus de inmunodeficiencia humana
VPN	valor predictivo negativo
VPP	valor predictivo positivo
WB	western blot
ZN	ziehl neelsen
Φ gfp	pHAE87:: <i>hsp60-EGFP</i>
Φ gfp-STAG	pHAE87:: <i>hsp60-EGFP-STAG</i>

INTRODUCCIÓN

SITUACIÓN ACTUAL DE LA TUBERCULOSIS

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecto-contagiosa, sistémica, crónica, que afecta principalmente al sistema respiratorio; es causada por bacilos pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb*), conformado por especies estrechamente relacionadas que causan la enfermedad en seres humanos y animales (Forrellad et al. 2013).

El contagio se da por vía aérea, cuando una persona enferma con una TB activa disemina los bacilos al hablar, toser o estornudar; estos son fácilmente transportados en el flujo aéreo hasta los alvéolos en donde son captados por los macrófagos alveolares, que los fagocitan y destruyen. Sin embargo, algunos pasan esa barrera e ingresan en la circulación y son procesados y bloqueados en los ganglios linfáticos, ocasionando la activación de los mecanismos de inmunidad celular que se traducen en el conocido viraje tuberculínico o positivización de la intradermorreacción de Mantoux (Koul et al. 2011; Ayubi et al. 2016; Dorman et al. 2014).

En el ámbito mundial, la TB ha vuelto a surgir como un importante problema de salud pública desde mediados de la década de 1980, existiendo grandes diferencias entre los países industrializados y los subdesarrollados en cuanto al control de la enfermedad (Olakunle et al. 2014). A nivel mundial esta enfermedad es una de las principales causas de mortalidad humana, con aproximadamente 10,4 millones de nuevos casos por año y alrededor de 1,5 millones de muertes anuales (1,1 millones VIH-negativas y 0,4 millones VIH-positivas), convirtiéndose en la segunda causa más importante de mortalidad en adultos después del Virus de Inmunodeficiencia Humana - VIH/SIDA (WHO, 2016). De los 10,4 millones de nuevos casos de TB registrados, el 58% proceden de las regiones de Asia Sudoriental y el Pacífico Occidental. En la Región de África se registró el 28% de los casos, esta región soporta la mayor carga de enfermedad: 281 casos por 100 000 personas, más del doble de la media mundial, proporcional a su población. Los tres países más afectados fueron la India, Indonesia y China con el 23%, el 10% y el 10% del total mundial, respectivamente (Figura 1).

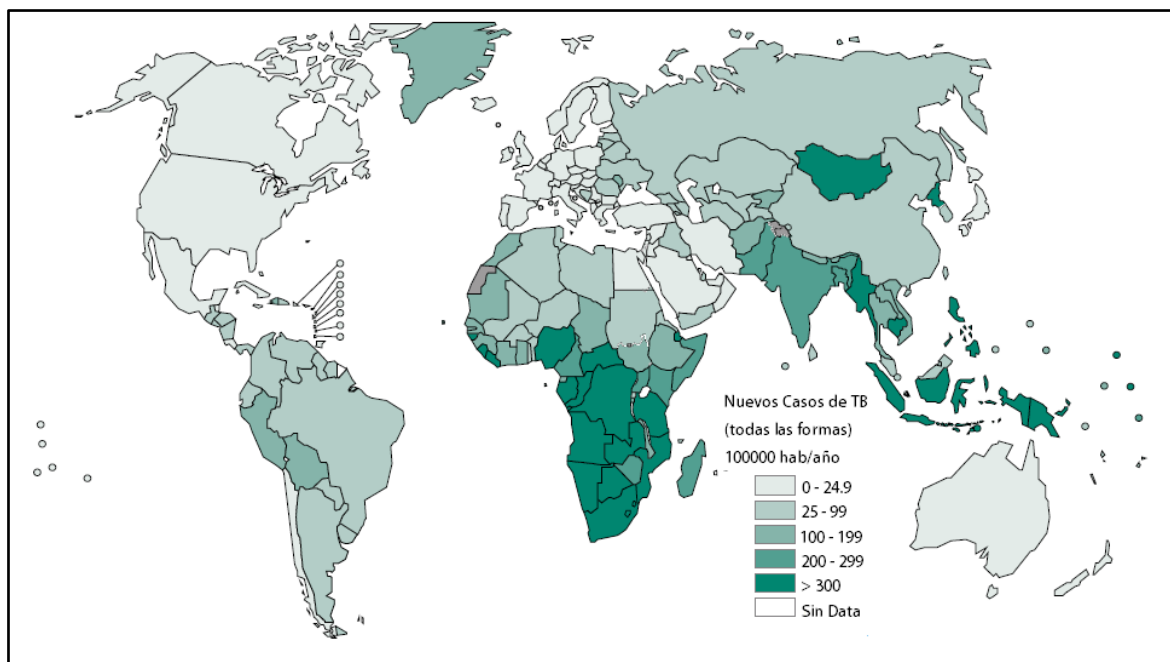


Figura 1. Tasa estimada de incidencia de tuberculosis en el 2015. Tomado de WHO, 2016.

La República Argentina no está exenta de esta situación, en el año 2015 se notificaron 10.713 casos de TB al Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud (SNVS), resultando una tasa de 24,8 casos cada 100.000 habitantes. El 91,1% de los casos son clasificados como casos nuevos, recaídas, y sin información de tratamiento previo, y el 8,9% restante tenían algún antecedente de tratamiento. Aproximadamente un 85% de los casos nuevos y recaídas eran de localización pulmonar, y entre éstos, el 63,8% tenían confirmación bacteriológica por examen directo. Estas cifras fueron superiores en los casos con antecedentes de tratamiento, ya que el 90,2% eran pulmonares y de ellos, el 70,4% tenían capacidad de transmitir la enfermedad (ANLIS, 2016).

Uno de los factores que dificultan el manejo y control clínico de la TB a nivel mundial es la resistencia a los fármacos. la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que el 3,3% de los nuevos casos mundiales de TB y el 20% de los casos previamente tratados tienen TB Multi Drogo Resistente (TB-MDR), entendiéndose como tal, la resistencia por lo menos a isoniacida (INH) y rifampicina (RIF). En el año 2014, se estimaba en 480000 nuevos casos y 190000 muertes a nivel mundial por la TB-MDR (Ben-kahla & Al-hajoj 2016; Rockwood et al. 2015; WHO, 2016). Mientras que para finales del año 2015, se informaron 7579 casos de TB Extremadamente Drogo Resistente (TB-XDR) distribuidos en 74 países; presentándose la

mayoría de los casos en India, Ucrania, Federación Rusa y Sudáfrica (WHO, 2016). Muchos de estos casos corresponden a individuos portadores de cepas de *M. tb* que desarrollan resistencia como consecuencia de una incorrecta administración de la quimioterapia, ya sea por falta de cumplimiento del tratamiento prescrito o por un tratamiento inadecuado seleccionando mutantes naturalmente resistentes (Lewandowski et al. 2015; Gandhi et al. 2010; Nasiri et al. 2014).

En las últimas décadas y simultáneamente a la irrupción del VIH, la epidemia de la TB, que se creía en vías de extinción en los países desarrollados con el actual arsenal terapéutico, ha experimentado un dramático revés. Así mismo, se presentan otros factores, como la desprotección social de algunos grupos marginales, la deficiente inspección de los programas terapéuticos y el elevado índice de incumplimiento en el tratamiento, los numerosos brotes en instituciones cerradas y la aparición de resistencia a los tratamientos habituales son factores que contribuyen a un aumento en las tasas de infección tuberculosa (Olakunle et al. 2014).

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS MICOBACTERIAS

Las micobacterias se adscriben taxonómicamente al género *Mycobacterium*, único de la familia Mycobacteriaceae, perteneciente al orden Actinomycetales. En el esquema de clasificación de Bergey, dicha familia se incluye dentro del grupo de bacilos aerobios gram positivos, donde se encuentran además, la familia Corynebacteriaceae y las Nocardioformes que incluye a los géneros *Nocardia* y *Rhodococcus* (Padya et al. 2015).

El género *Mycobacterium* se divide generalmente en dos grandes grupos de acuerdo a su tasa de crecimiento. Uno de los grupos reúne aquellas especies de crecimiento lento y patógenas tales como: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium leprae*; agentes etiológicos de la tuberculosis humana, tuberculosis bovina y la lepra, respectivamente. El otro grupo reúne especies de crecimiento rápido, tal como *Mycobacterium smegmatis* que en general son bacterias oportunistas no patógenas (Forrellad et al. 2013).

El complejo de *M. tb* está conformado por las especies *M. tuberculosis*, *M. canetti*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis*, *M. caprae* y *M. pinnipedii* que son muy similares genéticamente. De las especies anteriormente mencionadas, *M. tb* es la más ampliamente conocida infectando a más de un tercio de la población mundial, además también es capaz de infectar a animales que se encuentran en contacto con los humanos. Así mismo las especies *M. africanum* y *M. canetti*, están estrechamente relacionadas con *M. tb* y también pueden causar la TB humana, por lo general estas especies son aisladas de pacientes africanos. Por otra parte, *M. bovis* es una de las especies que presenta un mayor rango de huésped causando infección en los seres humanos, bovinos y caprinos domésticos o salvajes (OPS, 2008).

En la actualidad existe una única vacuna que es usada en la prevención de la TB durante la primera infancia, la cual es una mutante seleccionada en laboratorio de *M. bovis*, aislada por Calmette-Guérin y es conocida como *M. bovis* Var BCG, esta vacuna fue introducida por primera vez en el año de 1921 (Fletcher & Schragger 2016). Finalmente se encuentran las especies *M. microti* patógenos de roedores pudiendo causar la enfermedad en humanos inmunocomprometidos y *M. pinnipedii* que infecta a las focas (Brosch et al. 2002; Forrellad et al. 2013).

Las micobacterias son consideradas bacilos ácido-alcohol-resistentes (BAAR) por presentar resistencia a la decoloración con alcohol ácido al 3% en la tinción Ziehl-Neelsen (ZN). Esta resistencia se cree que dependa de la integridad de la cubierta de cera y su envoltura altamente hidrofóbica (Mokry, 2016). Estos factores hacen que se les atribuyan las inusuales características de tinción, su alta resistencia a los métodos más comunes de lisis química y, como se mencionó anteriormente, su propiedad de ácido alcohol resistencia, la cual es utilizada para su identificación. Estas propiedades aportan grandes ventajas a estos microorganismos, como la de ser relativamente impermeables a muchos antibióticos, refractarios al ataque de enzimas celulares, y mostrar una alta resistencia a los daños oxidativos producidos dentro del macrófago (Brennan 2003; Forrellad et al. 2013; Mokry 2016).

En términos generales, los requerimientos nutricionales de las micobacterias son sencillos, consistiendo de una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, y determinadas sales minerales. La fuente de carbono más comúnmente utilizada para el crecimiento *in vitro* de estos microorganismos es el glicerol, mientras que el amonio y los aminoácidos suelen utilizarse como fuente de nitrógeno (Niderweis 2008).

CARACTERÍSTICAS DE LA ENVOLTURA CELULAR DE LAS MICOBACTERIAS

Las micobacterias presentan una envoltura celular característica que se puede dividir en tres componentes estructurales: membrana plasmática, pared celular y cápsula. La pared de las micobacterias posee una estructura muy compleja compuesta por un elevado contenido de lípidos (50 – 60%) caracterizándose por ser cerosa, altamente hidrofóbica y poseer un alto contenido de lípidos y ácidos micólicos. Su estructura está formada por una matriz insoluble compuesta de tres macromoléculas unidas de forma covalente: el peptidoglicano, el arabinogalactano y los ácidos micólicos que confieren la característica de ácido alcohol resistencia como se observa en la Figura 2 (Niderweis 2008; Kieser & Rubin 2014). Las micobacterias presentan resistencia intrínseca a muchos agentes quimioterapéuticos, esto debido a la baja permeabilidad de la pared celular consecuencia del alto contenido lipídico confiriéndoles resistencia a un gran número de antibióticos, estas características constituyen una importante barrera para la absorción de las drogas (Van Ingen et al. 2012).

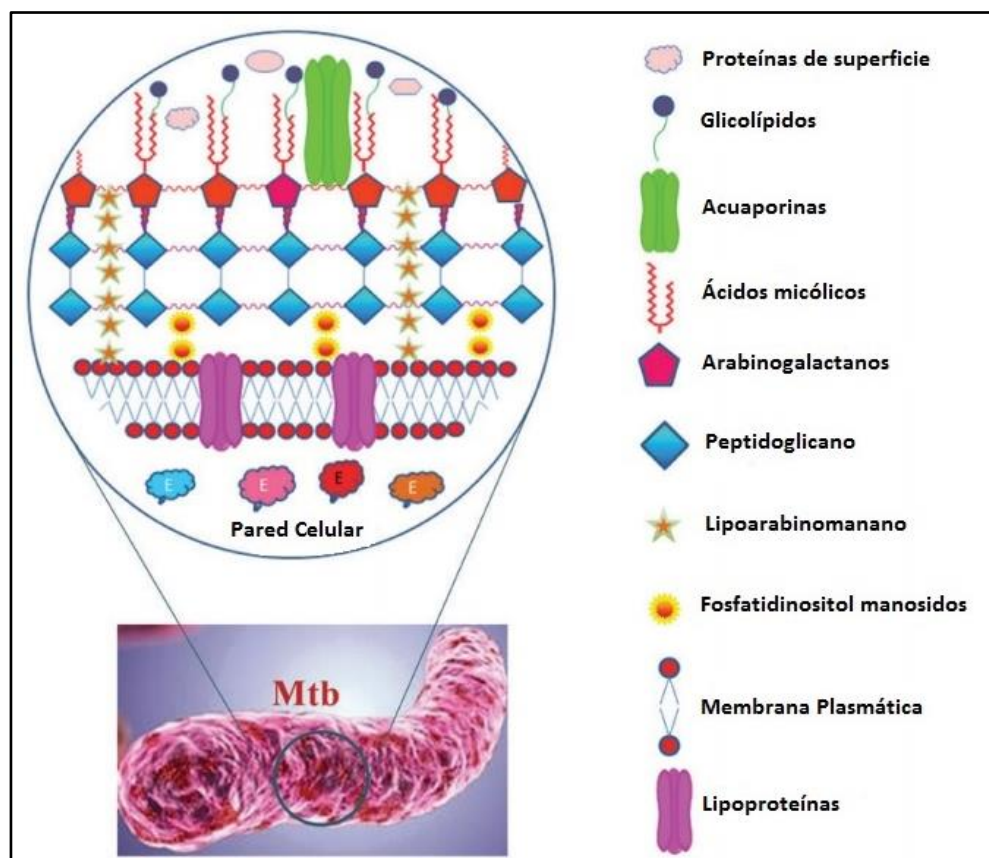


Figura 2. Componentes básicos de la pared celular de las micobacterias (Janardhan et al, 2016).

DEFINICIONES Y CAUSAS DE RESISTENCIA

La *resistencia primaria* se refiere a la infección por una cepa resistente de un paciente que nunca ha recibido tratamiento. Ésta incluye infección por cepas silvestres que nunca han estado en contacto con fármacos (*resistencia natural*) y también la resistencia que se desarrolla como consecuencia de la exposición de una cepa determinada a un fármaco, pero en otro paciente. Se define como *resistencia secundaria o adquirida*, aquella que se desarrolla en pacientes que han recibido quimioterapia antituberculosa, debido a la selección de cepas mutantes resistentes espontáneas (Figura 3), en la mayoría de los casos, como consecuencia a un tratamiento inadecuado o incumplimiento de la terapia (Nasiri et al. 2014; Andrews et al. 2008; Gandhi et al. 2010).

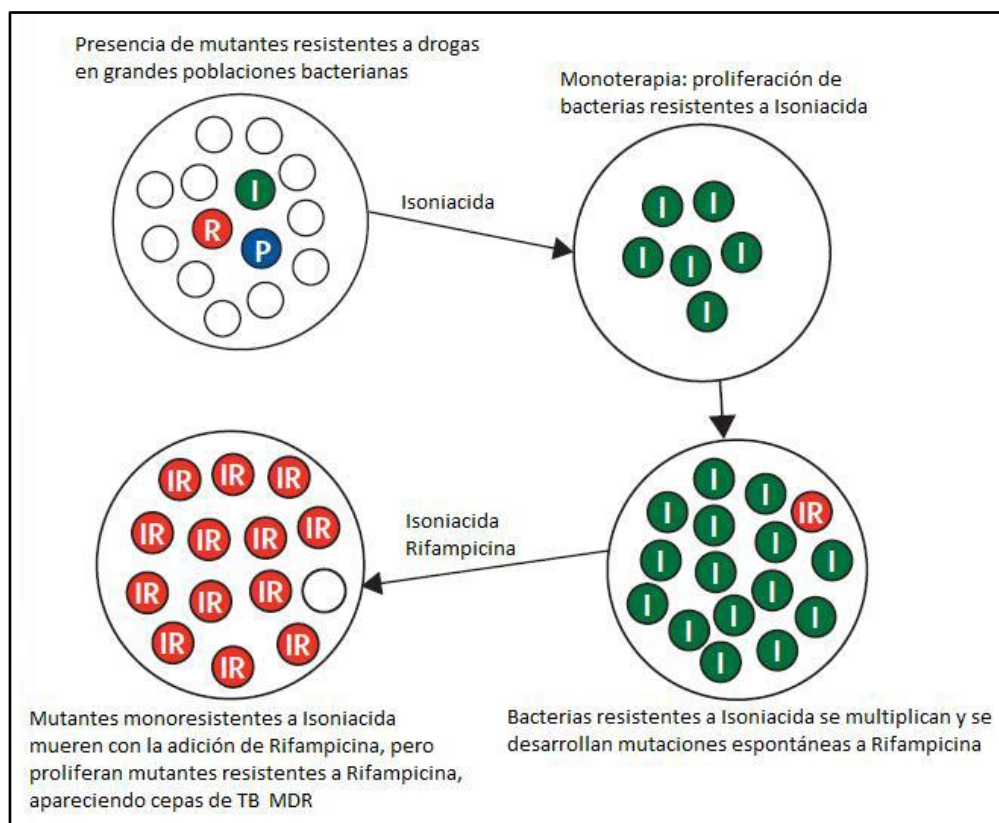


Figura 3. Resistencia Adquirida. I: isoniacida, R: rifampicina, P: pirazinamida, TB: tuberculosis, MDR: multidrogorresistente (Gandhi et al, 2010).

Otros conceptos importantes en el manejo del paciente y la epidemiología de la TB-MDR son la monorresistencia y polirresistencia. La OMS define la *monorresistencia* como resistencia de *M. tb* a uno de los cuatro fármacos de primera línea (INH, RIF, etambutol (ETB) y estreptomina (STR)), mientras que la *polirresistencia* se refiere a la resistencia a dos o más fármacos de primera línea que no sean INH junto con RIF, ya que como se mencionó anteriormente la presencia de cepas resistentes a éstos dos fármacos es definida como TB-MDR; éstos dos fármacos son los más efectivos en la terapia antimicrobacteriana, en ausencia o presencia de resistencia a otros fármacos. La TB-XDR, se define como la tuberculosis resistente a la INH y RIF, y a algún tipo de fluoroquinolona (FQ), así como a alguno de los tres fármacos inyectables de segunda línea: amikacina (Am), capreomicina (Cm) y kanamicina (Kan) (Migliori et al. 2012; Falzon et al. 2012). Y finalmente la TB Totalmente Drogo Resistente (TB-TDR), este término se utilizó por primera vez en el 2011 para un grupo de pacientes en la India que presentaba resistencia a todos los medicamentos conocidos para tratar la TB, es ampliamente utilizado pero aún no es reconocido por la OMS (Maeurer et al. 2014; Parida et al. 2014).

RESISTENCIA A FÁRMACOS EN *Mycobacterium tuberculosis*

Las cepas resistentes a un único fármaco son comunes, pero se ha comprobado que los pacientes responden bien a la terapia estándar (Onyebujoh & Zumla 2005); en cambio los casos de TB-MDR son mucho más difíciles de tratar, y se requiere de terapias con períodos de tiempos prolongados, basadas en el uso de fármacos más tóxicos, más costosos y menos activos que los fármacos de primera línea (Tabla 1). Aunque existen algunas recomendaciones generales para el tratamiento de las TB-MDR y TB-XDR, el régimen adoptado depende de cada caso. El tratamiento de estos pacientes debería decidirse por o en conjunto con expertos en TB resistente, requiriendo del seguimiento de la respuesta del paciente y de pruebas de susceptibilidad a diferentes fármacos (WHO, 2016).

En general, el tratamiento de infecciones causadas por micobacterias es más difícil que el tratamiento de infecciones causadas por la mayoría de las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, debido a que las micobacterias son resistentes de forma natural a la mayoría de los fármacos y agentes quimioterapéuticos más comunes. Además, las micobacterias también son relativamente resistentes a ambientes severos como la desecación y el tratamiento con álcali, presente en muchos desinfectantes químicos; lo cual hace que la prevención de la transmisión de *M. tb* sea difícil (Hong & Hopfinger 2004).

Tabla 1. Clasificación de los fármacos empleados en el tratamiento de la TB (Palmero et al. 2015).

GRUPO	CLASIFICACIÓN	FÁRMACOS
Grupo I	Primera Línea	Isoniacida, rifampicina, etambutol, pirazinamida
Grupo II	Fluoroquinolonas	ofloxacina, levofloxacina, moxifloxacina
Grupo III	Inyectables	kanamicina, amikacina, capreomicina, estreptomina
Grupo IV	Agentes bacteriostáticos orales	cicloserina/terizidona, etionamida/protionamida, ácido paraminosalicílico
Grupo V	Fármacos de eficacia en estudio	Clofazimina, linezolid, amoxicilina/clavulanato, carbapenems (imipenem-cilastatin y meropenem), INH en altas dosis, bedaquilina* y delamanid*.

Los fármacos de los grupos II al IV (excepto la estreptomina) son considerados de segunda línea, mientras que los del grupo V son denominados fármacos de tercera línea. * Aprobados para su uso por 6 meses en TB XDR/pre-XDR.

BASES PARA EL TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS

Los bacilos que forman parte de una colonia, a pesar de proceder de una sola célula, no presentan siempre un comportamiento homogéneo frente a todos los fármacos empleados en el tratamiento de la TB. Es decir, que a partir de un determinado número de microorganismos surgen, en sucesivas divisiones, mutantes naturales espontáneas que se comportan como resistentes a alguno de los fármacos. La mutación es al azar, independientemente del medio, está en función del número de la población bacilar, el tipo de medicamento administrado y de la concentración de éste.

En la Tabla 2 se describe el número aproximado de bacilos que son necesarios para que aparezca uno que sea mutante resistente natural a cada uno de los fármacos. La selección de resistencias se ve favorecida con la instauración de monoterapias, por lo cual no es

recomendada; por el contrario la administración de tres o más fármacos disminuye la probabilidad de aparición de resistencias siendo prácticamente nula (Sancineto 2009).

Tabla 2. Probabilidad de aparición de mutantes resistentes a diferentes fármacos.

Fármaco	Probabilidad de aparición de Resistencia*
Isoniacida	$1 \times 10^5 - 10^6$ bacilos
Rifampicina	$1 \times 10^7 - 10^8$ bacilos
Estreptomina	$1 \times 10^5 - 10^6$ bacilos
Etambutol	$1 \times 10^5 - 10^6$ bacilos
Pirazinamida	$1 \times 10^2 - 10^4$ bacilos
Fluoroquinolonas	$1 \times 10^5 - 10^6$ bacilos
Otras	$1 \times 10^3 - 10^6$ bacilos

*Se registra la cantidad de bacilos necesarios para la aparición de una mutante resistente

Existen cuatro probabilidades de crecimiento que condicionan los fundamentos de las actuales asociaciones de fármacos y la duración del tratamiento:

- Poblaciones bacilares metabólicamente activas y en crecimiento continuo:

Representada por la mayoría de los bacilos, con una población total de $10^7 - 10^9$. Son fácilmente detectables en muestras de esputo y están situados en el interior de las paredes de las cavernas, donde las condiciones de pH y presión de oxígeno son las ideales. Esta población, la mayoría de las veces, es la causa de los fracasos terapéuticos y de la aparición de resistencias si no son eliminados en forma homogénea. Se eliminan rápidamente por la acción bactericida de la INH y, con menor rapidez por la STR y RIF.

- Poblaciones bacilares en fase de inhibición ácida:

Esta es una población poco numerosa, representada aproximadamente por un total de $10^3 - 10^5$ bacilos. Su crecimiento es inhibido por el medio ambiente ácido del interior de los macrófagos o por el pH ácido que existe en zonas inflamatorias de la pared cavitaria. Las condiciones de hipoxia de su entorno también inhiben su crecimiento, al no tener actividad metabólica, difícilmente pueden ser eliminados por la acción de los

fármacos. Esta población es una de las fuentes de las recaídas bacteriológicas de la TB, el medicamento más activo contra esta población bacilar es la pirazinamida (PZA) cuya actividad aumenta con la acidificación del medio.

- Poblaciones bacilares en fase de multiplicación esporádica:

Esta población está representada por un total de $10^3 - 10^5$ bacilos, que se ubican preferentemente en el caseum sólido en donde el pH es neutro. Tienen largos períodos durmientes, con ocasionales períodos metabólicos. Por este motivo, los fármacos sólo pueden eliminarlos en estos escasos períodos, no presentándolos, a veces, a lo largo del tratamiento. Por este motivo, esta población es la causante de las recaídas bacteriológicas después de finalizar el tratamiento; su escasa actividad metabólica impide la posibilidad que desarrolle resistencia. El fármaco de elección para eliminar esta población es la RIF, fundamentalmente por la rapidez del comienzo de su acción que es de 15 a 20 minutos en comparación con las 24 horas que necesita la INH.

- Poblaciones bacilares persistentes o totalmente durmientes:

Esta población no presenta actividad metabólica, por eso no existe acción destructiva de los fármacos y es probable que solamente los mecanismos de defensa sean capaces de controlarlos. Se cree, que esta población bacilar sería una de las responsables de las recaídas en situaciones de inmunodeficiencia severa.

El tratamiento de la TB se basa en conceptos muy distintos a los de las demás infecciones bacterianas. El bacilo *M. tb* tiene un tiempo de generación prolongado y la capacidad para entrar en períodos de latencia con una actividad metabólica limitada, lo cual dificulta la acción de los antimicrobianos (Beach 1994; Torrey et al. 2016).

El tratamiento estándar para la TB susceptible comprende una fase intensiva con INH, RIF, PZA y ETB durante dos meses, seguido de una fase de continuación administrando INH y RIF durante otros cuatro meses (Sotgiu, Centis, et al. 2015; Yew & Koh 2016; Lange 2015; Van Ingen et al. 2012; Sotgiu, Alffenaar, et al. 2015).

Aunque el régimen de tratamiento estándar de 6 meses es altamente efectivo para la TB susceptible a fármacos, el uso de múltiples fármacos durante largos períodos de tiempo puede causar reacciones adversas (Xiaozhen et al. 2013).

Además, algunos de estos pacientes en ocasiones no responden adecuadamente al tratamiento lo cual conlleva a un fracaso terapéutico y selección de bacilos resistentes implicando la instauración de regímenes terapéuticos alternativos que la mayoría de las veces están basados en el empleo de fármacos con menor efectividad y mayor toxicidad (Munro et al. 2007; Choi et al. 2017). Una de las reacciones adversas más común es la hepatotoxicidad, la cual está asociada con tres de los fármacos más importantes de primera línea que son la INH, RIF y PZA. Sin embargo, esta consecuencia se relaciona más con las dosis aunque en algunos casos es causada por la hipersensibilidad al fármaco (Yew & Leung 2006). La estrategia de la OMS de implementar el tratamiento acortado estrictamente supervisado (TAES), en donde se suministra la dosis de fármaco de forma personalizada lo cual puede contribuir a la disminución de la incidencia de las reacciones adversas y a su vez aumentar el éxito de los resultados del tratamiento (Alsultan & Peloquin 2014; Sotgiu, Alffenaar, et al. 2015).

El esquema de tratamiento para los pacientes con TB-MDR, pre-XDR y XDR se recomienda que sea personalizado según los resultados de susceptibilidad a los fármacos, al no contarse con esta información se instauran tratamientos empíricos hasta el momento de obtener los resultados (Lange et al. 2014). Se recomienda que el régimen inicial para el tratamiento de la TB-MDR incluya cuatro fármacos o más al cual el aislamiento del paciente es susceptible, siendo el tiempo de duración de la fase intensiva de 6 a 8 meses (Ahuja et al. 2012). El empleo de mayor cantidad de fármacos está relacionado a mejores resultados, además la necesidad de utilizar mayor cantidad de fármacos refleja una menor eficiencia de los mismos y más tóxicos en comparación con la INH, RIF y PZA (Kuaban et al. 2015; Franke et al. 2015). Se recomienda que el tratamiento de la TB-MDR se realice por un mínimo de 18 meses o más incluyendo la fase intensiva; sin embargo, publicaciones recientes exhiben resultados prometedores en varios países en donde se evaluó el uso de un régimen estandarizado de tratamiento por un período de tiempo de

menos de 12 meses. De acuerdo a estos estudios, la OMS sugirió este tratamiento basado en la administración durante 4 a 6 meses de kanamicina, moxifloxacina (Mfx), protionamida (Pto), clofazimina (Cfz), pirazinamida, etambutol y altas dosis de isoniacida y 5 meses de moxifloxacina, clofazimina pirazinamida y etambutol (4 - 6 Kan-Mfx-Pto-Cfz-Z-INH alta dosis / 5 Mfx-Cfz-PZA-ETB) en condiciones específicas y usadas de forma adecuada para evitar el empeoramiento de resistencia a fármacos (WHO 2016b).

Los pacientes con TB-XDR y pre-XDR se tratan habitualmente con esquemas terapéuticos que incluyen fármacos del grupo V, ya que suelen presentar resistencias a la mayoría de fármacos de los otros grupos. Por tanto, las posibilidades de que un tratamiento sea eficaz en estos casos, son menores. En los últimos años se ha demostrado que el meropenem asociado a clavulanato puede tener actividad antibacilar y que, entre ambos fármacos, podría existir una actividad sinérgica. Además, la administración durante seis meses de la bedaquilina y delamanid en pacientes con TB-XDR y pre-XDR ha sido aprobada (Lorenzo et al. 2013; Gonzalo & Drobniewski 2013; Palmero et al. 2015).

MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE SUSCEPTIBILIDAD A FÁRMACOS ANTITUBERCULOSOS

Una de las características limitantes para la determinación de susceptibilidad a fármacos antituberculosos es el lento crecimiento de *M. tb*, y como consecuencia las pruebas de susceptibilidad requieren de períodos prolongados para obtener los resultados, además varias de estas pruebas son laboriosas y en algunos casos costosas, lo cual impide que sean empleadas en países de escasos recursos económicos en donde se presenta una alta incidencia. En la actualidad, una de las pruebas empleadas desde hace más de un siglo, es la visualización microscópica de un extendido de esputo para detectar la presencia de BAAR, sin embargo esta técnica requiere de un mínimo de 10000 bacterias por mililitro de esputo y no permite determinar la susceptibilidad a los fármacos (Keeler et al. 2006).

Dada la importancia de actuar de forma rápida y efectiva ante la sospecha de estar frente a cepas de TB resistentes y gracias al conocimiento de los mecanismos genéticos

generadores de resistencias, han surgido en los últimos años nuevas metodologías basadas en biología molecular que permiten realizar la identificación de resistencias a fármacos rápidamente. Sin embargo, estas metodologías al estar basadas en biología molecular presentan costos superiores respecto a las basadas en microbiología. Esta es una limitante para ser empleadas en todas las muestras recibidas en el ámbito hospitalario, siendo necesario una selección de muestras prioritarias con antecedentes o factores de riesgo para presentar la enfermedad tuberculosa. En la Tabla 3 se describen algunas características de metodologías fenotípicas y genotípicas empleadas para la determinación de susceptibilidad a fármacos.

Tabla 3. Métodos de diagnóstico de susceptibilidad a fármacos de *M. tuberculosis*.

Métodos	Descripción	Resultados	Sensibilidad	Especificidad	Costos*
Bactec 460	Método radiométrico basado en la identificación del crecimiento de micobacterias en medios de cultivos con determinado fármaco, mediante el marcaje con C14. Este método se retiró del mercado por la contaminación generada con reactivos radioactivos	28 - 42 días 60 - 90 días	>90%	>90%	20-50
Bactec MGIT	Método fluorométrico basado en la identificación de crecimiento de micobacterias en medios con fármaco, mediante un sensor de fluorescencia sensible al consumo de oxígeno.	7 - 14 días	100% (STR,INH, RIF,ETB,PZA)	89,8% (STR) 100% (RIF)	12
MODS	Se basa en el rápido crecimiento de bacilos en placas de cultivo líquido, inoculadas con muestras de esputo y fármaco; detectando la forma de cordón de las microcolonias de TB con microscopio de luz invertido.	7 días	86,6% - 97,8% (INH,RIF)	99,6% - 100% (INH,RIF)	3 - 5

Alamar Azul	Método colorimétrico que identifica la presencia de micobacterias en medios con fármaco, con base en reacciones de óxido-reducción evidentes por el colorante alamar azul	3 – 5 semanas	89% (INH,RIF)	100% (INH,RIF)	u3 – 10
Resazurina	Similar al alamar azul, que emplea el indicador resazurina, detecta cambio de coloración de azul a rosa.	4-5 semanas	89,4% - 94% (INH,RIF)	100% (INH,RIF)	3 – 10
Nitrato Reductasa	Cuantifica la actividad de la oxidoreductasa, que reduce el nitrito en nitrato, detecta bacilos resistentes por un cambio en la coloración de rosa a rojo o violeta.	21 – 28 días (cultivo)	100% (INH,RIF)	100% (INH,RIF)	3 – 10
		7 – 18 días (esputo)	87,5% (RIF)	100% (RIF)	3-10
Fago Reportero de Luciferasa	Se basa en la identificación de micobacterias mediante la emisión de luz por luciferina, como respuesta a la infección de bacilos con fagos que tienen inserto el gen <i>fflux</i> .	1-2 semanas (cultivo)	68%-100% (INH,RIF)	73%-99% (INH,RIF)	8-10
		12 días (esputo)	97%		
Fago Reportero de GFP	Se basa en la identificación de micobacterias mediante la emisión de fluorescencia, como respuesta a la infección de bacilos con fagos que tienen inserto un gen que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP).	phAE87:: <i>hsp60-EGFP</i> 3 – 4 semanas (cultivo)	94% (INH,RIF, STR)	90% (INH) 93% (RIF) 95% (STR)	2
		Φ^2 GFP10 5 – 9 días (esputo)	85% (RIF)	85% (RIF)	
GenoType MTBDRplus	Técnica similar a LiPA, detecta resistencia a la rifampicina e isoniacida	6 horas [†]	98,7% (RIF), 92% (INH)	99,1% (INH,RIF)	30-50

Secuenciación	Método que identifica y analiza la secuencia nucleotídica de un fragmento de gen específico mediante un paquete de computo, con la finalidad de identificar mutaciones que confieren resistencia a fármacos	8 horas [†]	100%	100%	40
LiPA	Sistema colorimétrico que identifica mutaciones, basado en la hibridación reversa de fragmentos de PCR de <i>M. tb</i> biotinilados con sondas de nucleótidos colocados en línea en una tira de membrana	12 horas [†]	>95% (RIF)	100% (RIF)	45-50
SSCP	Método que identifica cepas mutadas basándose en las diferencias en la secuencia de hebras individuales de ADN en condiciones no desnaturalizantes que ocasionan diferencias en el autoplegamiento, y por lo tanto presenta diferente patrón de migración en geles de poliacrilamida en comparación con cepas sensibles.	8-12 horas [†]	88% (RIF), 80% (INH)	98% (RIF), 100% (INH)	3-6
Xpert MTB/RIF	El método Xpert MTB/RIF es una prueba de amplificación del ácido nucleico totalmente automatizada que emplea un cartucho para diagnosticar la tuberculosis y la resistencia a la rifampicina	2 horas	99,1% (RIF)	100%	100

LiPA: Ensayo de prueba en línea; **MODS:** ensayo de susceptibilidad a fármacos por observación microscópica; **SSCP:** polimorfismos conformacionales de hebra sencilla. * por muestra en US dólares, no se consideran costos derivados de manejo, gastos de personal y equipamiento. † Estos tiempos no contemplan el requerido para la obtención del aislamiento y extracción de ADN.

Varios de estos métodos representan alternativas prometedoras sin embargo requieren la adquisición de equipos y reactivos en algunas ocasiones costosos, además de personal capacitado dificultando la implementación de estas metodologías en países en donde la incidencia de la TB y su resistencia es alta. La implementación de una nueva metodología que ofrezca un tiempo de detección rápido, bioseguridad, bajo costo y alta sensibilidad y especificidad podría reducir significativamente la tasa de mortalidad y fracaso en el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad (Keeler et al. 2006).

Métodos Fenotípicos basados en el crecimiento micobacteriano

Estos métodos presentan características relevantes tales como su alta sensibilidad, especificidad y bajo costo, motivos por los cuales se ubican como las metodologías de referencia global. Sin embargo, su gran desventaja es que requieren de períodos de tiempo prolongados para generar resultados confirmatorios, factor considerado de relevancia para la atención y control de la TB resistente. Algunos métodos fenotípicos que proporcionan resultados relativamente de forma rápida han sido validados por la OMS, entre ellos se encuentran: el ensayo de MODS, alamar azul, nitrato reductasa (Moore et al. 2006; Shiferaw et al. 2007; Mengatto et al. 2006; Collins & Franzblau 1997; Chauca et al. 2007; Musa et al. 2005). Sin embargo, estos requieren al menos de una semana de cultivo en medio líquido o sólido (WHO 2010).

A continuación una breve descripción de los métodos fenotípicos empleados en el desarrollo del presente trabajo de investigación.

Método de las Proporciones

Este método descrito por Canetti y Grosset compara el número de colonias desarrolladas en medios con diferentes diluciones de fármacos, respecto a las desarrolladas en los medios sin fármaco, interpretando el resultado a través de la proporción de colonias capaces de crecer en presencia del fármaco (Canetti, 1965).

La interpretación de los resultados se realiza empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Proporción de bacilos resistentes} = \frac{\# \text{ de colonias en placa con droga} \times 100}{\text{Promedio del \# de colonias en placas sin droga (control)}}$$

La proporción obtenida es comparada con la proporción crítica establecida para cada fármaco (1%). Por debajo de esta proporción la cepa se considera susceptible y si la proporción es igual o superior se considera resistente (Cambau 2016).

El método de proporciones es considerado el método de referencia para determinar la susceptibilidad/resistencia a INH, RIF, ETB y STR; entre las ventajas del método se destaca su alta reproducibilidad y su bajo costo (Cambau E, 2016). Sin embargo la gran desventaja es que toma mucho tiempo para obtener los resultados, un promedio de 45 a 60 días a partir de aislamientos primarios de *M. tb*. Este largo período se debe a que la muestra del paciente primero es cultivada, y si el cultivo es positivo, se realiza la prueba de susceptibilidad (Piffardi S, 2004). En el caso de emplear el medio de Löwenstein-Jensen (LJ), como base para el método de las proporciones, el procedimiento resulta más laborioso; además este medio coagula a una temperatura más elevada (90°C) lo que puede alterar las propiedades de los antimicrobianos. La complejidad inherente a estos métodos, pero sobre todo los requerimientos de personal y las medidas de contención necesarios para llevarlos a cabo, los ha relegado históricamente a los centros de referencia.

Inicialmente la técnica se diseñó para su utilización en medio LJ y para los fármacos de primera línea, exceptuando la PZA. Posteriormente el método de las proporciones ha sido adaptado a diferentes medios de cultivo y en Estados Unidos se estandarizó para los medios Middlebrook 7H10 y 7H11, suplementados con OADC y glicerol y dispensados en placas compartimentadas. Las concentraciones de antibióticos utilizadas varían en algunos casos dependiendo del medio de cultivo empleado (Vega et al. 2016).

Resazurina

Es un método colorimétrico que emplea la resazurina, un reactivo indicador de óxido-reducción. Este indicador cambia de color azul cuando está en su estado oxidado a rosado frente a un ambiente reductor como el generado durante el metabolismo celular, el cambio de color es detectado visualmente. Esta metodología ha sido utilizada para medir la viabilidad de *M. tb* luego de la exposición a fármacos usados en el tratamiento de la TB (Martin et al. 2007; Martin et al. 2006).

Es una técnica económica, sencilla y con buenos resultados de sensibilidad y especificidad; entre sus inconvenientes se encuentra la producción de aerosoles debido al empleo de cultivos en medio líquido. La principal ventaja de esta técnica es su bajo costo y la fácil disponibilidad de adquirir los reactivos, por lo que bien podría usarse en los programas de control de TB en países con escasos recursos económicos. (Patil et al. 2014; Calef et al. 2013; Palomino et al. 2002; Urbanczik et al. 2004).

MGIT 960

Este método fenotípico se fundamenta en el uso de un compuesto indicador fluorescente que está incluido en una silicona que recubre el fondo del tubo. Este compuesto fluorescente es sensible a la presencia de oxígeno disuelto en el medio (Pfyffer et al. 1997). Inicialmente, la cantidad de oxígeno presente impide ver la fluorescencia, pero como consecuencia del metabolismo bacteriano, el oxígeno es consumido, permitiendo que la fluorescencia del indicador sea visible al iluminar el tubo desde la parte inferior con una lámpara de luz ultravioleta (UV) de 365nm o UV de onda larga (Martin et al. 2009; Goh & Rastogi 2010; Fonseca et al. 2012; Pfyffer et al. 1997).

Esta metodología reporta una sensibilidad del 100% para los fármacos de primera línea y un rango de especificidad del 89 – 100%, el tiempo promedio para obtener los resultados es de 7 días con el método directo y 10 días adicionales por el método indirecto. El método directo se basa en el uso de la muestra de esputo directamente previo proceso

de descontaminación, mientras que el método indirecto requiere realizar un cultivo previo de la muestra de esputo. Algunas de las desventajas es el requerimiento de personal capacitado y los altos costos de inversión en el equipo, materiales y reactivos (Pfyffer et al. 1997; Bemer et al. 2002).

Metodologías basadas en el empleo de bacteriófagos

Los bacteriófagos son virus que infectan bacterias, éstos pueden tener un rango de huésped limitado como es el caso de los micobacteriófagos que infectan de forma específica a las bacterias del género *Mycobacterium spp* (van der Merwe et al. 2014; Fu et al. 2015).

Sin embargo, existen otros que son aún más específicos como es el caso del micobacteriófago DS6A, es el único bacteriófago que sólo forma placas de lisis en miembros del complejo *M. tb*; sin embargo se demostró que puede infectar micobacterias no tuberculosas (McNerney & Traoré 2005; Mayer et al. 2016).

Las características que presentan los micobacteriófagos los ha convertido en excelentes candidatos para el estudio y manipulación genética de las micobacterias además de las potenciales aplicaciones que representan para el control de la TB (Graham F Hatfull 2012; Hatfull 2010).

Las metodologías basadas en el empleo de fagos, se fundamentan en la habilidad que presentan de infectar y replicarse en bacilos de *Mycobacterium spp* viables, algunas de estas metodologías se basan en el empleo de micobacteriófagos termosensibles, es decir que infectan a 37°C pero sólo lisan a las bacterias a 30°C. En la actualidad se han descrito tres metodologías basadas en el uso de fagos para la detección de *M. tb*, algunas de ellas han demostrado su utilidad en el ámbito hospitalario: ensayo de amplificación de fagos, fagos reporteros de luciferasa y fagos reporteros de genes (Carriere et al. 1997; Banaiee et al. 2001; Símboli et al. 2005; Traore et al. 2007; Piuri et al. 2009; Rondón et al. 2011; De La Iglesia et al. 2009; Urdániz et al. 2016).

En la Figura 4, se esquematiza de forma general las diferentes etapas del ciclo de replicación de éstos micobacteriófagos, las cuales son comunes a otros virus bacterianos.

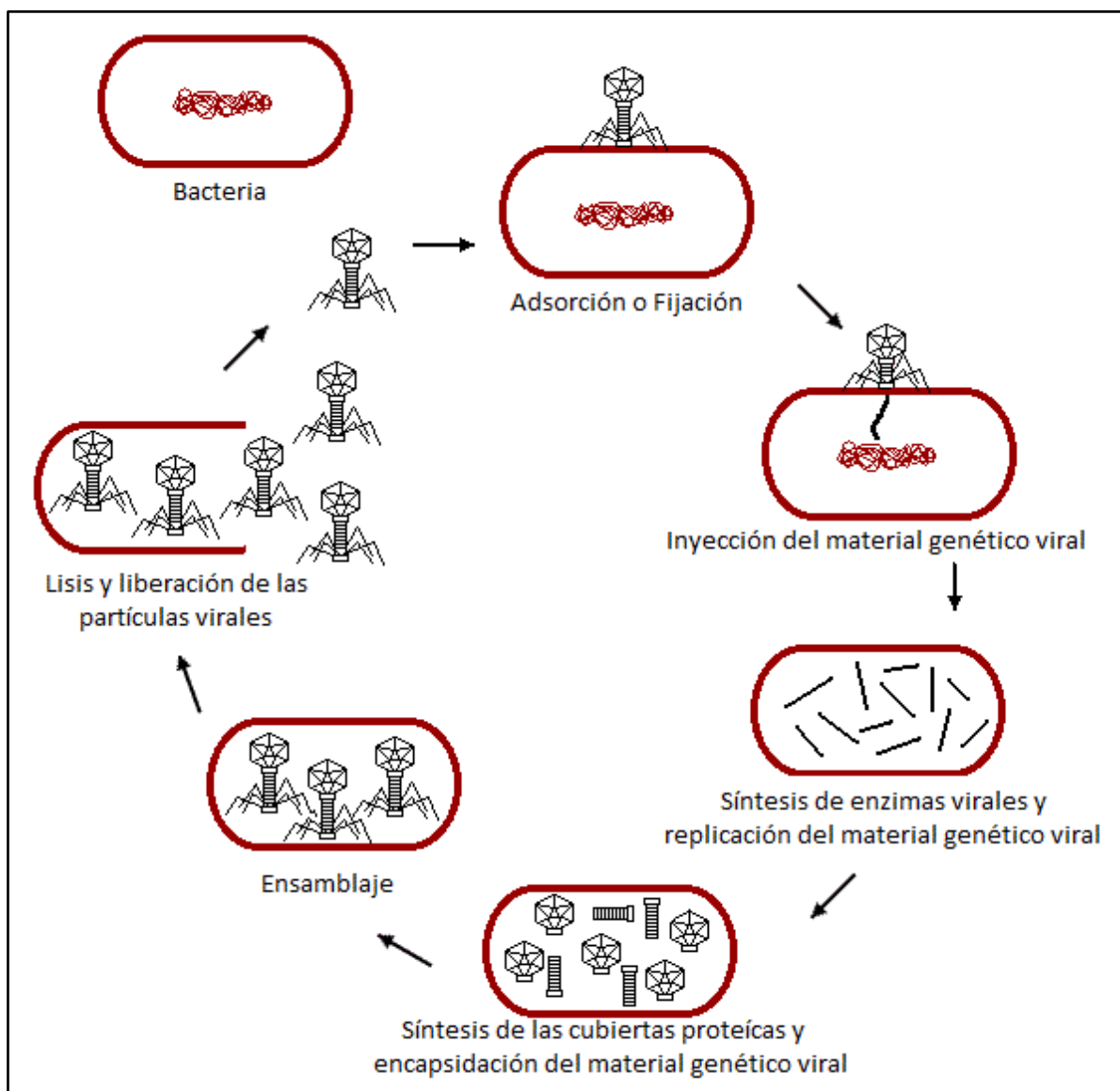


Figura 4. Etapas de la replicación de bacteriófagos de ciclo lítico.

Amplificación de Fagos

En el ensayo de amplificación de fagos, se emplea el micobacteriófago D29 que presenta la habilidad de infectar micobacterias de crecimiento lento como *M. tb*. Este es capaz de replicarse en el interior de estas micobacterias, provocando la lisis de la bacteria y la liberación por ende de la nueva progenie de fagos. En el ensayo, los fagos exógenos que no infectaron a la bacteria son inactivados por tratamiento químico mientras que el número de fagos endógenos, el cual es un indicador del número de células viables de *M.*

tb, es determinado después de ciclos de infección, replicación y liberación en una placa indicadora que contiene *M. smegmatis*; los resultados se obtienen en 24-48 horas a través de la aparición de zonas claras o lisis.

Este método se emplea además directamente en aislados de *M. tb* para realizar pruebas de susceptibilidad a fármacos, de tal forma que después de la exposición a un fármaco, las bacterias sensibles no sobreviven inhibiendo la replicación del bacteriófago. Por el contrario bacterias resistentes al fármaco favorecen la replicación del fago visualizándose a simple vista la aparición de placas líticas (Seaman T, 2003; Hazbón, 2004; McNerney, *et al.*, 2004; Kalantri, *et al.*, 2005). Esta metodología requiere una extensa manipulación de la muestra y de persona con conocimientos básicos en técnicas microbiológicas, en la Figura 5 se representa el fundamento de esta metodología.

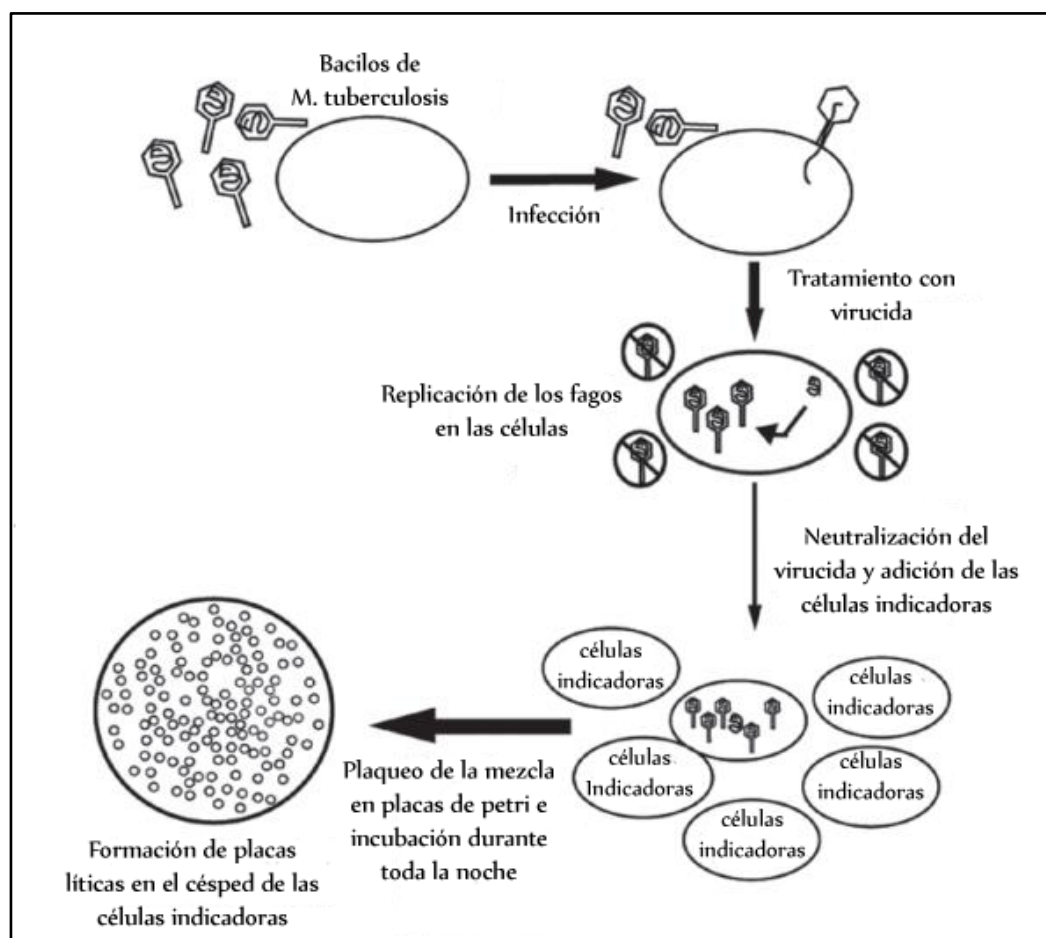


Figura 5. Metodología FASTPlaqueTB (Fu et al. 2015)

Esta metodología puede ser realizada de manera "casera" o se encuentra disponible comercialmente – *FASTPlaque, Biotech Labs Ltd* -, fue descrito por primera vez en el año 1997. Además, existe una versión llamada *M. tb* FASTPlaque-RIF®, que permite determinar la resistencia a rifampicina en 48 horas a partir de un cultivo positivo (Seaman et al. 2003; Takiff & Heifets 2002; Albert et al. 2007).

Se ha reportado que esta metodología presenta una sensibilidad de 29-87% y una especificidad de 60-88% en pacientes con baciloscopia positiva. En casos de baciloscopia negativa la sensibilidad es de 13-78% y especificidad de 89-99%. En la actualidad esta metodología ha sido discontinuada, probablemente por los requerimientos necesarios para la manipulación de organismos vivos potencialmente patógenos, además de los requerimientos en el personal capacitado e infraestructura necesaria (Pai et al. 2005).

Fagos Reporteros de Luciferasa

La bioluminiscencia ofrece un sistema reportero para estudios de la adaptación y sobrevivencia bacteriana que implica una relación directa entre el metabolismo bacteriano y la emisión de la luz. Algunas limitaciones de estos marcadores, como lo es la luciferasa, incluyen su dependencia sobre la concentración de la adición del sustrato, el estado fisiológico de la bacteria y la inestabilidad de la enzima luciferasa (Nunes-halldorson & Duran 2003). La catálisis de la luciferasa de la luciérnaga es una reacción que produce una luz visible en un rango de 550-575nm, con un pico máximo de 595nm. La luciferasa requiere la adición de un sustrato exógeno (luciferina) para que pueda producirse la reacción y por ende la emisión de luz (Andrew & Roberts 1993).

El desarrollo de estos micobacteriófagos que han sido modificados genéticamente para que acarreen en su genoma el gen de la luciferasa de luciérnaga (*fflux*) detecta la presencia de *M. tuberculosis*. Estos bacteriófagos reporteros presentan la característica de ser termosensibles, esto indica que infectan a las bacterias a 37°C para que se acumule la señal dentro de ellas pero solamente lisan a 30°C, condición importante que permite su amplificación (Jacobs et al. 1993; Banaiee et al. 2001; Banaiee et al. 2003).

Esta metodología se fundamenta en la infección de las micobacterias, y una vez en su interior, el fago expresa el gen *fflux* sólo en las células metabólicamente activas, las cuales emiten luz como consecuencia de los fotones liberados por reacciones dependientes de ATP (Adenosina Trifosfato). De esta forma los fotones pueden ser detectados por un luminómetro (Hernando & Hazbón 2004; Hazbon et al. 2003; Bardarov et al. 2003). El ATP es elemento clave de la actividad vital de las bacterias, de tal manera cuando bacterias sensibles son sometidas a la acción de fármacos, mueren y por ende no se produce ATP, inhibiéndose la producción de luz. En ensayos de susceptibilidad a fármacos, la producción de luz es interpretada como la presencia de bacilos resistentes al fármaco antituberculoso evaluado, debido a que la replicación del micobacteriófago solo ocurre en bacterias viables de ahí que esta metodología puede ser usada como prueba de susceptibilidad.

Fagos Reporteros de Genes Fluorescentes

Las proteínas fluorescentes, en particular los derivados de la GFP (Green Protein Fluorescent), son ampliamente utilizados en sistemas micobacterianos para diversas aplicaciones (Carroll et al. 2010; Jiang et al. 2013; Gall & Barker 2006; Zelmer et al. 2012; M Chalfie et al. 1994). Numerosas variantes de proteínas fluorescentes han sido desarrolladas, varias de ellas son variantes de la GFP obtenida de la medusa *Aequorea victoria* (Chalfie et al. 1994; Tsien 1998) o de la proteína roja fluorescente DsRed obtenida del coral *Discosoma sp.* (Gross et al. 2000).

Existe una gran variedad de proteínas fluorescentes disponibles, cada una de ellas con características específicas en cuanto a las longitudes de onda tanto de excitación como de emisión, a su expresión como monómeros o dímeros, a su estabilidad, y capacidad de respuesta a condiciones de pH o redox (Shaner et al. 2004; Müller-taubenberger & Anderson 2007; Lukyanov & Belousov 2014; Poëa-guyon et al. 2013).

Teniendo en cuenta todas las ventajas que las proteínas fluorescentes ofrecen, en el 2009 Piuri y colaboradores reportaron la construcción de micobacteriófagos termosensibles reporteros de GFP y ZsYellow para ser empleados en el diagnóstico de resistencia de *M.*

tb. Estos fagos reporteros, acarrean genes que codifican para la expresión de proteínas fluorescentes permitiendo determinar fácilmente el estado metabólico de las bacterias y por lo tanto su respuesta a diferentes fármacos; las micobacterias viables que son infectadas por el fago expresan la proteína fluorescente permitiendo detectar los bacilos por microscopía de fluorescencia o citometría de flujo como se observa en la Figura 6 (Piuri et al. 2009; Jain et al. 2012).

Esta metodología presenta varias ventajas en comparación con los fagos reporteros de luciferasa, ya que no se requiere la adición de sustrato, es posible identificar bacilos aun cuando la cantidad es de 100 en la muestra, permite la detección de cepas resistentes a los fármacos en poblaciones mixtas y la fijación con paraformaldehído luego de la infección permite manipular y trasladar la muestra de forma segura (Piuri et al. 2009; Rondón et al. 2011).

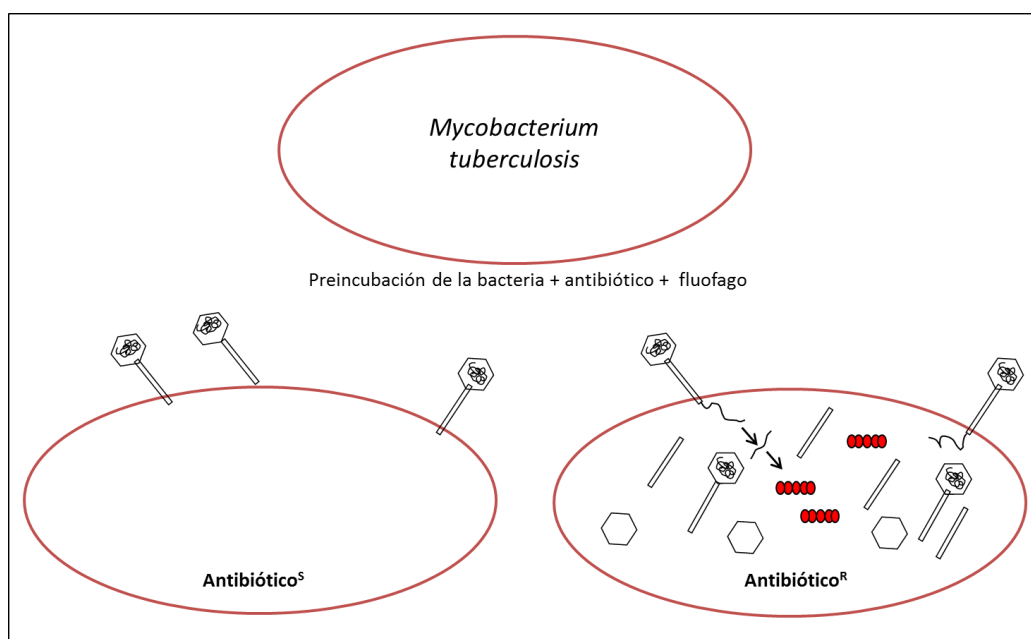


Figura 6. Representación esquemática del empleo de micobacteriófagos reporteros de genes fluorescentes.

En la actualidad existen adaptadores para fluorescencia que emplean lámparas DEL (Diodos Emisores de Luz) de bajo costo y que se han convertido en un recurso en países en desarrollo, esto facilita la implementación de la microscopía de fluorescencia como método de diagnóstico (Anthony et al. 2006; Marais et al. 2008). Otro de los avances se

basa en la construcción de un microscopio de fluorescencia incorporado a un teléfono celular con excitación DEL, para el que se ha descrito su utilidad en la toma de imágenes de *M. tb* en muestras de esputo teñidas con auramina (Breslauer et al. 2009).

Estudios previos han reportado una sensibilidad del 94% y una especificidad superior al 90% evaluando los fármacos INH, RIF y STR usando aislamientos de muestras clínicas. Los resultados son obtenidos entre las 48 – 72 horas sin tener en cuenta el tiempo de crecimiento del cultivo y los costos al emplear las metodologías basadas en el empleo de micobacteriófagos son menores a 2 dólares por muestra (Rondón et al. 2011). O'Donnell y colaboradores reportan que además de la microscopía de fluorescencia, la citometría de flujo permite la identificación de bacilos fluorescentes posterior al proceso de infección con fagos reporteros (O'Donnell et al. 2015).

Métodos Genotípicos

El conocimiento de las bases moleculares de la resistencia a los fármacos, así como la disponibilidad de nuevas técnicas de biología molecular, ha permitido el desarrollo de diferentes métodos genotípicos para la detección rápida de resistencia a los fármacos antituberculosos. La aplicación de estos métodos ha sido posible, entre otras cosas, gracias a la secuenciación del genoma de *M. tb*, y la identificación y caracterización de genes asociados a la resistencia a fármacos. Entre las características con mayor relevancia que ofrecen estos métodos se encuentran la alta sensibilidad en muestras con baja carga bacilar y el corto tiempo requerido para realizar el diagnóstico, ya que algunas de ellas permite reducir el tiempo relacionado con el crecimiento del cultivo (Teo et al. 2011; Rufai et al. 2014; Mboowa et al. 2014; Rahman et al. 2016; Garberi et al. 2011; Faksri et al. 2015; Sales et al. 2014; Nice et al. 2016).

Las metodologías del Xpert y MTBDRplus permiten determinar la resistencia a rifampicina en tiempos cortos y su empleo ha sido recomendado por la OMS (WHO 2011; Ocheretina et al. 2014; Rahman et al. 2016). Sin embargo, adicional a los costos que estas metodologías representan, este tipo de métodos moleculares sólo detecta resistencia a

nivel genotípico pudiéndose encontrar discrepancias entre estos resultados y los fenotípicos (Ocheretina et al. 2014). Una de las desventajas de los métodos genotípicos es que no permiten discriminar entre células viables y no viables por lo que no es posible seguir la evolución de un tratamiento, además en una proporción de aislamientos clínicos la resistencia a fármacos no puede ser explicada por la presencia de mutaciones genéticas en los genes esperados (Louw et al. 2009). Entre las ventajas que presenta la metodología del Xpert MTB/RIF es el corto tiempo para diagnosticar la enfermedad y la resistencia a RIF (2 horas), además el proceso está automatizado en todas sus etapas incluyendo la extracción de ácidos nucleicos, por lo que la manipulación de la muestra y el tiempo que se tarda en obtener un resultado son mínimos, además presenta una alta sensibilidad al amplificar secuencias específicas del gen *rpoB* (Blakemore et al. 2010; Helb et al. 2010).

RESULTADOS PREVIOS E HIPOTESIS DE TRABAJO

La resistencia a fármacos en cepas de *M. tb* es un grave problema de salud pública a nivel mundial debido a la aparición de cepas TB-MDR, y TB-XDR; siendo este uno de los factores que dificulta el manejo y control clínico de la enfermedad.

La característica limitante para el diagnóstico temprano de la enfermedad y a su vez para la determinación de susceptibilidad a fármacos, es el lento crecimiento de *M. tb*, como consecuencia de esto se requiere de varias semanas para proporcionar los resultados de susceptibilidad/resistencia cuando se emplean métodos fenotípicos.

En los últimos años se han desarrollado alternativas prometedoras pero requieren de la adquisición de equipos y reactivos costosos, además de personal capacitado. Esto dificulta la implementación de estas metodologías en países con escasos recursos económicos.

Recientemente se ha reportado la construcción de un nuevo grupo de micobacteriófagos reporteros de *gfp* o *ZsYellow*, para determinar los patrones de susceptibilidad en cepas de *M. tb*. Las construcciones realizadas demostraron su utilidad para discriminar entre cepas

sensibles y resistentes a fármacos en cultivos provenientes de aislamientos clínicos validando su empleo fuera del laboratorio de investigación. Estudios previos demuestran la rapidez del método en proporcionar resultados de los patrones de resistencia a RIF y STR en 24 horas, además esta metodología demostró la capacidad de detectar menos de 100 bacilos en una muestra (Piuri et al. 2009; Rondón et al. 2011).

Dada la importancia de actuar de forma rápida y efectiva ante la sospecha de estar frente a cepas de *M. tb* resistente a fármacos, se plantea evaluar FluoFagos de segunda generación para detección y determinación de susceptibilidad a antibióticos en *M. tb* directamente en muestras clínicas. Se espera que esta nueva generación permita identificar de forma segura, económica y en menor tiempo la presencia de bacilos viables en las muestras y a su vez permita determinar la resistencia a la RIF, antibiótico de importancia ya que es marcador principal de otras resistencias asociadas. La rápida detección permitirá implementar regímenes terapéuticos adecuados que conlleven a interrumpir la diseminación de la enfermedad y de cepas resistentes, además se considera que puede ofrecer un seguimiento de la respuesta al paciente ante el tratamiento instaurado.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y validar nuevas metodologías basadas en el uso de FluoFagos para la detección y testeo de susceptibilidad a antibióticos en *Mycobacterium tuberculosis*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo 1. Incorporación de “tags” en la cápside del FluoFago para su empleo en la captura de complejos fago-micobacteria.

Objetivo 2. Evaluación de diferentes parámetros de importancia en el proceso de infección con FluoFagos (protocolos de descontaminación, pH, estados metabólicos, seguimiento de fluorescencia en el tiempo, tiempo de fijación con PFA).

Objetivo 3. Comparar la *performance* de FluoFagos para la detección y determinación de resistencia a rifampicina en muestras clínicas (esputos).

Objetivo 4. Estudio de las características clínico-epidemiológicas de la población participante en el presente estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación tuvo dos fases que se llevaron a cabo en el Laboratorio de Bacterias Gram positivas, sus Fagos y Estrés del Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires y el Laboratorio de Bacteriología de la TBC del Instituto de Tisioneumonología Dr. Raúl Vaccarezza – Hospital Muñiz de la ciudad de Buenos Aires.

CEPAS Y MEDIOS DE CULTIVO

Para la realización del presente trabajo se emplearon las siguientes cepas bacterianas:

- *Mycobacterium smegmatis* mc²155: Es una especie de crecimiento rápido, no patógena, comparte la misma estructura de la pared celular poco común de *M. tb* y otras especies micobacterianas. Esta cepa puede ser transformada de 10 a 10000 veces más eficientemente por electroporación con vectores plasmídicos (Snapper et al. 1990).

La cepa de *M. smegmatis* mc²155 se cultivó a 37°C y 200 rpm (revoluciones por minuto) en medio Middlebrook 7H9 (Difco), suplementado con 10% de ADC y 0,05% (vol/vol) de Tween 80. Para el crecimiento en medio sólido se emplearon los mismos requerimientos descritos anteriormente más la adición de 1,5% de agar bacteriológico. La adición de tween en los medios fue omitido cuando los cultivos fueron usados para ser infectados por los FluoFagos.

- *Mycobacterium tuberculosis* mc²6230 Kan^R: Esta cepa fue cordialmente cedida por el Dr. Jacobs (Albert Einstein College of Medicine, USA). Es derivada de *M. tb* H37Rv y tiene una delección de la región RD1 y *panCD*, resultando en un fenotipo atenuado y pan⁻ (solo crece en presencia de ácido pantoténico aportado exógenamente) que permite su manipulación en un nivel de bioseguridad 2 (Sambandamurthy & Jr 2005; Sambandamurthy et al. 2002).

Esta cepa se creció en medio Middlebrook 7H9 (Difco) suplementado con 10% (v/v) de OADC (Becton, Dickinson and Company), 0.2% (v/v) de glicerol, 0.05% (v/v) de tween y ácido pantoténico (100µg/ml) e incubada a 37°C sin agitación. Para el crecimiento en medio sólido se usó el medio Middlebrook 7H11 suplementado de la misma manera descripta para el cultivo en líquido (Vilchèze et al. 2013).

- Aislamientos de micobacterias atípicas y *Mycobacterium tuberculosis* a partir de muestras clínicas: Los aislamientos de las cepas micobacterianas provenientes de muestras clínicas fueron crecidas en medio Middlebrook 7H9 (Difco) suplementado con 10% (v/v) de OADC (Becton, Dickinson and Company), 0.2% (v/v) de glicerol y PANTA (polimixina B, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprima, azlocilina) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante; y el medio Löwenstein-Jensen (LJ) fue empleado para realizar los cultivos en medio sólido. Las incubaciones se realizaron a 37°C sin agitación.
- *Escherichia coli* JM109: Es un huésped útil para la transformación de vectores y para la producción de ADN monocatenario a partir de vectores M13 o fagémidos. La mutación A de la endonucleasa conlleva a la obtención de un mejor rendimiento y calidad del ADN plasmídico. Esta cepa es deficiente en la actividad de β-galactosidasa debido a deleciones en copias genómicas y episómicas del gen lacZ.
- El genotipo de esta cepa presenta: endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (rk-, mk +), relA1, supE44, Δ (lac-proAB), [F'traD36, proAB, laqIqZΔM15].

Para el crecimiento de esta cepa bacteriana se emplea el medio de cultivo Luria Bertani (LB) que contiene peptona de caseína y extracto de levadura que proporciona al medio los nutrientes necesarios para el desarrollo óptimo y el cloruro de sodio que mantiene el equilibrio osmótico.

PLÁSMIDOS, FÁSMIDOS Y FAGOS

- *phAE87::hsp60-EGFP*

Es un fásmido *ph101::pYUBb328* mutante termosensible derivado del fago TM4, infecta pero no lisa las células a 37°C presenta una inserción de reportero *EGFP* (Carriere et al. 1997; Piuri et al. 2009).

- *pJV53*

Es un plásmido *shuttle*, presenta resistencia a la kanamicina, *oriM*, *oriE*, funciones de recombinering para *Mycobacterium* spp., esta plásmido tienen los genes *gp60* Y *61* del micobacteriófago Che9c (van Kessel et al. 2008; van Kessel et al. 2007).

- *pNIT gp9-StrepTag*

Es un plásmido de expresión de 7140pb empleado para transformar células electrocompetentes de *M. smegmatis*, confiere resistencia a la kanamicina y es inducible con ϵ -caprolactam, (Pandey et al. 2009). Contiene el gen que codifica para *gp9* (proteína mayoritaria de la cápside de TM4 fusionado a un StrepTagII en el C-terminal de la proteína resultante).

- Φ *mCherry_{bomb}*

Este FluoFago acarrea un gen reportero -*mCherry_{bomb}*- cuya expresión ha sido optimizada para micobacterias. Estos nuevos fagos reporteros presentan una mayor sensibilidad y un menor tiempo para la detección de la señal en *M. tb* (Urdániz et al. 2016).

OLIGONUCLEÓTIDOS

Primer	Secuencia 5' a 3'	Característica
1	ACAAGACGCCGGTCGCCGTCGTGGCA CCGGCTGCCagcgcttggagccacccgcagtt cgaaaaTAGTGCGCTATCGCCACGCCT TGACGGGGGCGGTT	Templado para generar sustrato, contiene una secuencia que codifica para el STAG II, presenta 35pb de homología con el 3'de gp9 y el 5'de gp10 del micobacteriófago TM4.
2	CGCCCTGCGGCTCAAGGCGCGGTTTCG CCTACGTGCTGGGTGTGAGCGCGACC GCTCAGGGCGCCAACAAGACGCCGGT CGCCGTC	Oligonucleótido iniciador sentido para extensión de homología del sustrato
3	TACCGGGTCCAGTTGTCGTCGCCCTCG ACGAGGGCGGCCAGCAGGGTGCCCTC ACGCACCCCGATAACCGCCCCGTCAA GGCGT	Oligonucleótido iniciador antisentido para extensión de homología del sustrato
4	GCTTGGAGCCACCCGAGTTC	Oligonucleótido iniciador sentido para detectar la presencia de la inserción hibridando en la región del STAG II
5	GACCGCAACCATGCCGGTGCGG	Oligonucleótido iniciador antisentido que hibrida en la región de la secuencia de gp10 (río abajo de gp9 en el genoma del TM4)
gp9STAGF	AATCCATATGGCTGACATTTACGCG CC	Contiene un sitio de corte NdeI
gp9STAGR	TTACAAAGCTTCTATTTTTCGAACTGC GGGTGGCT	Contiene un sitio de corte HindIII

PREPARACIÓN DE CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES DE *E. coli* JM109

Para la obtención de células competentes de *E. coli* se inoculó una colonia de JM109 en 3 ml de LB y se incubó toda la noche a 37°C a 200 rpm. Este cultivo se utilizó para inocular 30 ml de medio LB, partiendo de una densidad óptica (DO_{600nm}) inicial de 0,05. Se incubó a 37°C en agitación hasta alcanzar una DO_{600nm} entre 0,7 – 0,8. Una vez alcanzado el crecimiento se procedió a incubar durante 10 minutos en hielo y se obtuvo el pellet mediante centrifugación (10 min a 4000 rpm a 4°C), el pellet se lavó tres veces con 30 ml de glicerol 10% m/v en agua miliQ. Finalmente las células se resuspendieron en aproximadamente 1 ml de la misma solución de lavado, las células se separaron en alícuotas de 50 μ l y se conservaron a -70°C hasta su uso.

PREPARACIÓN DE CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES DE *M. smegmatis* mc²155

Para la obtención de células competentes de *M. smegmatis* se usó un precultivo para inocular 100 ml de medio Middlebrook 7H9 suplementado con 10% de ADC y 0,05% de tween 80, la $D.O_{600nm}$ inicial de 0,05 y se incubó a 37°C a 200rpm hasta alcanzar una $D.O_{600nm}$ entre 0,8 y 1,0. Cuando el cultivo alcanzó el crecimiento requerido se incubó en hielo durante 30 minutos y el pellet fue obtenido por centrifugación (10 min a 4000 rpm a 4°C), posteriormente se realizaron 3 lavados con glicerol 10% m/v en agua miliQ, los volúmenes utilizados para lavar fueron disminuyendo entre lavado y lavado. Finalmente, las células se resuspendieron en 1 ml de glicerol 10% y se hicieron alícuotas para conservar a -70°C hasta su uso.

TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES

Para realizar la electroporación se adicionaron entre 50 – 100 nanogramos (ng) de ADN a una alícuota de células electrocompetentes y se dejó reposar en hielo durante 10 minutos. Posteriormente, la mezcla se pasó a una cubeta de electroporación (No. catálogo 1652086 de BIO-RAD) estéril y previamente enfriada. La electroporación se

efectuó dando un pulso usando un electroporador de la marca BioRad usando las siguientes condiciones:

- *E. coli*: 200 Ohms, 25 μ F y 2,5 kV
- *M. smegmatis*: 1000 Ohms, 25 μ F y 2,5 kV

Una vez electroporadas las células se resuspendieron en 1 ml de medio de cultivo LB y Middlebrook 7H9 para *E. coli* y *M. smegmatis*, respectivamente y se dejaron recuperar a 37°C con agitación durante 1 hora para *E. coli* y 3 horas para *M. smegmatis*. Transcurrido el tiempo de recuperación se plaquearon e incubaron en el medio correspondiente en presencia del antibiótico indicado para realizar la selección del ADN transformante.

ENSAYOS PARA LA INCORPORACIÓN DE TAGS EN LA CÁPSIDE DEL FLUOFAGO

Ensayos de BRED

La inserción de un Strep-tag II (STAG II) al extremo C-terminal de gp9 del micobacteriófago phAE87::*hsp60-EGFP* - Φ gfp- se realizó utilizando la estrategia de *BRED* (Bacteriophage Recombineering of Electroporated DNA), esta metodología permite la modificación de genomas de bacteriófagos y fue descrita por Marinelli y colaboradores (Marinelli et al. 2008; Mariana Piuri et al. 2009).

El sustrato de 230 pares de bases (pb) presenta homología en 100pb en el extremo 3' de gp9 del bacteriófago TM4, fue diseñado usando el oligonucleótido 1 que contiene la secuencia codificante para el STAG II y adicionalmente tiene la secuencia que codifica para dos aminoácidos que sirven de unión. Río arriba y río debajo de esa secuencia contiene 35 nucleótidos con homología al 3' de gp9 y 5' de gp10, respectivamente.

Los oligonucleótidos iniciadores 2 y 3 fueron usados y éstos se superponen con 20 bases a cada lado y permiten aumentar la homología a las regiones mencionadas en el sustrato final. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó mezclando 10ng de 100-mer

y 25pmol de 85-mers en 100µl de la mezcla de PCR y se usó la DNA polimerasa (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). El producto de PCR que es un sustrato de 230 pb, fue purificado del gel usando el kit de extracción QIAquick (Qiagen).

Un cultivo de *M. smegmatis* mc²155 (pJV53) fue crecido y se indujo para recombinación como esta descrito (van Kessel et al. 2007). El DNA de phAE87::*hsp60-EGFP* y el sustrato obtenido fueron coelectroporados usando las células electrocompetentes, las células se recuperaron durante 2 horas a 30°C y se plaquearon en un ensayo de centros infecciosos. La búsqueda en placas líticas para detectar la presencia de la inserción se realizó mediante PCR utilizando el oligonucleótido iniciador sentido 4 que se hibrida al STAG II y el oligonucleótido iniciador antisentido 5 que se hibrida a la secuencia de gp10 que se encuentra *rio abajo* de gp9 en el genoma de TM4 originando un amplicon de 500pb en el fago modificado.

Construcción de un plásmido que expresa el STAG-gp9 de TM4

El gen que codifica para la proteína mayoritaria de la cápside - gp9 - del bacteriófago TM4 que contiene el Strep-tag se clonó en el plásmido pNIT que es un vector de expresión inducible con nitrilo (Pandey et al. 2009). El ADN de las placas primarias positivas del experimento de BRED fueron usadas como templado para hacer la PCR usando los oligonucleótidos iniciadores gp9STAGF que contiene un sitio de corte NdeI y gp9STAGR que contiene un sitio de corte HindIII, el producto se digirió con las enzimas de restricción NdeI – HindIII y se clonó en pNIT digerido con las mismas enzimas de restricción.

El plásmido resultante (pNIT gp9-StrepTag) de 7140pb, se usó para transformar células electrocompetentes de *Mycobacterium smegmatis* mc²155 y posterior a la incubación durante 3 días a 37°C se obtuvieron colonias resistentes a kanamicina. Los clones resistentes a kanamicina fueron crecidos usando medio Middlebrook 7H9 suplementado con ADC hasta alcanzar una densidad óptica a 600nm de 0.3, en este punto se realizó la inducción con 28mM de ε-caprolactam (Sigma, St. Louis, MO). La expresión de STAG-gp9 a distintos tiempos se comprobó mediante Western Blot usando un anticuerpo

monoclonal anti-STAG conjugado a la HRP – Horse Radish Peroxidase (StrepMAB classic-HRP, IBA GmbH, Goettingen, Germany) y se reveló usando el sustrato quimioluminiscente ECL (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL). Para realizar la amplificación y purificación de ADN de pNIT gp9-StrepTag se usaron células competentes de la cepa de *E. coli* JM109 y el kit de extracción Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (No. Catalago A1330 de Promega).

Preparación de stocks de FluoFagos: *phAE87::hsp60-EGFP* (Φ gfp), Φ STAG-gfp y Φ mCherry_{bomb}

Los stocks de FluoFagos fueron preparados en ensayo de placa. Se empleó la cepa de *Mycobacterium smegmatis* mc²155 para la amplificación de los fagos Φ gfp y Φ mCherry_{bomb} y la cepa de *M. smegmatis* mc²155 (pNIT gp9 – STAG) para la amplificación del fago Φ STAG-gfp. Los cultivos bacterianos se crecieron en medio Middlebrook 7H9 suplementado con 10% ADC hasta alcanzar una D.O_{600nm} 1, caso contrario con la cepa *M. smegmatis* mc²155 (pNIT gp9 – STAG) que se dejó crecer hasta una D.O_{600nm} 0.3 y en este punto se realizó la inducción con ϵ -caprolactam 28mM. Cuando las células alcanzaron una D.O_{600nm} 1, se infectaron con los FluoFagos correspondientes dejando por un tiempo de 15 minutos aproximadamente a temperatura ambiente para que se diera el proceso de adsorción. Posteriormente a la mezcla de bacteria - fago se le adicionó top agar y se sirvieron en placas de Middlebrook 7H10, cuando se amplificó el fago Φ STAG-gfp al top agar se le adicionó ϵ -caprolactam y se sirvieron en placas de Middlebrook 7H10 + kanamicina (25 μ g/ml).

La relación fago - bacteria se realizó con el fin de obtener aproximadamente entre 5000 a 10000 placas de lisis por placa de 150mm. Las placas de lisis fueron visualizadas después de incubar durante 48hs a 30°C, posteriormente las placas se inundaron con 10ml de buffer fago y se dejaron en reposo durante toda la noche a 4°C. Después de este tiempo, el buffer se colectó y se centrifugó para eliminar los restos de bacterias y agar. El sobrenadante obtenido se filtró utilizando una unidad de filtro Stericup (EMD Millipore, Billerica, MA), el sobrenadante filtrado se ultracentrifugó a 22000rpm utilizando un rotor

SW28 en una ultracentrífuga Beckman XL-90 para concentrar el fago. El pellet obtenido posterior a la ultracentrifugación se resuspendió en buffer fago y se calculó su título en un ensayo de gota, obteniendo títulos de $10^{10} - 10^{11}$ UFP/ml

Titulación de micobacteriófagos – Ensayo de gota

La titulación de los stocks de micobacteriófagos se realizó en ensayo de gota para determinar las UFP/ml (Unidades Formadoras de Placas) . Para ello, 100µl de un cultivo de *M. smegmatis* mc²155 se usaron como células indicadoras por placa mezclando con 4 ml de top agar; esta mezcla se vertió sobre una placa que contenía medio Middlebrook 7H9 agar. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas al décimo del stock de micobacteriófago a titular y se sembraron 10µl de cada dilución. Se incubó durante 48 horas a 30°C, seguidamente se determinó el título del stock de la siguiente forma:

$$\text{Título} \left(\frac{\text{UFP}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{número de placas líticas}}{\text{dilución utilizada} \times \text{volumen del inóculo}}$$

Western Blot (WB)

Para llevar a cabo el análisis por WB se mezclaron 40µl de un stock de fago concentrado con 25µl de agua y se congelaron en hielo seco. La mezcla congelada fue rápidamente descongelada y mezclada por agitación. Este proceso se repitió dos veces y posteriormente se calentó la mezcla a 75°C durante 3-4 minutos. Las muestras se hirvieron durante 3 minutos en buffer (62,5 mM Tris-HCl [pH 6,8], 2% SDS, 20% de glicerol, 5% mercaptoetanol, 0,1% de azul de bromofenol) y se cargó en un gel de poliacrilamida al 7%.

Las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno durante 3 horas y se visualizaron usando un anticuerpo monoclonal anti-STAG conjugado a la HRP (del inglés Horseradish peroxidase) (StrepMAB Classic-HRP; número de catálogo

2-1509-001; IBA GmbH, Goettingen, Alemania) y se reveló con el sustrato quimioluminiscente ECL Pierce (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL). Como control se usó un extracto celular inducido de *M. smegmatis* mc²155 (pNIT gp9-STAG).

ELISA (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)

Para realizar los ensayos de ELISA se emplearon microplacas recubiertas de StrepMAB que reconocen y se unen al STAG II (número de catálogo 2-1521-001; IBA GmbH, Goettingen, Alemania). Se realizaron diluciones seriadas del stock de fago en buffer (25mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 140 mM NaCl; pH 7,6) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de este tiempo, se realizaron tres lavados con buffer de lavado (25mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 140 mM NaCl, 0.05% de tween 20; pH 7.6), éstos lavados se realizaron con el fin de remover el fago no unido. Posteriormente, 200µl de una dilución 1:5000 del anticuerpo StrepMAB Classic-HRP fue adicionado e incubado a temperatura ambiente. Después de cuatro lavados con buffer de lavado, se adicionaron 100µl de TMB (tetrametilbencidina) a cada pocillo de la microplaca (KPL Inc., Gaithersburg, Md) y se dejó a temperatura ambiente hasta ver coloración azul. La reacción se detuvo adicionando igual volumen de solución TMB Stop (0,16M H₂SO₄) a los pocillos y finalmente se midió la absorbancia a 450nm.

Inmunoelectromicroscopía

Las preparaciones de micobacteriófagos Φgfp-STAG fueron absorbidas a una rejilla que contiene una película recubierta de carbono. Se realizó el bloqueo de las rejillas con 50mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA) durante 5 minutos y posteriormente lavadas con buffer de lavado (50 mM Tris-HCl [pH 7,5], 0,1% de Tween 20), e incubadas durante 5 minutos con el anticuerpo primario (rabbit anti-Strep-tag II polyclonal antibody; Genscript, Piscataway, NJ) diluido 1:500 en el mismo buffer suplementado con 0.5% de BSA. Seguidamente, se realizó un lavado con el buffer de lavado y la rejilla se incubó con el anticuerpo secundario usando una dilución 1:1000 (gold-labeled anti-rabbit IgG, KPL Inc., Gaithersburg, MD). La rejilla se lavó una vez más después de la incubación con el

anticuerpo y se tiñó con una solución al 1% de acetato de uranilo para realizar la visualización de varios campos por microscopía electrónica.

Eficiencia de captura de partículas de fago libre usando perlas magnéticas recubiertas de Strep-Tactin

Con el fin de evaluar la eficiencia de captura de partículas de fago, se usaron tres micobacteriófagos diferentes: micobacteriófagos Φ STAG-gfp, Φ gfp o Φ D29. Se realizaron diluciones seriadas de éstos y se mezclaron con 25 μ l de perlas MagStrep tipo 2HC (número de catálogo 2-1612-002; IBA GmbH, Goettingen, Alemania); esta mezcla de perlas y fago se incubaron durante 30 minutos a 4°C mezclando ocasionalmente. Las perlas se separaron usando el separador magnético y se lavaron seis veces con 200 μ l de buffer W (100 mM Tris-HCl [pH 8], NaCl 150 mM, EDTA 1 mM). El sobrenadante obtenido después de remover las perlas magnéticas se conservó para titular en un ensayo de gota como se describió anteriormente y así poder calcular las UFP/ml para determinar la cantidad de fago no unido. Diferentes cantidades de perlas magnéticas fueron ensayadas para optimizar la relación perlas-fago.

Recuperación de complejos fago-bacteria usando perlas magnéticas recubiertas de Strep-Tactin

Se crecieron células de *M. smegmatis* mc²155 en medio de cultivo Middlebrook 7H9 suplementado con 10% de ADC y en ausencia de tween hasta alcanzar una D.O_{600nm} 1. Aproximadamente 250 μ l de células (cerca de 2.5×10^7 células) fueron infectadas con el fago Φ STAG-gfp o Φ gfp a una multiplicidad de infección de 100. Con la finalidad de promover el proceso de adsorción las mezclas fago-bacteria se incubaron durante 10 minutos sin agitación y a temperatura ambiente, posteriormente se colocaron en agitación durante 3.5 horas a 37°C. Después de este período de tiempo, las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) 2% final durante 30 minutos a temperatura ambiente (No. de catálogo HT5011; Sigma, St. Louis, MO).

Para evaluar la eficiencia de recuperación de los complejos fago-bacteria, se usaron 50µl de las células fijadas (aproximadamente 10^6 células) y se incubaron con 50µl de perlas MagStrep tipo 2HC (No. de catálogo 2-1611-002/006; IBA GmbH, Goettingen, Germany) durante treinta minutos a temperatura ambiente usando una plataforma oscilante. Posteriormente, las perlas se recuperaron usando el separador magnético y lavadas tres veces con el buffer W (Tris-HCl 100 [pH 8], NaCl 150 mM, EDTA 1 mM) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se compararon dos protocolos: recuperación de los complejos fago-bacteria luego de la elución de las perlas y posterior visualización por microscopía de fluorescencia o visualización directa de los complejos sin eluir en presencia de las perlas. La elución de las perlas magnéticas se realizó con el buffer BE (100 mM Tris-HCl [pH 8], NaCl 150 mM, 1 mM EDTA, 2 mM de D-biotina).

Para llevar a cabo las observaciones por microscopía se usaron 5µl para colocar en las láminas portaobjetos cubriendo con un cubreobjetos y selladas para evitar la desecación de las muestras. Además, otro de los parámetros que se determinó fue la eficiencia de captura de los complejos fago-bacteria usando diferentes cantidades de bacterias; para realizar este ensayo se realizaron diluciones seriadas al décimo del cultivo de *M. smegmatis* mc²155 y se infectó manteniendo fija la cantidad de Φgfp-STAG, las condiciones de infección se mantuvieron iguales. Posterior a la fijación con PFA 2% final, se realizó el montaje de las láminas portaobjetos y se cuantificó la cantidad de bacilos presentes en 20 campos, haciendo las observaciones con el objetivo de 100x.

Microscopía de Fluorescencia

Para realizar las visualizaciones de fluorescencia se usó un microscopio de fluorescencia (AxioStar Plus; Carl Zeiss) con un objetivo de 40x y 100x con aceite de inmersión y contraste de fase. Las imágenes de fluorescencia se obtuvieron usando una cámara AxioCam MRc5 (Carl Zeiss) y el software Carl Zeiss Axio Vision versión 4.6. En todos los experimentos, se utilizó el mismo tiempo de exposición. Para la detección de la proteína verde fluorescente (EGFP), se usó el filtro CLON ZsGreen1 (42002-HQ 470/30X, HQ520/40m, Q495LP) de Chroma Technology Corporation y para la detección de la

proteína mCherry se usó el juego de filtros 64 HE mPlum shift free (E) Carl Zeiss EX BP 587/25, BS FT605, EM BP 647/70.

El procesamiento de las imágenes se realizó mediante el uso del Adobe Photoshop CS2 (Adobe Systems Inc.) se empleó la misma configuración de brillo y contraste para todas las imágenes obteniendo imágenes comparables entre sí. Para la evaluación de la *performance* de los FluoFagos en muestras clínicas se observaron 100 campos por muestra usando el objetivo 100x.

EVALUACIÓN DE PARÁMETROS DE IMPORTANCIA EN EL PROCESO DE INFECCIÓN CON FLUOFAGOS

Viabilidad de *Mycobacterium tuberculosis* usando diferentes protocolos de decontaminación de muestras clínicas (esputos)

Se usaron muestras clínicas previamente evaluadas para TB y VIH, usando solamente aquellas negativas para las dos enfermedades. Una vez confirmada la ausencia de estos agentes infecciosos, las muestras de esputo fueron inoculadas con 100µl de *M. tb* mc²6230 en fase exponencial; posteriormente se evaluaron los dos métodos descritos a continuación para determinar la viabilidad de las micobacterias después del proceso de decontaminación.

- *Método NaOH-NALC*: Este protocolo consiste en el tratamiento del esputo en una relación 1:1 con 4% de NaOH – 0,5% N-acetilcisteína, esta última empleada como agente para la licuefacción. Posteriormente se mezcló por inversión dejando actuar durante 15 minutos a temperatura ambiente, seguido se realizó el paso de neutralización con buffer fosfato (4,73gr/L de Na₂HPO₄ y 4,53gr/L de KH₂PO₄). Finalmente, la muestra se centrifugó y se resuspendió el sedimento en medio de cultivo Middlebrook 7H9 suplementado con OADC y ácido pantoténico.

- *Método Petroff modificado:* Este protocolo consiste en la descontaminación del esputo empleando como agente descontaminante NaOH 4% sin la adición de agente licuefactante en una relación 1:1, se dejó incubando durante 15 minutos a 37°C, posteriormente se centrifugó durante 20 minutos y se descartó el sobrenadante, se realizó la neutralización gota a gota con H₂SO₄ al 15% directamente sobre el pellet y finalmente se lavó con agua destilada, se centrifugó la muestra y el pellet se resuspendió en agua.

Una vez descontaminadas las muestras (esputos) se realizaron diluciones seriadas del pellet en medio Middlebrook 7H9 y se plaquearon en medio de cultivo Middlebrook 7H11 suplementado con pantotenato, OADC y PANTA. Se incubaron las placas durante 30 – 40 días a 37°C y se realizó el recuento de colonias para determinar las Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/ml) comparando con el crecimiento obtenido en el control del ensayo (células solas). De esta manera se determinó como afectan los protocolos de descontaminación en la viabilidad micobacteriana y cuál protocolo es más indicado para eliminar todos los microorganismos acompañantes en el esputo recuperando a su vez la mayor cantidad de micobacterias.

Efecto del pH

Un parámetro a evaluar de importancia es el pH y su relación en el proceso de infección debido a que la PZA, uno de los fármacos ampliamente usados en el tratamiento de la TB actúa a un pH ácido (5.5). Se crecieron células de *M. tb* mc²6230 hasta alcanzar una D.O_{600nm} 1, se centrifugó el cultivo y dos alícuotas se resuspendieron en medio Middlebrook 7H9 suplementado llevándolo a un pH de 5.5 con unas gotitas de HCl y otra alícuota se resuspendió usando el medio de cultivo empleado de forma rutinaria que tiene un pH neutro. Los cultivos se dejaron a 37°C durante toda la noche y al día siguiente, una de las alícuotas que estaba con medio de cultivo pH 5.5 se centrifugó y se resuspendió en medio nuevo con pH 7.0. Posteriormente se infectaron los cultivos con Φ mCherry_{bomb} usando una multiplicidad de infección de 100 durante 5 horas, se fijaron con PFA 2% final durante 1 hora, se centrifugaron y los pellets fueron resuspendidos en

PBS. Finalmente, se realizó el montaje de los preparados para realizar la visualización por microscopía de fluorescencia. Por otra parte, una alícuota del FluoFago se expuso en buffer a pH 5.5 durante una hora y posteriormente se realizó la titulación con el fin de evaluar la incidencia de este parámetro en la infectividad de Φ mCherry_{bomb}.

Infección usando *Mycobacterium tuberculosis* en diferente estado metabólico

Se usaron cultivos de *M. tb* mc²6230 que se encontraban en diferente fase de crecimiento y se infectaron con el FluoFago Φ mCherry_{bomb} usando una multiplicidad de infección de 100, posteriormente las bacterias se fijaron durante una hora con PFA 2% final, se centrifugaron y resuspendieron en PBS para hacer el montaje de las láminas y visualizar por microscopía de fluorescencia.

Seguimiento de la fluorescencia en el tiempo

Se creció un cultivo de *M. tb* mc²6230 hasta fase exponencial y se infectó usando una multiplicidad de infección de 100, se dejó infectando durante toda la noche a 37°C y posteriormente se fijó con PFA 2% final durante dos horas. Después de este tiempo, la infección se centrifugó y se resuspendió en PBS; cada semana durante el 1 mes y al 3 mes, se tomó una alícuota para preparar una lámina y ser visualizada por microscopía de fluorescencia con el fin de evaluar la estabilidad de la fluorescencia en función del tiempo.

Fijación de micobacterias con paraformaldehído (PFA)

Se creció un cultivo de *M. tb* mc²6230 hasta fase exponencial como se describió anteriormente y se fijó con PFA 2% final, se tomaron alícuotas a distintos tiempos, se centrifugó y se resuspendió el pellet en medio de cultivo con el fin de eliminar el PFA. Una vez obtenidas las alícuotas se inocularon 200µl por pozo de una microplaca, como control se usó el cultivo sin exposición al PFA. Posteriormente, se reveló el pozo control con 30µl de sal sódica resazurina (Sigma- Aldrich) preparada al 0,01% en agua bidestilada estéril. La

lectura o viraje de color se observó a las 24 horas, cuando el control presento viraje de color de azul a rosa se revelaron todos los pozos inoculados. El viraje de color indica la viabilidad bacteriana mientras que la coloración azul demuestra que no existen bacterias viables.

COMPARACIÓN DE LA *PERFORMANCE* DE FLUOFAGOS PARA LA DETECCIÓN DE *M. tuberculosis* Y DETERMINACIÓN DE RESISTENCIA A RIFAMPICINA EN MUESTRAS CLÍNICAS (ESPUTOS)

De forma cotidiana, todas las muestras pulmonares que ingresan al Laboratorio de Bacteriología de la TBC, son decontaminadas usando el método de Petroff modificado descrito anteriormente y el pellet es usado para realizar la tinción ZN para determinar la presencia de BAAR, otra parte es usada para cultivar en medio LJ y si es una muestra con alta carga bacilar se realiza el antibiograma directo, usando el método de las proporciones o si se trata de una muestra proveniente de un paciente con factor de riesgo de estar cursando TB se realiza el antibiograma directo por MGIT, anteriormente descrito. El material restante después de realizar todas las pruebas mencionadas es cedido por el Laboratorio de la TBC para realizar la validación del FluoFago.

El remanente cedido se usó para comparar la *performance* del FluoFago Φ mCherry_{bomb} con el método de las proporciones usado como método de referencia. Para cumplir con este objetivo se plantearon dos diseños experimentales:

- Diseño I: Diagnóstico de *Mycobacterium spp* directamente en muestras de esputo
Consistió en la recuperación del pellet en medio Middlebrook 7H9 + OADC + PANTA a 37°C durante tiempos variables (de 24hs a 8 días), transcurrido estos tiempos se infectó con Φ mCherry_{bomb} durante toda la noche, a 37°C posteriormente las muestras se fijaron con PFA 2% final durante 2 horas a temperatura ambiente, se centrifugaron y el pellet se resuspendió en 10µl de PBS. Se prepararon los portaobjetos y se sellaron para evitar la desecación de la muestra y finalmente se observaron 100 campos por microscopía de fluorescencia

usando el objetivo 100x. En este diseño se evaluaron 446 muestras clínicas y solamente se diagnosticó la presencia de micobacterias viables en la muestra.

- Diseño II: Diagnóstico y determinación de resistencia a RIF de *Mycobacterium spp* directamente en muestras de esputo

En el diseño II se diagnosticó tanto la enfermedad como la resistencia a rifampicina, se testearon 283 muestras clínicas para validar la metodología del FluoFago. Los remanentes de los esputos se recuperaron usando 3 ml de medio de cultivo Middlebrook 7H9 suplementado con OADC y PANTA durante 48 horas a 37°C, posteriormente se centrifugó, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 400 µl de medio fresco. Finalmente, se dividió la muestra en 4 tubos diferentes con 100 µl cada uno. Dos de ellos se infectaron a las 48 horas post-recuperación en presencia y ausencia de RIF 4µg/ml y los otros dos restantes se infectaron con Φ mCherry_{bomb} a las 96 horas post-recuperación en presencia y ausencia de RIF (Figura 7). La infección se realizó durante toda la noche, posteriormente fueron fijadas con PFA 2% final durante 2 horas a temperatura ambiente y por último todas las alícuotas se centrifugaron y el pellet se resuspendió en 10µl de PBS, usados para el montaje de los portaobjetos que se sellaron para evitar la desecación de las muestras. Por último 100 campos fueron visualizados por microscopía de fluorescencia usando el objetivo 100x, se registró la cantidad de bacilos fluorescentes observados por muestra.

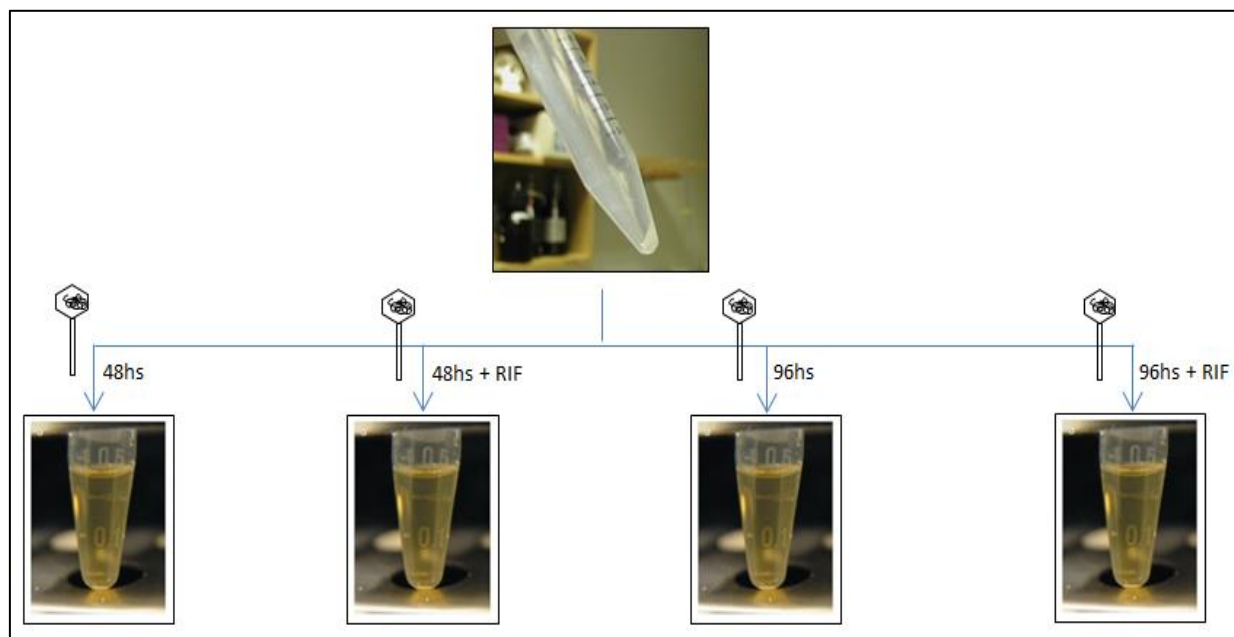


Figura 7. Representación esquemática del uso de FluoFagos para la detección de *M. tuberculosis* y determinación de resistencia a RIF en esputos.

Diferenciación de *Mycobacterium. tuberculosis* de otras micobacterias usando PNB (p-Nitrobenzoic acid)

La diferenciación de *M. tb* de otras micobacterias es fundamental porque determina el tratamiento farmacológico a seguir en el paciente. Una vez evaluadas las muestras por el método del FluoFago y teniendo el resultado de identificación de especies proporcionado por el Laboratorio de Bacteriología de la TBC, se cultivaron aquellas especies diferentes a *M. tb* provenientes de las muestras testeadas con el fin de realizar el ensayo de diferenciación con PNB, el cual inhibe selectivamente a bacterias pertenecientes al complejo *M. tb* (Sharma et al. 2010; Shakoor et al. 2010).

El ensayo se realizó usando cultivos en fase exponencial de *M. avium*, *M. abscessus*, *M. kansasii* y *M. szulgai* y *M. tuberculosis* como control. De cada uno de ellos se tomaron 3 alícuotas de 200µl y 2 de cada una de las especies micobacterianas se incubaron con 500µg/ml de PNB y se incubaron a 37°C durante 24 y 48 horas, y la otra alícuota no se expuso a PNB y se usó como control. Finalizados los tiempos de incubación las alícuotas se centrifugaron y el pellet se resuspendió en medio fresco. Posteriormente, se realizó la

infección de todas las alícuotas con Φ mCherry_{bomb} usando las mismas condiciones descriptas anteriormente. Por último, las infecciones fueron observadas por microscopía de fluorescencia en donde se esperaba la ausencia de fluorescencia en *M. tb* expuesto a la acción del PNB.

Ensayos de resistencia extendida con Φ mCherry_{bomb}

A partir de dos de las muestras clínicas diagnosticadas a posteriori por métodos de referencia como TB- XDR, se planteó realizar ensayos de resistencia extendida usando los fármacos isoniacida (0,2 μ g/ml), rifampicina (4 μ g/ml), estreptomina (2 μ g/ml), ofloxacina (10 μ g/ml), etambutol (5 μ g/ml), kanamicina (2,5 μ g/ml), capreomicina (2,5 μ g/ml), levofloxacina (1,5 μ g/ml) y amikacina (1 μ g/ml). Se tomaron diez alícuotas de 200 μ l de cada uno de los aislamientos, cada una de éstas se expuso a la concentración indicada para cada uno de los fármacos y una de las alícuotas se usó como control de la infección. Se dejaron durante toda la noche a 37°C y posteriormente cada alícuota se infectó con Φ mCherry_{bomb} durante toda la noche, transcurrido este tiempo las muestras se fijaron con PFA 2% final y se procedió a la preparación de los portaobjetos para su visualización por microscopía de fluorescencia.

ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS DE LA POBLACIÓN PARTICIPANTE

Individuos participantes

Participaron en este estudio individuos que ingresaron al Laboratorio de Bacteriología de la TBC del Instituto de Tisiopneumología Dr. Raúl Vaccarezza – Hospital Muñiz de la ciudad de Buenos Aires y quienes firmaron el consentimiento informado aprobado previamente por el comité de ética del Hospital. La firma de este consentimiento daba el aval por parte de los pacientes para que el material restante de la muestra clínica (esputo) fuera usado para la validación de la metodología basada en el empleo de Fluofagos. Este estudio incluyó personas de diferentes edades, nacionalidades, géneros,

algunas con enfermedades asociadas a la TB, además se incluyeron pacientes con diferente clasificación al ingreso de la muestra; vírgenes de tratamiento, tratados, en tratamiento, abandonos, recaídas, fracasos terapéuticos, entre otros. Los únicos motivos de exclusión fueron las muestras clínicas no pulmonares, muestras salivares y muestras con poca cantidad (volumen) que no permitía que quedara un mínimo de remanente posterior a las pruebas realizadas de rutina por parte del laboratorio.

Se realizó un estudio de las características clínico-epidemiológicas con los datos almacenados en las historias clínicas de los pacientes, siendo la totalidad del estudio aquellos pacientes que ingresaron al Laboratorio de Bacteriología de la TBC del Instituto de Tisioneumonología Dr. Raúl Vaccarezza – Hospital Muñiz de la ciudad de Buenos Aires y aceptaron que el remanente de su muestra clínica pulmonar fuera usada en la validación del método del FluoFago Φ mCherry_{bomb}. La muestra estuvo conformada por un total de 425 pacientes, de los cuales se revisaron sus historias clínicas y fichas epidemiológicas registradas en el departamento de estadística del Hospital como del Laboratorio, respectivamente. Entre los parámetros tenidos en cuenta para la epidemiología se encuentran: Datos demográficos como edad, género, nacionalidad; patologías previas y asociaciones morbosas relacionadas con la TB, tratamientos previos, evolución del paciente, entre otros. Esta información ofrece un primer acercamiento del estado actual de la TB en la ciudad y las características más influyentes en el desarrollo y curación de la enfermedad.

Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó usando el software R, para la determinación de la sensibilidad, especificidad y valores predictivos del método del FluoFago Φ mCherry_{bomb} respecto al método de las proporciones; se hicieron matrices de confusión para establecer la validez de la prueba diagnóstica en evaluación. Además se estableció la relación entre la variable dependiente (presencia de la enfermedad tuberculosa) y las variables independientes tales como: edad, género, nacionalidad, presencia de VIH, adherencia al tratamiento (culminación, éxito o fracaso).

El test de Fisher: Usado para establecer la relación del género, orientación sexual, contacto de personas con TB, personal de salud, enfermedades asociadas y antecedentes carcelarios con la TB.

El test de Wilcoxon: Esta prueba no paramétrica permitió comparar la relación entre la edad y la posibilidad de cursar la enfermedad. Además se realizó una regresión logística para ver el efecto de la edad creciente en el riesgo de presentar TB.

Por otra parte se determinó la frecuencia con la que se presenta la enfermedad respecto a la ocupación que desempeñan los pacientes y se recopiló la información de la mayoría de los pacientes respecto a su evolución (tipo de alta).

Otras asociaciones fueron realizadas para conocer si el rango etario era similar respecto a la nacionalidad, esta asociación se determinó con la prueba de Kruskal-Wallis y Wilcoxon.

APÉNDICE MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

Componentes de Medios de Cultivo y Soluciones		
Medio	Componentes	Esterilización
Middlebrook 7H9	Composición por 900 ml de H ₂ O: sulfato de amonio 0.5g, ácido L-glutámico 0.5g, citrato de sodio 0,1g, piridoxina 1mg, biotina 0.5mg, fosfato disódico 2.5g, fosfato monopotásico 1g, citrato de amonio férrico 0.04g, sulfato de magnesio 0.05g, cloruro de calcio 0.5mg, sulfato de zinc 1mg, sulfato de cobre 1mg. Suplementar con: ADC 10% Tween 0.05%	121 °C durante 15 min.
Middlebrook 7H10	Composición por 900 ml de H ₂ O: Sulfato de amonio 0.5g, fosfato monopotásico 1,5g, fosfato disódico 1.5g, citrato de sodio 0,4g, sulfato de magnesio 25mg, cloruro de calcio 0.5, sulfato de zinc 1mg, sulfato de cobre 1mg, ácido L-glutámico 0.5g, citrato de amonio férrico 0.04g, piridoxina 1mg, biotina 0.5mg, agar bacteriológico 15gr. Suplementar con: OAD 10%, Tween 0,05%.	121°C durante 15 min.
Middlebrook 7H11	Composición por 900ml de H ₂ O: Sulfato de magnesio 0.05g, Citrato de amonio férrico 0.04g, Citrato de sodio 0.4g, Sulfato de amonio 0.5g, Glutamato monosódico 0.5g, Fosfato disódico 1.5g, Fosfato monopotásico 15g, Agar 13.5g, Piridoxina 1mg, Sulfato de zinc 1mg, Sulfato de cobre 1mg, Biotina 0.5mg, Cloruro de calcio 0.5mg, Verde de malaquita 0.25mg. Suplementar con: OADC 10%, Tween 0.05%	121°C durante 15 min.
Buffer Fago	NaCl 68.5Mm, Tris-HCl 1M pH 7.6, 10Mm, CaCl ₂ 1mM, MgSO ₄ 10mM	Autoclave 121°C durante 15 min.
ADC	Dextrosa 2gr/L, Albúmina 5gr/L, NaCl 0.85gr/L	Filtro 0,22µm
Top Agar	Middlebrook 7H9 4,7gr/L, Agar bacteriológico 7gr/L	121°C durante 15 min.
PANTA	Composición por vial liofilizado: Polimixina B 6.000 unidades, Anfotericina B 600µg, Ácido nalidíxico 2,400µg, Trimetoprim 600µg, Azlocilina 600µg	

RESULTADOS

CAPÍTULO I. INCORPORACIÓN DE "TAGS" EN LA CÁPSIDE DE FLUOFAGOS

BRED: una forma simple de modificar genomas de bacteriófagos

Los micobacteriófagos representan una valiosa herramienta para la manipulación genética de *M. tb*. A partir de ellos se desarrollaron los fásmidos (Jacobs et al. 1987) , moléculas quimeras que contienen ADN de *E. coli* y del bacteriófago. Esto permite utilizar todas las herramientas disponibles para la manipulación genética de los fásmidos en *E. coli* para luego obtener fagos modificados en *Mycobacterium* spp. Los fásmidos han sido usados para mutagénesis por transposición (Bardarov et al. 1997), construcción de mutantes (Bardarov et al. 2002) y construcción de bacteriófagos reporteros (Dusthacker, Kumar, et al. 2008; Mariana Piuri et al. 2009). Sin embargo, se requerían de herramientas más sencillas y rápidas que permitieran modificar genéticamente directamente los fagos .

La construcción de mutantes derivados de bacteriófagos ha sido en general más compleja que la manipulación de sus huéspedes bacterianos ya que es imposible realizar una selección por resistencia a antibióticos en fagos líticos. Una primera aproximación para resolver esto en Micobacteriófagos fue, empleando fásmidos de replicación en *E. coli*, realizar la mutagénesis en esta bacteria por *recombineering* Lambda-Red y posteriormente recuperar los fagos mutantes en *M. smegmatis* (Piuri & Hatfull 2006). Para simplificar la técnica, surge la idea de desarrollar la metodología de BRED (del inglés, *Bacteriophage Recombineering of Electropored DNA*) (Marinelli et al. 2008).

En la Figura 8 se presenta un esquema general de esta metodología que puede ser utilizada para generar deleciones, inserciones, reemplazos y adiciones de genes; permitiendo a su vez realizar estudios genómicos funcionales con la capacidad de revelar novedosas y diversas características de los bacteriófagos.

Las células que expresan las funciones de recombinación son coelectroporadas con el ADN del fago y el sustrato de *recombineering*, éstos se mezclan con células indicadoras de *M. smegmatis* y se plaquean en un ensayo de centros infecciosos para obtener placas líticas aisladas. Sobre las placas primarias se intenta detectar el fago mutante por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) utilizando oligonucleótidos flanqueantes al sitio de

la mutación. Las placas pueden ser mixtas si se observa además la presencia del fago original o silvestre. Una vez identificada una placa positiva que contiene la mutante se diluye y se vuelve a plaquear. Si el gen *target* no es esencial, la mutante puede ser fácilmente reconocida por PCR, si esto no ocurre, entonces se puede inferir la esencialidad del gen (Figura 8).

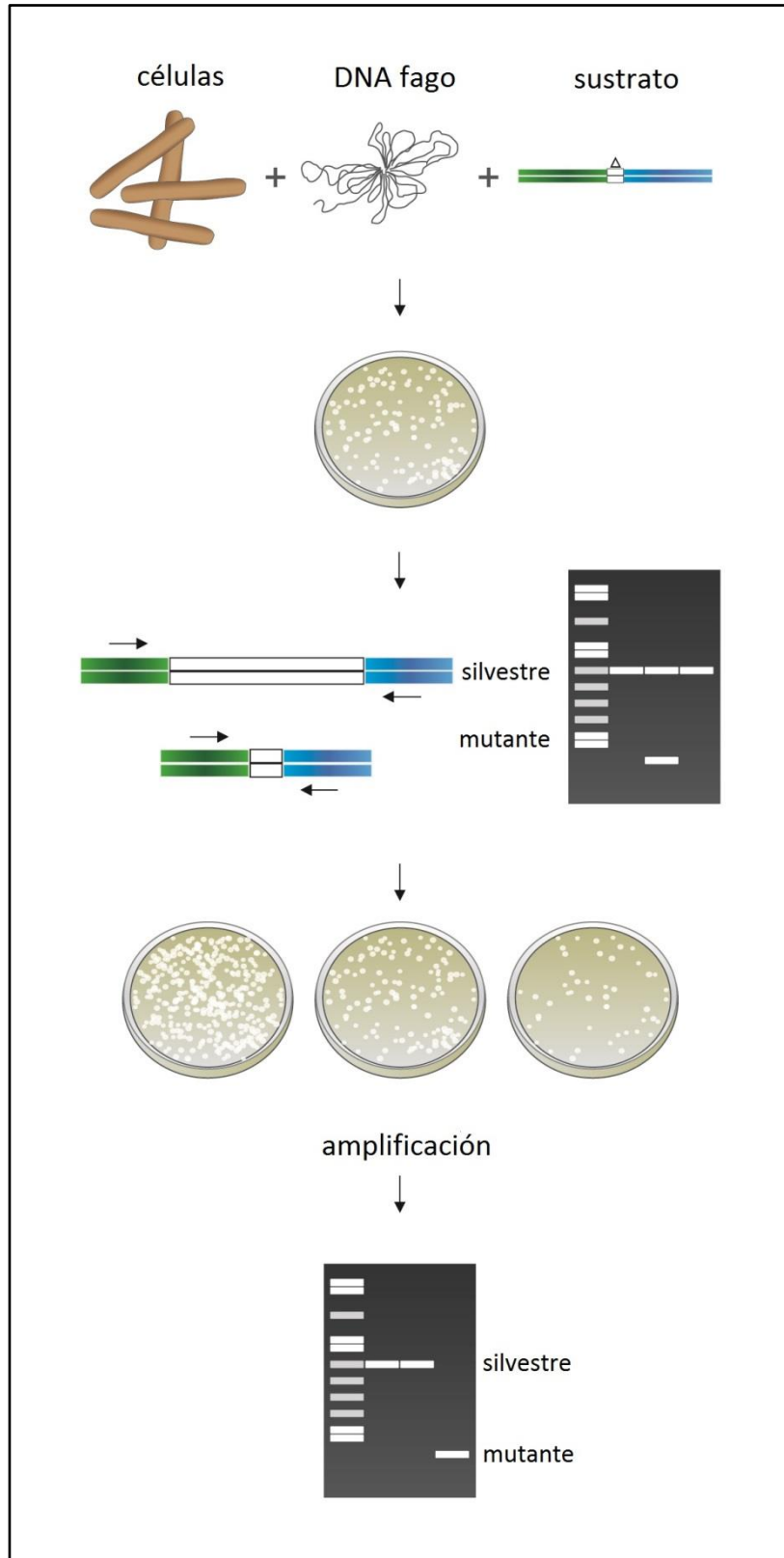


Figura 8. Pasos generales para la construcción de mutantes de bacteriófagos por BRED.

Modificación de la cápside de TM4 empleando BRED

Inicialmente, se intentó construir un derivado recombinante de TM4 en el que se adicionó al extremo C-terminal de la proteína de la cápside de TM4 (gp9) una etiqueta Strep II (STAG) que está conformada por 8 aminoácidos y 2 residuos de unión. De acuerdo a estudios previos (Chat et al. 2001), se planteó que la adición de una etiqueta corta al extremo C-terminal podría ser más tolerada para el ensamblaje en la cápside. Nos enfocamos en utilizar la estrategia de BRED (Marinelli et al. 2008) para diseñar una modificación en el gen 9 de TM4 (Figura 9). Seguido de la coelectroporación del ADN de TM4 y el sustrato mutagénico de 200pb en células de *M. smegmatis*, se recuperaron placas en un ensayo de centros infecciosos, logrando detectar la presencia de mutantes por PCR con oligonucleótidos que usen a la región que codifica para el STAG y río abajo en gp10 (Figura 10).

Aunque presentes en una baja frecuencia (<1/100 placas; en otros experimentos de BRED, por lo general el 10% de las placas individuales son mixtas, conteniendo ambos alelos tanto de tipo salvaje como mutante (Marinelli et al. 2008)) pudo detectarse la presencia de la mutante. Sin embargo, después de múltiples rondas de purificación y *screening*, no fue posible obtener la mutante en las placas secundarias. Una posible explicación es que aunque es posible la introducción del STAG en gp9, este fago modificado no se puede purificar homogéneamente en ausencia del fago salvaje debido a que no logra ensamblarse correctamente la cápside cuando las 415 copias de la proteína contienen el *tag*.

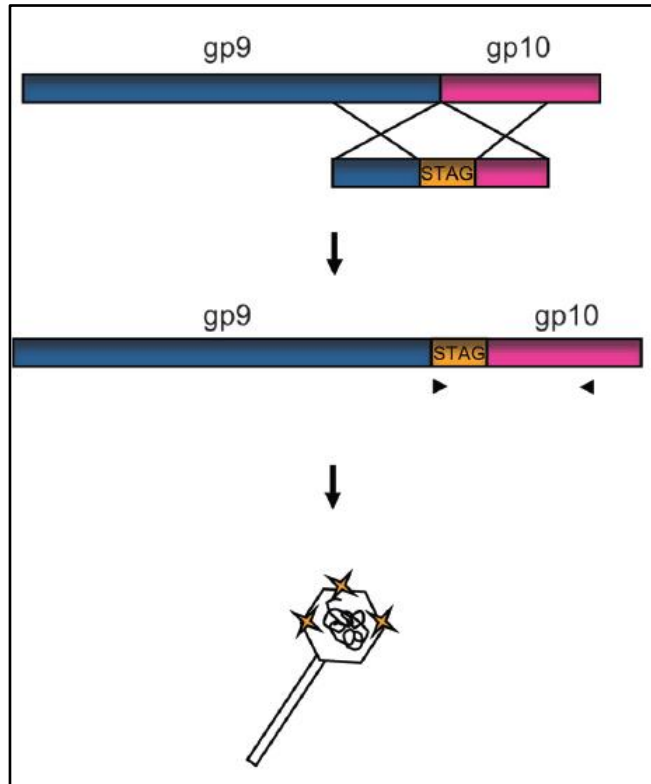


Figura 9. Representación esquemática de la estrategia usada para incorporar un STAG al extremo C-terminal de la proteína gp9 de TM4 usando BRED.

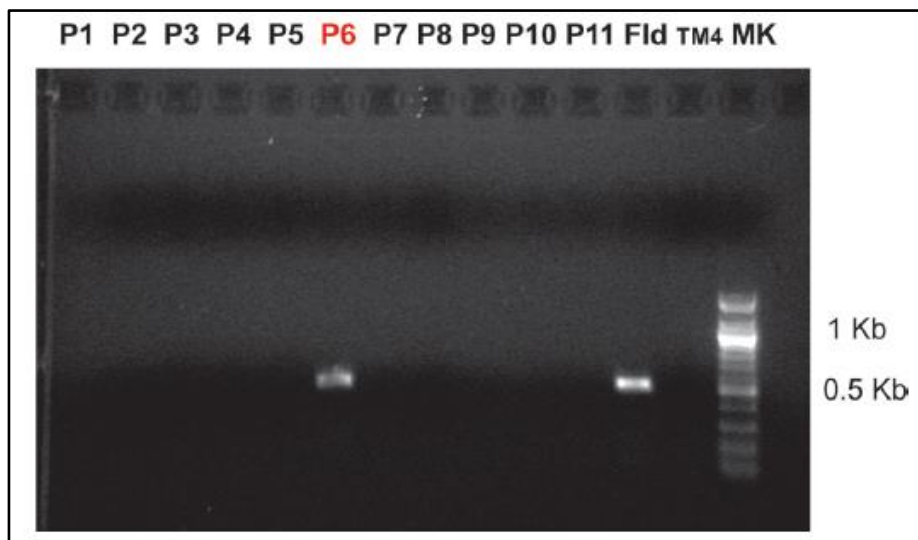


Figura 10. Detección por PCR de la inserción del STAG en gp9. Del carril P1 al P11 se rastrearon placas primarias, utilizando un oligonucleótido *forward* que hibrida con la secuencia de STAG II y un oligonucleótido *reverse* que hibrida con la secuencias de gp10. En presencia de una placa positiva, el tamaño del producto esperado es de 500pb. Fld-placa inundada proveniente de un experimento de BRED, usado como control positivo para demostrar la presencia de mutantes del fago en la población; TM4-DNA de TM4, usado como control negativo para la PCR.

Adición de una etiqueta de afinidad a la cápside de TM4

Teniendo en cuenta el resultado anterior se pensó que la adición del STAG en el extremo C-terminal podría ser tolerada si está presente solo en un subconjunto de subunidades dentro de una partícula viral. Por lo tanto, se propuso ensayar la posibilidad de hacer un ensamblaje mixto, donde se exprese la forma recombinante de la proteína durante el proceso de infección por fagos junto a la proteína salvaje. Para desarrollar este objetivo se construyó un plásmido de expresión en el cual el gen que codifica para la proteína de fusión TM4 gp9-STAG se encuentra bajo control del promotor pNit inducible con ϵ -caprolactam (Figura 11) (Pandey et al. 2009) y se transformó *M. smegmatis* mc²155 con el mismo. Las células se crecieron hasta fase exponencial y luego se dividió el cultivo en dos en uno se indujo la expresión por agregado de ϵ -caprolactam y el otro se empleó como control (Figura 12). No se observaron diferencias en el crecimiento entre ambos cultivos. Mediante Western Blot empleando un anticuerpo anti-STAG se logró demostrar que la proteína se expresaba correctamente después de ser inducida, como se observa en la Figura 13. Pudo detectarse una banda del tamaño esperado (aproximadamente 33kDa) y el máximo nivel de proteína se obtuvo luego de las 3 horas de inducción y se mantuvo constante hasta las 24 horas donde comienzan a observarse posibles productos de degradación de la misma.

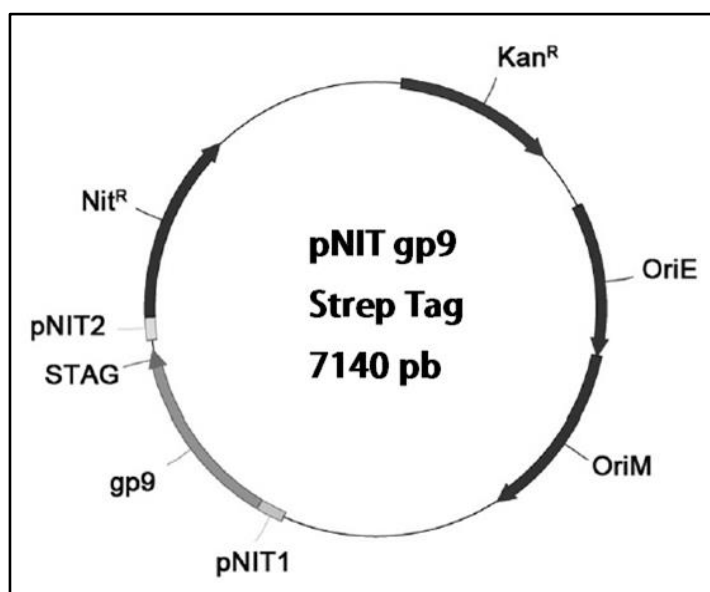


Figura 11. Representación esquemática de pNIT gp9-STAG.

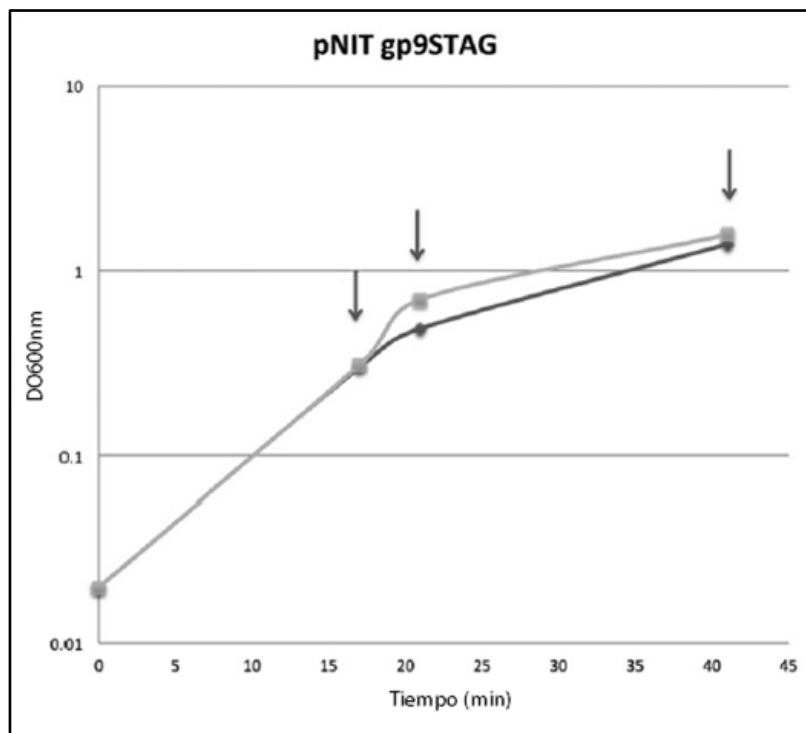


Figura 12. Curva de crecimiento de *M. smegmatis* mc2155 (pNIT gp9-STAG). Las células fueron crecidas a una DO_{600nm} a 0.3 para ser inducidas con ϵ -caprolactam. Las flechas indican los diferentes puntos en el tiempo cuando la expresión de gp9-STAG se comprobó mediante Western Blot. Los rombos representan las celulas inducidas y los cuadrados las celulas no inducidas.

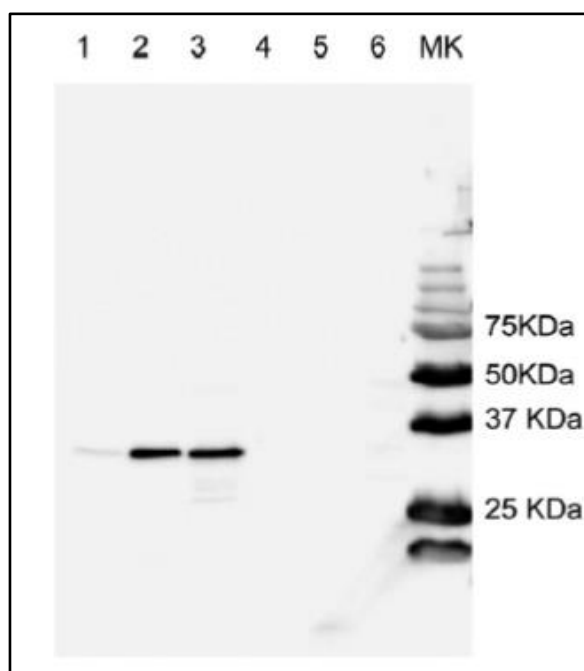


Figura 13. Western Blot de la expresión de gp9-STAG. Los carriles 1-3 células inducidas; carriles de 4-6 células no inducidas. Las muestras fueron obtenidas a distintos tiempos después de la adición o no del inductor dependiendo del caso: 1h (carril 1 y 4), 3h (carril 2 y 5), y 24hs (carril 3 y 6).

Previamente, nuestro grupo describió la construcción de un FluoFago recombinante de TM4 que acarrea un gen reportero que expresa GFP (phAE87::*hsp60-EGFP* o *gfpΦ*), como resultado del proceso de infección de este fago en células viables de *M. smegmatis* o *M. tb* pueden visualizarse bacilos verdes fluorescentes (Piuri M et al. 2009). Se prepararon lisados de *gfpΦ* en la cepa de expresión *M. smegmatis* (gp9-STAG) y las partículas del fago se purificaron y concentraron; resultando en una preparación de fago que se denominó STAG- *gfpΦ*. Los títulos del stock de fago tanto de *gfpΦ* preparado en la cepa control o de STAG- *gfpΦ* preparado en la cepa de expresión gp9-STAG fueron comparables, lo que demuestra que la producción de fagos no se ve afectada cuando se usa la cepa de expresión gp9-STAG. Para determinar si la etiqueta fue incorporada a las partículas ensambladas, se usó un anticuerpo anti-STAG en un ensayo de WB usando partículas de fago enteras. En la figura 14, se observa una señal clara de alto peso molecular en la calle conteniendo el STAG- *gfpΦ* que corresponde probablemente a capsómeros.

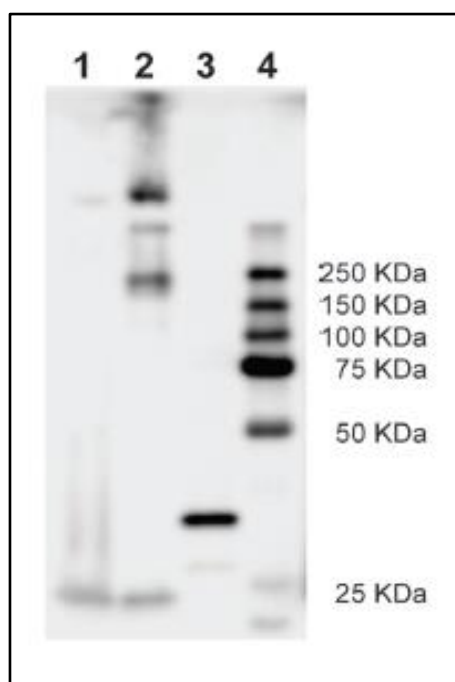


Figura 14. Western Blot para evaluar la incorporación de un STAG de afinidad en la cápside de phAE87::*hsp60-EGFP*. Carril 1- partículas enteras de phAE87 :: *hsp60-EGFP* (*gfp*), carril 2- phAE87::*hsp60-EGFP* amplificado en *M. smegmatis* mc²155(pNIT gp9-STAG) (STAG-*gfp*), carril 3- extracto celular de *M. smegmatis* mc²155 (pNIT gp9-STAG). Se evaluó la incorporación mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE y el revelado por quimioluminiscencia utilizando un anticuerpo anti-STAG marcado con HRP.

No se observó ninguna señal con peso molecular aproximado a 33kDa, que corresponde a la subunidad gp9 no ensamblada aun habiéndose realizado un SDS-PAGE. Esto se debe a que las unidades de las cápside de TM4 se encuentran unidas covalentemente y no pueden ser completamente desensambladas por este tratamiento obteniéndose solamente capsómeros. El STAG fue claramente detectado por análisis de ELISA con un aumento de la señal al aumentar el número de partículas de fago empleadas (Figura 15). Finalmente, la presencia del STAG en las partículas del fago fue determinada por inmunoelectromicroscopía empleando un primer anticuerpo anti STAG y un segundo anticuerpo acoplado a partículas de oro (Figura 16).

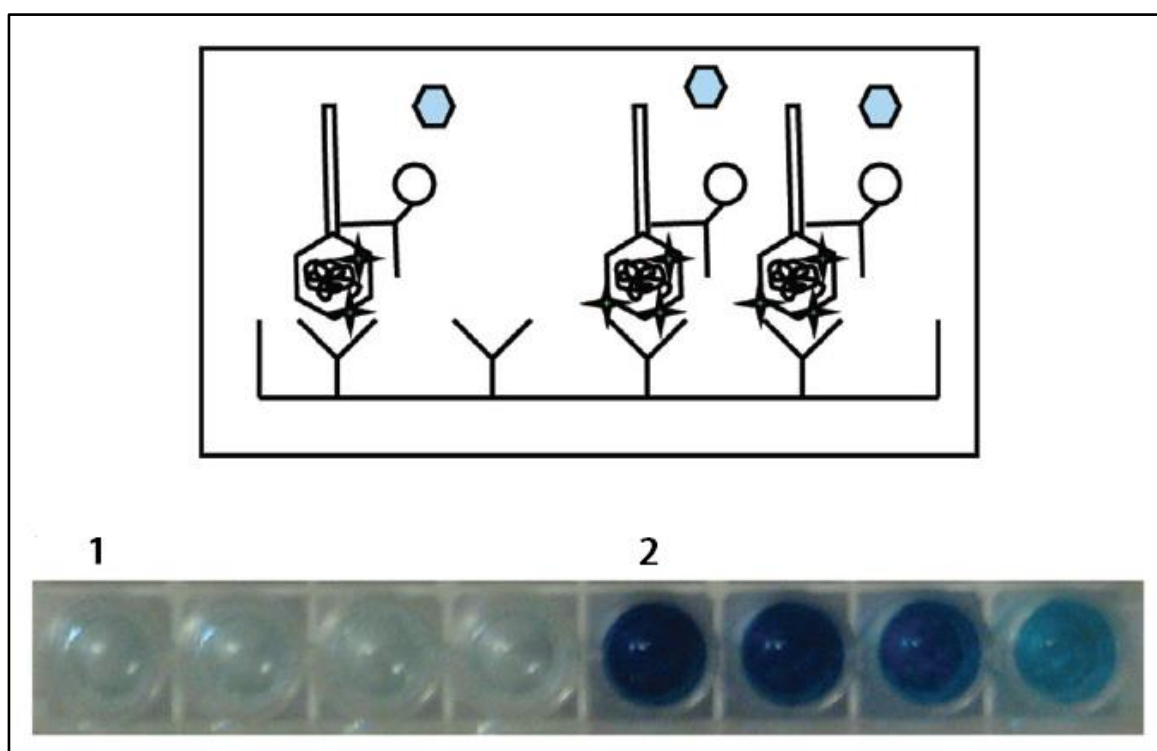


Figura 15. ELISA para evaluar la incorporación de un STAG de afinidad en la cápside de *phAE87::hsp60-EGFP*. 1- Diluciones del fago *gfpΦ*, 2-diluciones del fago STAG- *gfpΦ*. Estas diluciones fueron colocadas sobre placas recubiertas con un anticuerpo anti-STAG. De izquierda a derecha, el número de partículas de fago absorbido fue de 1×10^{10} , 5×10^9 , 2.5×10^9 y 1.25×10^9 . Después del lavado, la captura de las partículas de fago se comprobó utilizando un anticuerpo anti-STAG marcado con HRP en un ensayo colorimétrico.

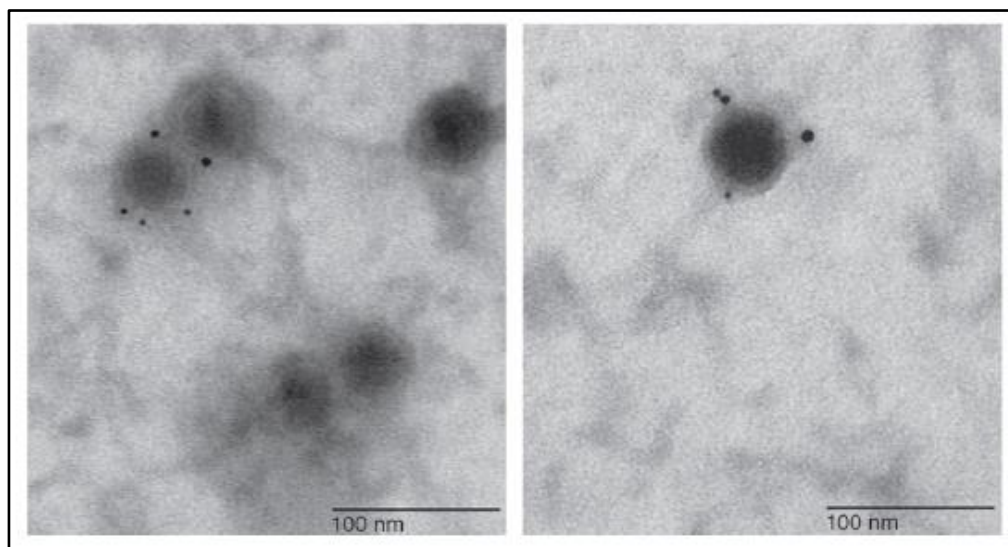


Figura 16. Electroimmunomicroscopía para evaluar la incorporación de un STAG de afinidad en la cápside de *phAE87::hsp60-EGFP*. Las partículas de fago se adsorbieron a una rejilla y se incubaron con un anticuerpo primario de conejo anti-STAG y un anticuerpo secundario anti-conejo marcado con oro. La rejilla se tiñó con acetato de uranilo y se examinaron varios campos con un microscopio electrónico.

Debido a que es difícil aplicar estos métodos cuantitativamente a este tipo de muestras, no ha sido posible determinar con precisión la proporción de partículas que contiene al menos una etiqueta o un número promedio de STAGs incorporados en cada partícula.

Se evaluó la captura por afinidad de los fagos con la etiqueta usando perlas magnéticas anti-STAG (Tabla 4). Los valores se calcularon de acuerdo a las UFP iniciales, de los sobrenadantes después de remover las perlas, y del lavado. Aproximadamente, el 95% de las partículas de STAG-gfp Φ fueron capturadas. Sorprendentemente, una inesperada y gran proporción (~80%) de partículas de fago sin el STAG-gp9 también fueron capturados, probablemente esto ocurre a causa de una reacción cruzada e inespecífica con proteínas nativas de TM4. Estos resultados nos hacen pensar que esta reacción es específica para TM4, ya que esto no fue observado cuando se empleó otro fago, D29, como control (Tabla 4).

Tabla 4. Captura de bacteriófagos usando perlas magnéticas recubiertas de Strep-Tactin.^a Los datos son medias de las desviaciones estándar de tres experimentos y se basan en el número de UFP/ml en la muestra inicial y en el sobrenadante (la fracción obtenida después de remover las perlas magnéticas) más lavados.

Media \pm Desviación Estándar del # de partículas infecciosas de fago (UFP/ml) ^a			
Bacteriófago	Inicial	No Unido (sobrenadante y lavados)	% de partículas unidas
D29	$6.55 \times 10^7 \pm 7.07 \times 10^5$	$6.34 \times 10^7 \pm 1.48 \times 10^5$	3.2 ± 1.2
gfp Φ	$4.25 \times 10^8 \pm 3.54 \times 10^7$	$8.5 \times 10^7 \pm 3.54 \times 10^7$	80.2 ± 6.6
STAG-gfp Φ	$6.10 \times 10^9 \pm 1.41 \times 10^8$	$4.28 \times 10^8 \pm 1.59 \times 10^8$	92.9 ± 2.77

Captura por afinidad de complejos fago-bacteria

La potencial utilidad de las partículas de STAG-TM4, surge como una alternativa para la recuperación de bacterias presentes en muestras complejas, en las cuales muchas veces la carga bacilar es baja, dificultando su recuperación. En la Figura 17, se muestra la representación esquemática propuesta para esta metodología.

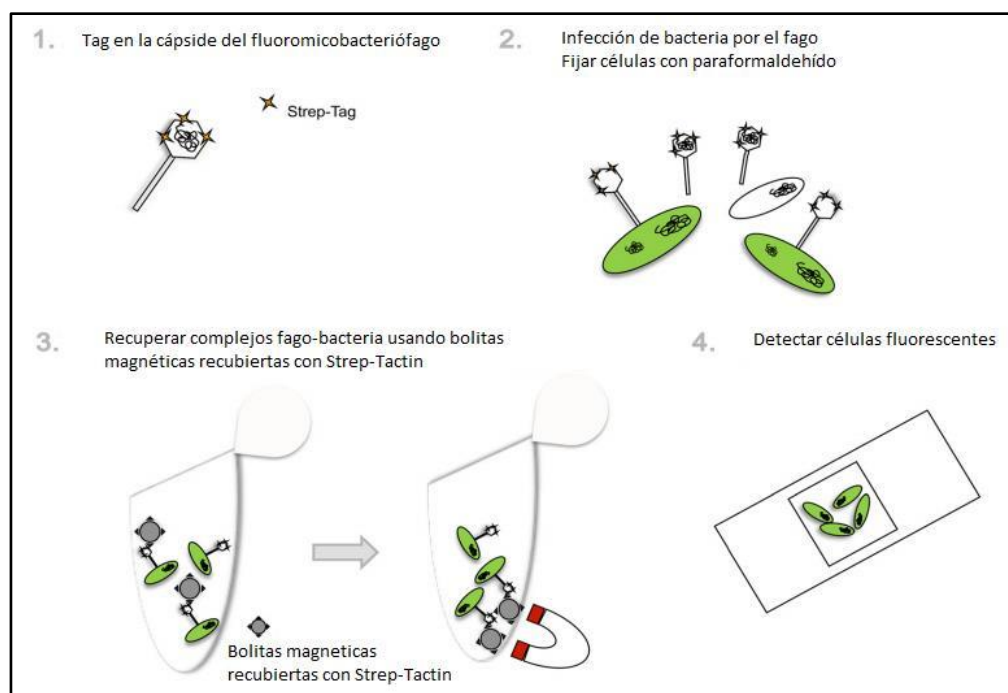


Figura 17. Representación esquemática del protocolo propuesto para la infección de *M. smegmatis* con STAG-gfp Φ y recuperación de complejos fago-bacteria con perlas magnéticas recubiertas con Strep-Tactin.

Para probar si las partículas STAG-gfp Φ se podrían utilizar para capturar micobacterias unidas a los fagos, se preparó un stock como se describió anteriormente y se utilizó para infectar células de *M. smegmatis*. Como control se usó un stock del mismo fago crecido en la cepa control de *M. smegmatis*. Se empleó el mismo número de células y multiplicidad de infección con el fin de poder comparar los resultados.

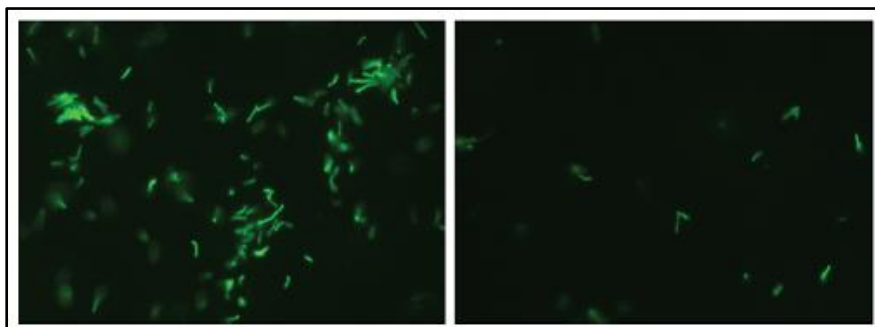


Figura 18. Imágenes de microscopía de fluorescencia después de la elución de los complejos fago-bacteria usando perlas magnéticas recubiertas con Strep-Tactin. Izquierda - Las células fueron infectadas con STAG-GFP Φ , derecha - células infectadas con *gfp* Φ . Aumento 400x.

Los complejos fago – bacteria fueron fijados posterior al proceso de infección con PFA 2% final y capturados usando perlas magnéticas acopladas a StrepTactin que se une específicamente al STAG, las perlas fueron colectadas y los complejos fueron eluidos y examinados por microscopía de fluorescencia (Figura 18). Como puede observarse en la figura 18 la proporción de células capturadas cuando se infectó con el STAG-gfp Φ (panel izquierdo) fue mayor que cuando la infección se hizo con el fago original. También fue posible observar al microscopio de fluorescencia los complejos fago-bacteria luego de la captura con las perlas magnéticas sin realizar la elución simplificando aún más el protocolo, para este ensayo se realizó la inspección de 20 campos para cada preparado usando un aumento 1000x (Figura 19).

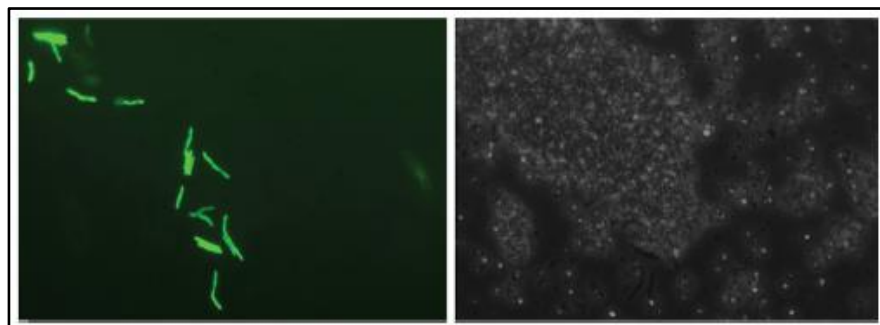


Figura 19. Imágenes de microscopía electrónica de la captura de complejos fago-bacteria. Perlas magnéticas recubiertas con Strep-Tactin después de la recuperación de los complejos fago-bacteria. Izquierda – microscopía de fluorescencia, derecha – contraste de fase. Aumento 100x.

Al momento, a pesar de que se han evaluado diferentes parámetros tales como la multiplicidad de infección y los tiempos de incubación; no ha sido posible aumentar la proporción de células capturadas. Esto puede reflejar una limitación inherente que resulta de la relativamente pobre adsorción como se ha reportado para otros micobacteriófagos (Jacobs-Sera et al. 2012). Así mismo, no podemos excluir la posibilidad, aunque consideramos que es poco probable, que el virión sea desplazado de la superficie de la bacteria una vez que se ha completado la inyección del DNA.

CAPÍTULO II. EVALUACIÓN DE PARÁMETROS DE IMPORTANCIA EN EL PROCESO DE INFECCIÓN CON FLUOFAGOS

Para llevar a cabo este objetivo empleamos el FluoFago Φ mCherry_{bomb}, esta segunda generación de FluoFagos acarrea un gen reportero (mCherry_{bomb}) cuya expresión ha sido optimizada para micobacterias (Urdániz et al. 2016). Este FluoFago está construido a partir del fásmido pHA87 que da origen a fagos termosensibles que pueden infectar las células pero no lisarlas a 37°C manteniendo la integridad de las bacterias y por lo tanto la señal fluorescente; solamente se recuperan placas de lisis a 30°C. Por lo cual, esta condición es indispensable al momento de realizar las infecciones ya que afecta directamente en los resultados obtenidos.

Por otra parte decidimos evaluar otras condiciones que pueden afectar la viabilidad de las micobacterias o la integridad de los micobacteriófagos repercutiendo en el proceso de infección y expresión de la proteína fluorescente.

Efecto de diferentes protocolos de descontaminación de muestras clínicas (esputo) en la viabilidad micobacteriana.

Como se describirá en el Capítulo III, uno de los objetivos de esta tesis es evaluar el desempeño de los FluoFagos para la detección de *M. tuberculosis* directamente en muestras de esputo. La descontaminación de muestras clínicas no estériles tal como el esputo, es un paso necesario para el aislamiento de las micobacterias. Estos procesos, están basados en la capacidad de resistencia que presenta esta especie bacteriana al tratamiento con ácidos y bases, entre otros. Este proceso es totalmente imprescindible debido a la presencia de contaminantes que pueden estar presentes, afectando el óptimo aislamiento de las micobacterias.

Existen varias alternativas para realizar la licuefacción y descontaminación de las muestras pulmonares, sin embargo en su mayoría se basan en el empleo de sustancias alcalinas fuertes, que permiten inhibir la flora acompañante pero como consecuencia un número sustancial de micobacterias también se ve afectada. Otras alternativas, emplean sustancias descontaminantes menos fuertes, dando como resultado cultivos con

crecimiento de otros microorganismos solapando el desarrollo y aislamiento de las micobacterias y por ende retrasando la confirmación de la presencia de *M. tb*.

Teniendo en cuenta la importancia de emplear métodos de descontaminación que inhiban la mayoría de contaminantes afectando en menor medida la viabilidad de las micobacterias presentes, se propuso evaluar dos metodologías usadas cotidianamente en los laboratorios de diagnóstico de TB.

El método de Petroff modificado usado de forma cotidiana en el Lab. de la TBC del Hospital Muñiz, se basa en el empleo de NaOH 2% final como agente descontaminante sin la adición de agentes licuefactantes. Una de las variaciones implementadas por el laboratorio es la neutralización que se debe realizar posterior a la incubación y centrifugación con el NaOH. El método convencional sugiere el uso de buffer fosfato a pH 6.8, mientras que el laboratorio de la TBC realiza la neutralización con H₂SO₄ al 15% gota a gota directamente sobre el pellet.

El método de NaOH-NALC, ampliamente usado, trata las muestras pulmonares en una relación 1:1 con 4% de NaOH – 0,5% N-acetilcisteína (NALC), esta última actúa como agente mucolítico logrando disminuir la viscosidad de la muestra. Otra de las diferencias respecto a la metodología implementada por el Laboratorio de la TBC, es el paso de neutralización que se lleva a cabo usando buffer fosfato a pH 6.8.

Para evaluar el efecto del tratamiento en la viabilidad de *M. tuberculosis* y la posterior infección con los fagos, esputos negativos para TB se inocularon con aproximadamente 5×10^6 UFC de *M. tb* mc²6230. Al finalizar el proceso de descontaminación, el pellet recuperado se resuspendió en medio Middlebrook 7H9 suplementado con OADC y ácido pantoténico. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas en el mismo medio de cultivo para plaquear en medio Middlebrook 7H11 suplementado, así mismo se plaquearon diferentes diluciones del cultivo inicial de *M. tb* mc²6230 usado para inocular los esputos. Después de 30 – 40 días de incubación de las placas de Petri a 37°C, se realizó la cuantificación de las UFC/ml y se comparó el crecimiento micobacteriano obtenido

proveniente de cada uno de los métodos de descontaminación y respecto al control sin tratar (cultivo inicial de *M. tb* mc²6230), de esta forma se evaluó la recuperación y viabilidad de *M. tb*. Para comprobar diferencias relativas al control, calculamos el porcentaje de viabilidad teniendo en cuenta el control de cada ensayo como viabilidad 100%, sin embargo no fue posible incluirse en el modelo de ANOVA por afectar la variabilidad de los ensayos; como puede observarse en la figura 20, en este caso el control no presenta variabilidad.

Cuando se realizó el cálculo para determinar las UFC/ml luego del tratamiento se obtuvo una importante disminución en la recuperación de micobacterias con ambos métodos de descontaminación respecto al control (Figura 20). Sin embargo, al realizar el análisis usando el método de Tukey para comparar los dos métodos de descontaminación no se observan diferencias significativas entre los tratamientos.

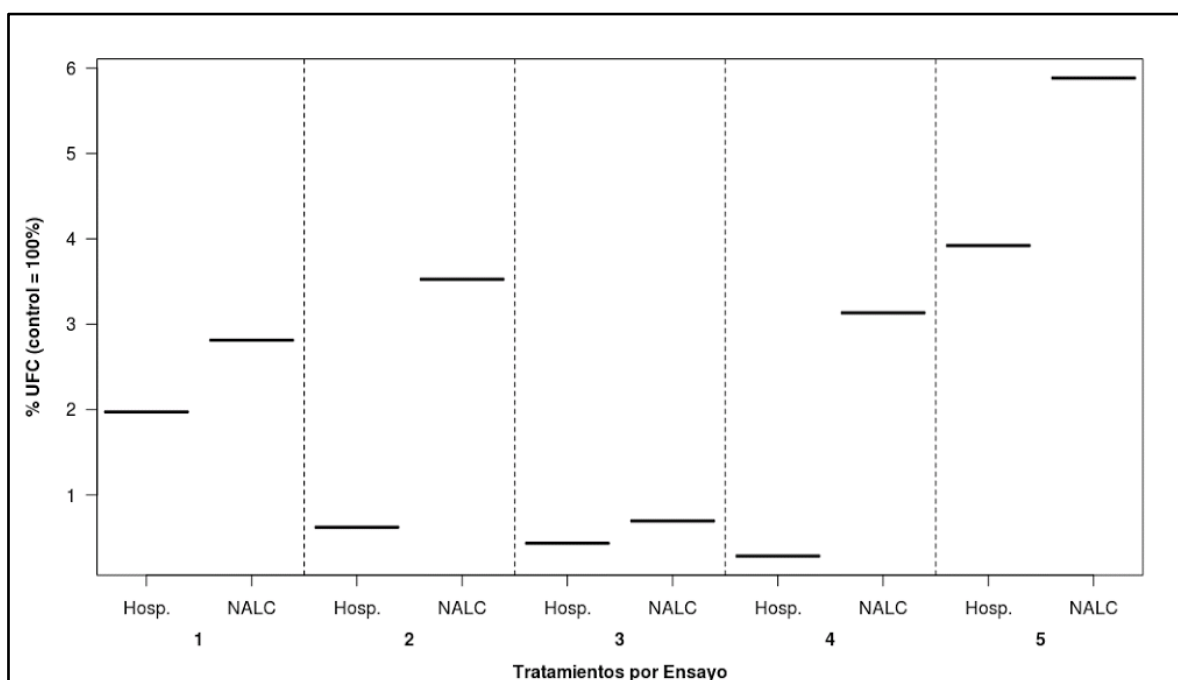


Figura 20. Relación de la recuperación/viabilidad de *M. tuberculosis* mc26230 (%UFC) comparando dos protocolos de descontaminación de muestras clínicas. Los números de 1-5 representa el número de ensayos realizados.

De la figura anterior podemos inferir que a pesar de que estadísticamente no existen diferencias significativas entre los tratamientos, se observa una mayor recuperación con el método NaOH-NALC; esto probablemente se deba al uso del agente mucolítico que

permite que los bacilos presentes se liberen de la secreción pulmonar densa. Por otra parte las variaciones en las UFC/ml entre los ensayos realizados, se puede deber a la dificultad que representa tener cultivos homogéneos de *M. tb*, esto debido a la presencia de ácidos micólicos (6,6'-dimicolato de trehalosa) en la pared que promueve a la formación de agregados – factor cuerda.

Fijación de las micobacterias con PFA

La fijación de las muestras con PFA al 2% final presenta dos ventajas principales: la bioseguridad que ofrece a la persona que manipula las muestras, simplificando algunos procedimientos de manejo posteriores como la preparación de las muestras para futuros análisis por microscopía o fluorimetría. Este parámetro es de gran importancia teniendo en cuenta que durante el desarrollo de esta investigación se manipularon muestras clínicas provenientes de pacientes con TB activa que en algunos casos presentaron resistencia fármacos. Otra de las ventajas, es la preservación de la fluorescencia en el tiempo como se describirá más adelante.

La viabilidad bacteriana luego del tratamiento con PFA 2% se evaluó usando la cepa de *M. tb* mc²6230 antes de iniciar los ensayos clínicos. Para esto, una alícuota de cultivo (1×10^7 UFC/ml) se expuso a PFA 2% en una relación 1:1 y se tomaron alícuotas de 400µl a distintos tiempos 10, 15, 20, 30, y 60 minutos; a medida que se tomaron las alícuotas se centrifugaron y el pellet se resuspendió en medio Middlebrook 7H9 suplementado, esto con el fin de eliminar el PFA. Se inocularon 200 µl de cada alícuota por pocillo de una microplaca y se usó como control bacterias sin fijar con PFA, la placa se reveló usando 30µl de sal sódica resazurina y se incubó durante 24 horas antes de realizar la lectura de los resultados.

En la Figura 21, se muestran los resultados obtenidos con este ensayo colorimétrico. Las columnas 1 y 2 representan réplicas del ensayo a los tiempos indicados, C corresponde a las micobacterias usadas como control sin exposición a PFA. El viraje en la coloración de azul a rosa es indicador de la viabilidad de las bacterias. Los pocillos en color azul indican la pérdida de viabilidad de las micobacterias a los diferentes tiempos de exposición. Se

observó una inhibición de la viabilidad luego de sólo 10 minutos de exposición a PFA. Este resultado se corroboró plaqueando 100µl de cada una de las alícuotas obtenidas posterior a la exposición con PFA en medio Middlebrook 7H11 suplementado, estas placas se incubaron durante 30 – 40 días a 37°C, transcurrido este tiempo se visualizaron para verificar el crecimiento de *M. tb* (Figura 22).

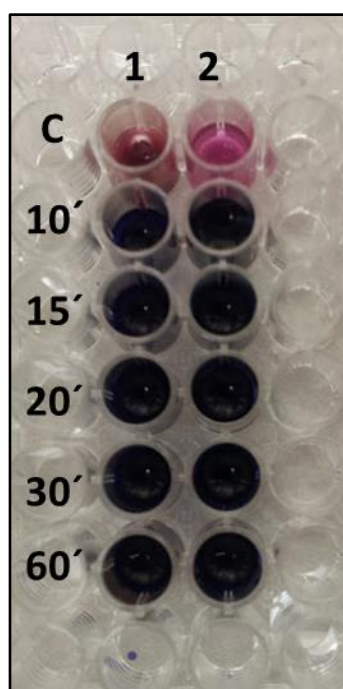


Figura 21. Evaluación de la viabilidad bacteriana posterior a la exposición con PFA 2% a diferentes tiempos usando el método colorimétrico de la resazurina. Las columnas 1-2 corresponden a réplicas del ensayo, C- Control de *M. tb* mc²6230 sin exposición a PFA.

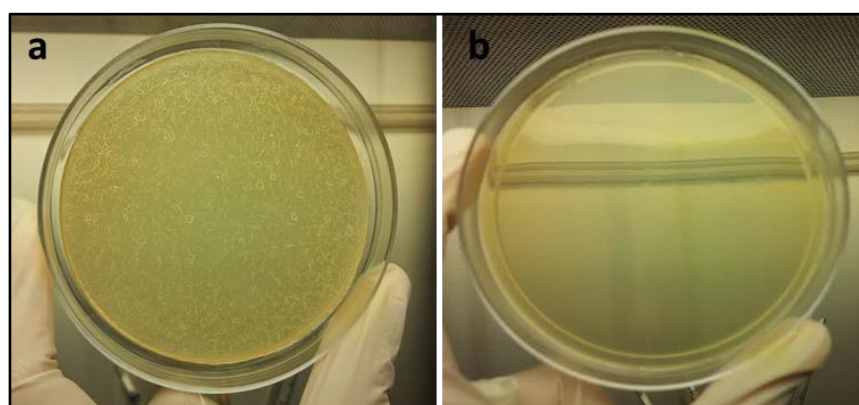


Figura 22. Evaluación de la viabilidad bacteriana posterior a la exposición con PFA 2% a diferentes tiempos corroborada por cultivo en medio Middlebrook 7H11. En el panel a- cultivo control de *M. tb* mc²6230 sin exposición a PFA, b- Cultivo de *M. tb* mc²6230 expuesto durante 10 minutos a PFA 2% final.

No se observaron UFC luego de 10 min de exposición al PFA ni en los tiempos posteriores. A pesar de obtener resultados concordantes entre ambos métodos en donde se observa inhibición de la viabilidad a partir de 10 minutos de exposición con PFA, para los ensayos de evaluación de la *performance* en muestras clínicas se realizará esta incubación al menos durante 2 horas, teniendo en cuenta que se desconoce los microorganismos y su resistencia que pueden estar presentes en estas muestras provenientes de pacientes.

Efecto del pH en el proceso de infección

Una de las ventajas que presenta la proteína fluorescente del Φ mCherry_{bomb} es que no se ve afectada por las condiciones de pH (Carroll et al. 2010). Sin embargo, no es conocido si las condiciones de pH pueden causar la inactivación de los FluoFagos o si los receptores o el reconocimiento de los mismos se pueden ver afectados.

Teniendo en cuenta la utilidad que puede ofrecer Φ mCherry_{bomb} para la determinación de susceptibilidad a fármacos y en vista de que la PZA, uno de los fármacos más ampliamente usados en el tratamiento de la TB, actúa a pH 5.5, decidimos evaluar si el proceso de infección y expresión de la proteína mCherry se ve afectado en condiciones de pH ácido.

Para ello, células de *M. tb* mc²6230 fueron resuspendidas en medio Middlebrook 7H9 suplementado a pH 5.5 y se realizó la infección con Φ mCherry_{bomb} a una multiplicidad de infección (MOI 100). Por otra parte, otra alícuota expuesta a medio de cultivo a pH 5.5 después de una incubación durante toda la noche se lavó y resuspendió en medio fresco a pH 7 y se infectó a una MOI 100. Las muestras se fijaron con PFA 2% final y se prepararon las láminas portaobjetos para realizar la visualización por microscopía de fluorescencia. Por otra parte, como control se expuso una alícuota del stock del FluoFago en buffer pH 5.5 durante una hora y posteriormente se realizó una titulación en gota; con la finalidad de evaluar el efecto del pH en su infectividad.

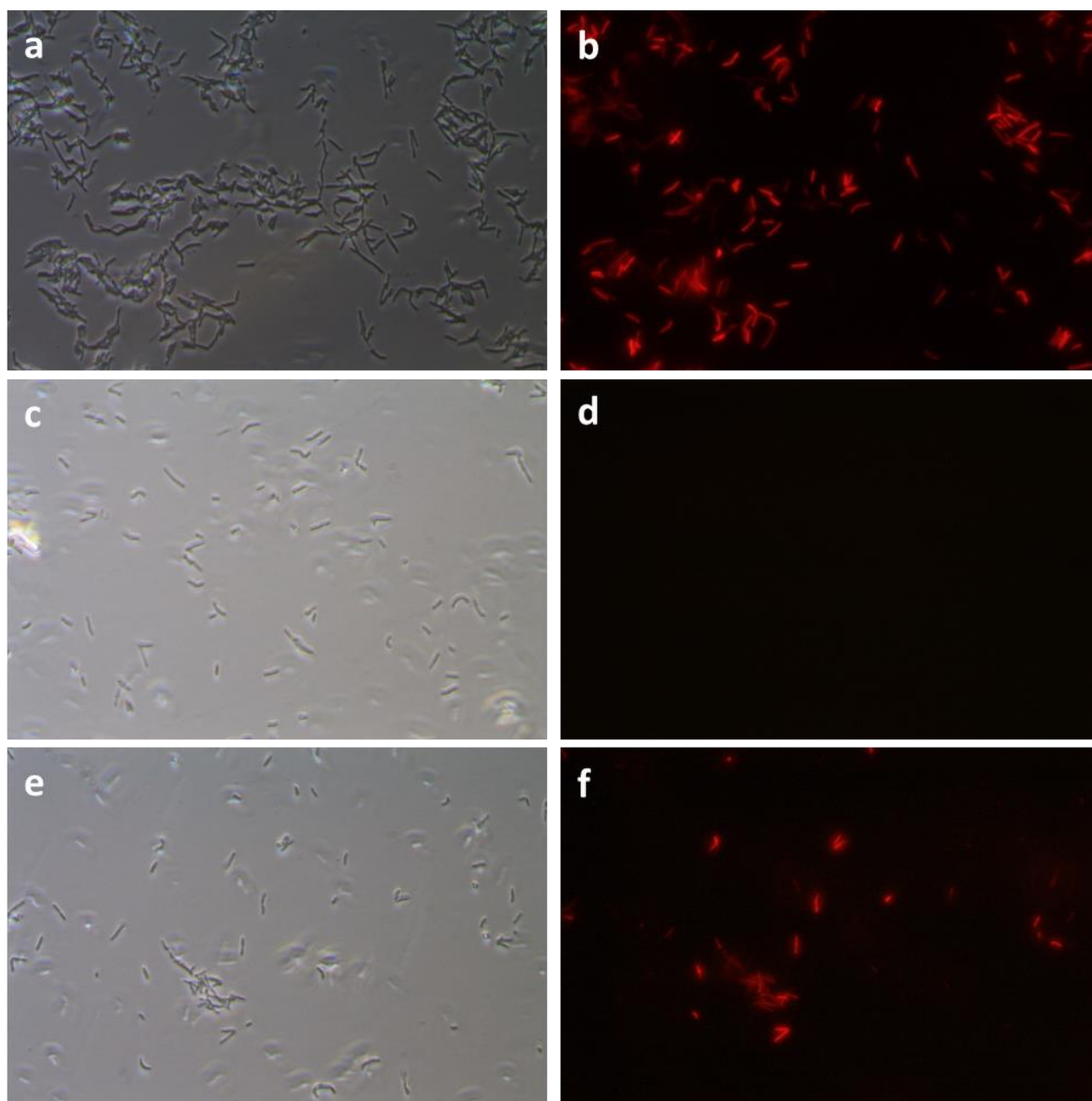


Figura 23. Imágenes de microscopía de fluorescencia de las infecciones expuestas a variación de pH. Las imágenes de los paneles a, c, e – corresponden a contraste de fase, b – control de la infección, d – micobacterias expuestas a medio de cultivo pH 5.5 e infección realizada a pH 5.5, f – micobacterias expuestas a medio de cultivo pH 5.5 e infección realizada en medio pH 7. Aumento 100X.

A modo de ejemplo, en los paneles a-b de la Figura 23, se observa un control de la infección realizada sin exponer las micobacterias a cambios de pH (pH 7) y se visualiza claramente que la mayoría de las micobacterias presentes se infectaron y expresan la proteína mCherry. En los paneles c-d, se observan las imágenes tomadas en campo claro y fluorescencia de las micobacterias incubadas e infectadas a pH 5.5; se observa una inhibición total de la expresión de la proteína mCherry. En el caso de la infección a pH 5 podemos atribuir la falta de señal fluorescente a la pérdida de infectividad del fago a ese

pH. Al exponer al FluoFago Φ mCherry_{bomb} a pH 5.5 durante una hora y después realizar la titulación en gota no se observaron UFP en ninguna de las diluciones. Estudios previos con fagos de *Streptococcus thermophilus* colocan en evidencia una importante inactivación de la viabilidad de los bacteriófagos a pH ácido (Binetti 2011). Finalmente en los paneles e-f, se observan las micobacterias que fueron expuestas a pH 5.5 durante toda la noche y se les realizó cambio de medio de cultivo a pH 7.

Si se compara entre la cantidad de bacilos presentes en la imagen tomada en campo claro y la de fluorescencia existe una menor cantidad de bacilos infectados respecto al control de la infección. A pesar, de que las micobacterias son más resistentes que otras bacterias a diversos factores químicos y físicos; igualmente se pueden ver afectadas por el cambio de pH, siendo el pH óptimo para su crecimiento entre 6.6 y 6.8. Por lo cual, se puede atribuir probablemente esta disminución de bacilos infectados, a que el resto de la población se pudo ver afectada por los cambios de pH presentando alteraciones que pueden afectar el proceso de reconocimiento entre el fago y la bacteria o directamente viéndose afectado el metabolismo e integridad de la bacteria dificultando el proceso de adsorción, infección y expresión de la proteína.

Los resultados obtenidos, nos demuestran que el pH afecta el proceso de infección; sin embargo, cuando las micobacterias son expuestas a pH ácido pero el proceso de infección se realiza a pH neutro, Φ mCherry_{bomb} es capaz de infectar las micobacterias viables y expresar la proteína fluorescente, tal como se observa en la Figura 23.

Influencia del estado metabólico micobacteriano en el proceso de infección

Los micobacteriófagos usados como herramientas para diagnosticar la presencia de bacilos en muestra clínicas, ofrecen importantes ventajas respecto a otros métodos implementados para el diagnóstico de la TB. Una de las ventajas radica en que son indicadores de la viabilidad micobacteriana, haciéndolos útiles al momento de instaurar regímenes terapéuticos en casos en donde se esté cursando una TB activa, porque podrían emplearse para realizar el seguimiento de la evolución del paciente ante los tratamientos instaurados.

Cuando se cursa una TB activa no todos los bacilos de *M. tb* se encuentran en el mismo estado metabólico. De hecho, desde el punto de vista terapéutico es importante reconocer la presencia de 4 poblaciones bacilares conformada por: bacilos de metabolismo activo, bacilos en fase de inhibición por las condiciones de su entorno, bacilos de multiplicación esporádica y finalmente bacilos en estado de latencia (Sancineto 2009).

Por lo anteriormente expuesto, nos planteamos evaluar si el FluoFago Φ mCherry_{bomb} infecta micobacterias que se encuentran en diferentes fases de crecimiento. Para llevar a cabo esta evaluación, se usaron cultivos de *M. tb* mc²6230 que se encontraban en fase inicial o de adaptación, fase exponencial, fase estacionaria y también un resuspendido de colonia proveniente de medio sólido. Los cultivos se infectaron con el FluoFago usando una multiplicidad de infección de 100, posteriormente las bacterias se fijaron durante dos horas con PFA 2% final, se centrifugaron y resuspendieron en PBS para hacer el montaje de las láminas y visualizar por microscopía de fluorescencia.

En la Figura 24 los paneles b, d, f, h revelan que al infectar micobacterias en los diferentes estadios evaluados se observa la expresión de la proteína fluorescente. Sin embargo, en el panel d correspondiente a las bacterias en fase exponencial se ve una mayor intensidad de la señal fluorescente y esto se debe a que la actividad metabólica activa de las micobacterias permite que la infección con FluoFagos y la expresión/ síntesis de la proteína sean óptimas permitiendo probablemente una mayor cantidad de proteína acumulada en el interior de los bacilos y una mejor señal fluorescente.

La visualización de bacilos fluorescentes luego de la infección de bacterias provenientes de una colonia en medio sólido (Figura 24 h) es muy relevante ya que indica la potencial aplicación de los FluoFagos para la determinación del patrón de susceptibilidad a antibióticos de aislamientos clínicos en corto tiempo sin la necesidad de obtener un cultivo en medio líquido para tal fin.

La elección del fago TM4 como base para la construcción del FluoFago $\Phi mCherry_{bomb}$ se basó en resultados previos donde se demostró la capacidad de este fago de infectar bacterias en fase estacionaria (Piuri & Hatfull 2006).

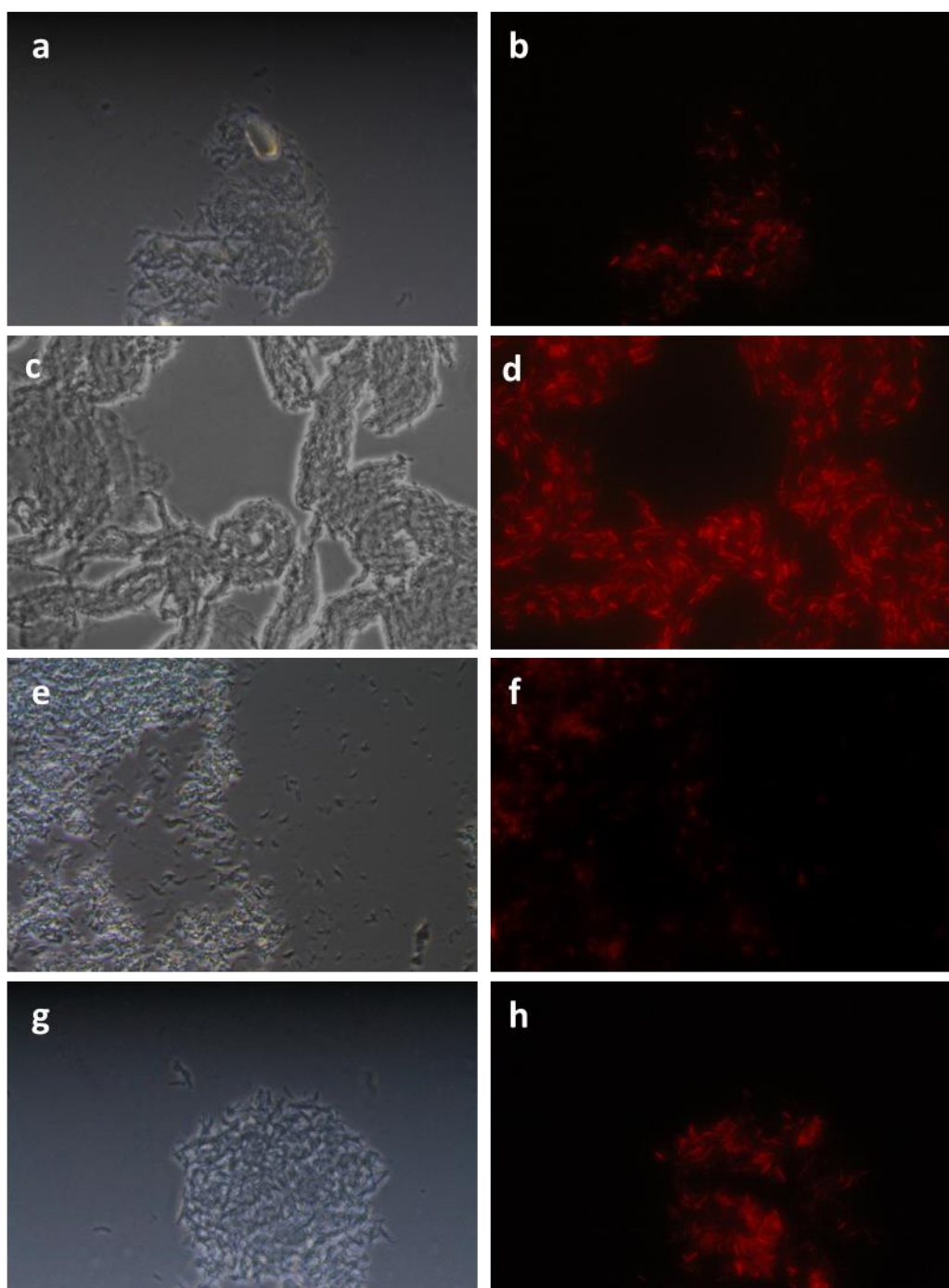


Figura 24. Imágenes de microscopía de fluorescencia de las infecciones usando *M. tb mc²6230* en diferentes estados metabólicos. Las imágenes de los paneles a, c, e, g – corresponden a contraste de fase, b – *M. tb mc²6230* en fase inicial o de adaptación, d – *M. tb mc²6230* en fase exponencial, f – *M. tb mc²6230* en fase estacionaria, h - *M. tb mc²6230* de colonia. Aumento 100X.

Estabilidad de la Fluorescencia en infecciones usando Φ mCherry_{bomb}

La preservación de la fluorescencia durante un período de tiempo, permite que las muestras clínicas una vez infectadas con el FluoFago Φ mCherry_{bomb} y fijadas con PFA, puedan ser almacenadas o, de ser necesario, transportadas hasta el lugar en donde se realizará la visualización de los preparados por microscopía de fluorescencia sin que la señal fluorescente se vea afectada.

Para evaluar la estabilidad de la fluorescencia en el tiempo, se usó un cultivo de *M. tb* mc²6230 en fase exponencial y se infectó usando una multiplicidad de infección de 100. Posterior al proceso de fijación con PFA, se resuspendió el pellet en PBS y se conservó a 4°C protegido de la luz. Se tomaron alícuotas para hacer el preparado de la muestra cada semana durante el primer mes y al tercer mes.

Como se observa en la Figura 25, la fluorescencia se mantuvo en el tiempo después de la fijación y mostró un leve decaimiento en la intensidad de la señal a partir de la 4 semana (Figura 25, paneles h, j). Sin embargo, cuando se realizó el seguimiento de la fluorescencia conservando el mismo portaobjeto previamente sellado para evitar la deshidratación de la muestra y conservándolo a 4°C; la fluorescencia solo se mantuvo por un período de 72 horas, mostrando un declive a partir de las 48 horas. Este comportamiento se puede atribuir a la pérdida de señal como consecuencia del fotoblanqueo en el fluoróforo que ocurre al ser expuesto a la luz durante observaciones previas; pudiendo ser minimizado al disminuir los tiempos de exposición de la muestra. Además, a pesar de conservar los preparados previamente sellados, con el paso del tiempo se observa una deshidratación de la muestra y por consiguiente una pérdida en la morfología de las micobacterias. Este inconveniente previamente descrito, no ocurrió cuando se realizó el seguimiento de la fluorescencia preparando cada vez un portaobjeto con la muestra. Esto nos lleva a inferir que la proteína mCherry presenta una buena estabilidad al compararse con otras variantes reportadas (Carroll et al. 2014; Carroll et al. 2010), además esto muestra otra de las ventajas que ofrecen el empleo de FluoFagos como método de diagnóstico para TB.

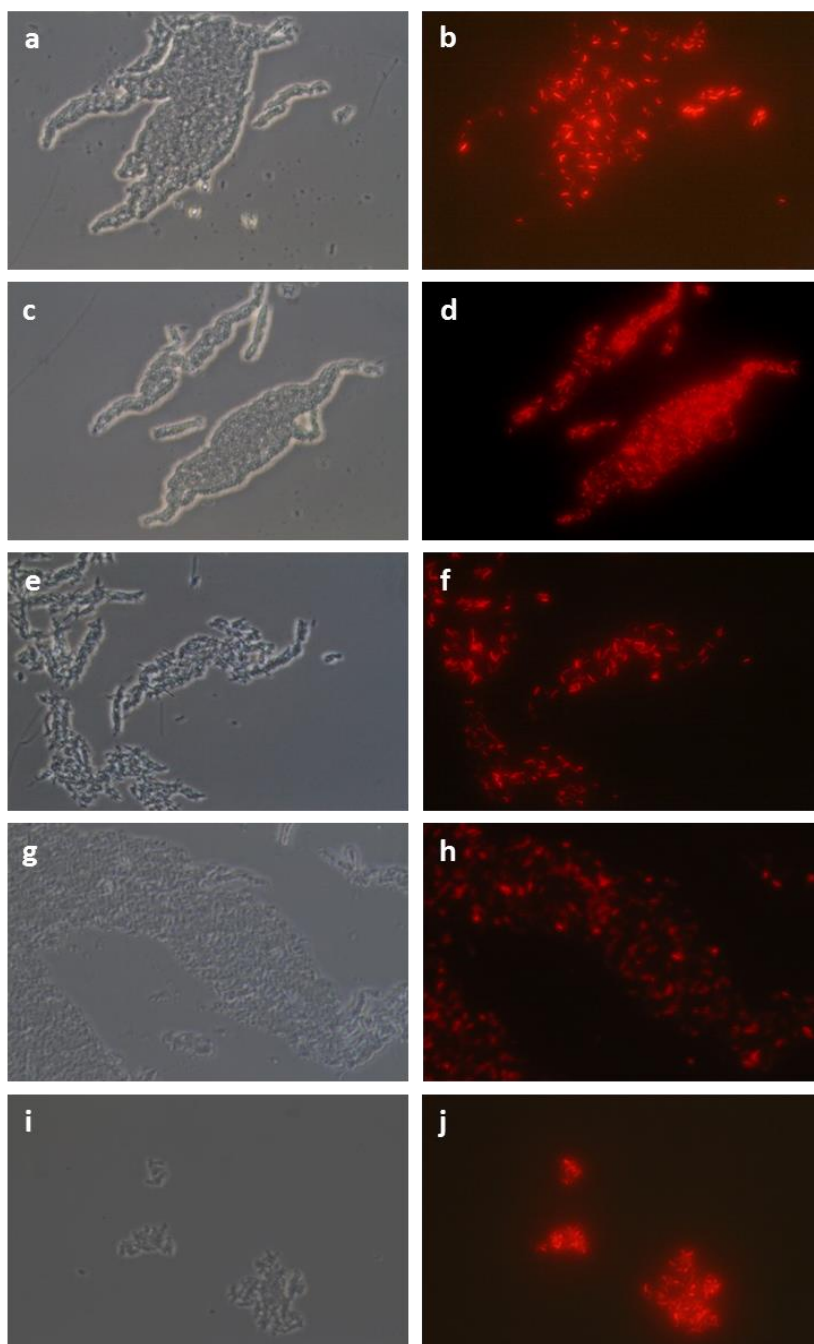


Figura 25. Seguimiento de la fluorescencia de *M. tb mc26230*, posterior a la infección con Φ mCherry_{bomb}. Los paneles a, c, e, g, i - corresponden a contraste de fase, b - Infección de *M. tb mc²6230* primera semana, d - Infección de *M. tb mc²6230* segunda semana, f - Infección de *M. tb mc²6230* tercera semana, h - Infección de *M. tb mc²6230* cuarta semana, j - Infección de *M. tb mc²6230* décimo segunda semana.

CAPITULO III. EVALUACIÓN DE LA PERFORMANCE DE FLUOFAGOS PARA LA DETECCIÓN Y DETERMINACIÓN DE RESISTENCIA A RIFAMPICINA DE *Mycobacterium tuberculosis* DIRECTAMENTE EN ESPUTOS

Para el desarrollo de este objetivo se contó con la colaboración del Lab. de Bacteriología de la TBC del Instituto Vaccarezza, siendo el laboratorio de referencia de TB en la ciudad de Buenos Aires y en donde se realiza el diagnóstico de TB sensible y resistente usando métodos tradicionales y métodos rápidos automatizados. Durante el año 2015, el laboratorio recibió a 3314 pacientes, 4678 muestras de esputo de las cuales 996 resultaron ser positivas y de ellas 51 resistentes a RIF.

Es de resaltar el importante y complejo trabajo que realiza este laboratorio, lo cual permitió comparar la performance del método del FluoFago con metodologías aceptadas por la OMS. Cotidianamente, todas las muestras pulmonares recibidas por el Lab. de la TBC son decontaminadas usando el método de Petroff modificado descripto anteriormente y el pellet es usado para realizar la tinción ZN - Baciloscopía (BK), otra parte es usada para cultivar en medio LJ y si es una muestra con alta carga bacilar, lo cual se determina por la BK se realiza el antibiograma directo, usando el método de las proporciones o MGIT. La determinación de resistencia usando este último método, solo se realiza si se trata de una muestra proveniente de un paciente que presente algún factor de riesgo de estar cursando una TB resistente (VIH positivos, diabéticos, oncológicos, contacto con pacientes TB-MDR, abandono de tratamiento, TB recurrente, personal de salud, personas que hayan estado en países con alta incidencia de TB resistente). El material remanente posterior a todo el proceso descripto con anterioridad, fue cedido para realizar la validación del método basado en el empleo de FluoFagos para el diagnóstico de *M. tb* y la resistencia a RIF, fármaco de importancia ya que es indicador de TB-MDR al encontrarse muchas veces asociado a la resistencia en simultáneo con la INH.

Diseño I. Diagnóstico de *Mycobacterium spp* directamente en muestras de esputo

En una instancia inicial se planteó el Diseño I, en el cual se evaluaron 446 esputos y solamente se diagnosticó la presencia de micobacterias viables en la muestra. Para el

desarrollo de este objetivo el remanente de pellet se recuperó en medio Middlebrook 7H9 + OADC + PANTA a 37°C durante tiempos variables (de 24 horas a 8 días), transcurrido estos tiempos se infectó con Φ mCherry_{bomb} durante toda la noche a 37°C, posteriormente las muestras se fijaron con PFA 2% final durante 2 horas a temperatura ambiente, se centrifugaron y el pellet se resuspendió en 10 μ l de PBS. Se prepararon los portaobjetos y se observaron 100 campos por microscopía de fluorescencia usando el objetivo 100x. Los resultados generales obtenidos son mostrados en la tabla 5, en donde se relacionan la cantidad de muestras clínicas coincidentes y discordantes entre el empleo del FluoFago y el cultivo en medio LJ. Los resultados de la baciloscopía (BK) no se tuvieron en cuenta, ya que la presencia de bacilos usando esta metodología no es indicadora definitiva de la presencia de la enfermedad; ya que en muchos casos una persona puede continuar con BK (+) durante algunos meses pero con cultivos negativos, indicando la presencia de bacilos no viables en la cavidad pulmonar.

Tabla 5. Eficiencia del FluoFago Φ mCherry_{bomb} en la detección de *Mycobacterium spp.* en muestras de esputo comparado con el cultivo en LJ.

	Cultivo (+)	Cultivo (-)	Σ
FluoFago (+)	270	5	275
FluoFago (-)	62	109	171
Σ	332	114	446

La tabla 5 indica que el 84,97% de las muestras fueron concordantes entre los dos métodos comparados mientras que el 13,90% (62 muestras) dieron negativas por el método del FluoFago pero positivas por cultivo, una explicación preliminar para esta discordancia es que sólo se empleó el remanente de la muestra inicial lo cual sugiere que allí la cantidad de bacilos que se pueden encontrar es mucho menor o que las condiciones metabólicas de los bacilos no fueron las óptimas para que puedan ser detectados con nuestra metodología.

De los resultados anteriores podemos concluir que el método del FluoFago respecto al cultivo en medio LJ presento 81,3% y 95,6% de sensibilidad y especificidad, respectivamente para la detección de *Mycobacterium spp* directamente en muestras de

esputo. Los resultados se obtuvieron entre 24 horas y 8 días disminuyendo notablemente el tiempo para la detección en comparación con el método de cultivo.

Diseño II. Diagnóstico y determinación de resistencia a RIF de *Mycobacterium spp* directamente en muestras de esputo

El diseño II estuvo conformado por la evaluación de 283 muestras clínicas con las cuales se propuso evaluar la capacidad de los FluoFagos para el diagnóstico de la enfermedad y la resistencia a RIF. Para esta segunda parte, los remanentes cedidos se recuperaron en 3 ml de medio Middlebrook 7H9 suplementado con OADC y PANTA durante 48 horas a 37°C, posteriormente las muestras se centrifugaron y el pellet se resuspendió en 400µl de medio nuevo suplementado. A partir de este momento, la muestra anterior se dividió en 4 alícuotas de 100µl cada una; dos de ellas se infectaron en el momento de dividir la muestra, es decir a las 48 horas post-recuperación, y la infección con *mCherry_{bomb}* se realizó en presencia de RIF 4µg/ml y en ausencia del fármaco. Las otras dos alícuotas restantes se infectaron cuando completaron las 96 horas post-recuperación, de igual forma, la infección se realizó en presencia y ausencia de RIF. Las infecciones se llevaron a cabo durante la noche a 37°C y se terminaron de procesar de la misma forma descrita para el diseño I. Para este diseño, se tuvo en cuenta la cantidad de bacilos fluorescentes presentes en 100 campos haciendo las visualizaciones con el objetivo de 100x. Una muestra se registró como positiva cuando se observó uno o más bacilos en 100 campos; sin embargo, para el análisis estadístico también se tuvo en cuenta como punto de corte la presencia de dos o más bacilos en 100 campos. Esto con la finalidad de tener una idea de que tan rigurosos deben ser los puntos de corte al emplear la metodología de los FluoFagos.

En la Tabla 6 se observan los resultados generales obtenidos comparando los dos métodos cuando la infección se realizó 48 horas post-recuperación. En color negro se registran los datos cuando se tuvo en cuenta una muestra como positiva al observar uno o más bacilos en 100 campos y en color azul cuando se tuvo en cuenta como punto de corte para determinar la positividad de una muestra la presencia de dos o más bacilos en 100 campos.

Cuando la recuperación se realizó por 48 horas, el 67,84% de las muestras clínicas presentaron resultados concordantes entre ambos métodos (192 muestras), mientras que el 32,15% (91 muestras) no fueron detectadas por Φ mCherry_{bomb} pero si cultivaron en medio LJ, los datos anteriores corresponden cuando se usó como punto de corte la presencia de 1 o más bacilos en 100 campos.

Tabla 6. Datos globales de la detección de *Mycobacterium spp.* infectadas a las 48 horas post-recuperación usando el método del FluoFago Vs. cultivo en medio LJ, usando diferentes puntos de corte.

	Cultivo (+)	Cultivo (-)	Σ
FluoFago (+)	96, 93	0, 0	96, 93
FluoFago (-)	91, 94	96, 96	187, 190
Σ	187	96	283

En color negro se registran los resultados obtenidos (número de muestras) cuando se usó como criterio de positividad la presencia de 1 o más bacilos en 100 campos, en color azul se registran los obtenidos al usar como criterio la presencia de 2 o más bacilos en 100 campos.

Cuando se aumentó el criterio para determinar una muestra como positiva a dos o más bacilos en 100 campos, se obtuvo que el 66,78% de las muestras clínicas fueron concordantes entre ambos métodos (189 muestras), mientras que el 33,21% (94 muestras) no se detectaron por el FluoFago pero si cultivaron.

Con el fin de evaluar si a mayor tiempo de recuperación previo a la infección era posible mejorar la detección de *M. tb*, se realizaron infecciones 96 horas post-recuperación y se observó que un 93,99% (266 muestras) fueron concordantes entre los dos métodos y tan solo un 5,3% correspondiente a 15 muestras no fueron detectadas por el FluoFago pero si cultivaron, los datos anteriores corresponden al establecer como criterio de positividad la presencia de 1 bacilo fluorescente o más en 100 campos (Tabla 7). Resultados similares fueron observados cuando se cambió el criterio de positividad a dos o más bacilos fluorescentes en 100 campos, en donde un 93,63% (265 muestras) fueron concordantes y tan sólo el 5,65% correspondiente a 16 muestras no fueron detectadas por el método del FluoFago (Tabla 7).

Tabla 7. Datos globales de la detección de *Mycobacterium spp.* infectadas a las 96 horas post-recuperación usando el método del FluoFago Vs. cultivo en medio LJ, usando diferentes puntos de corte.

	Cultivo (+)	Cultivo (-)	Σ
FluoFago (+)	172, 171	2, 2	174, 173
FluoFago (-)	15, 16	94, 94	109, 110
Σ	187	96	283

En color negro se registran los resultados obtenidos (número de muestras) cuando se usó como criterio de positividad la presencia de 1 o más bacilos en 100 campos, en color azul se registran los obtenidos al usar como criterio la presencia de 2 o más bacilos en 100 campos.

Al comparar los resultados de las muestras concordantes de las tablas 6 y 7, realizando la infección luego de 48 o 96 horas, respectivamente y usando como punto de corte la presencia de un bacilo o más, se observa un aumento en la detección de *M. tb* de 67,84% (192 muestras) a 93,99% (266 muestras) siendo esta diferencia del 26,15%. Estos resultados indican que a mayor tiempo de recuperación de las muestras antes de realizar el proceso de infección mayor es la probabilidad de detección para diagnosticar la enfermedad con FluoFagos.

Con estos datos, se calcularon diversos parámetros estadísticos para comparar la performance del FluoFago Vs. Cultivo en medio LJ. Como se muestra en la Tabla 8, se registra un aumento en la sensibilidad del método del FluoFago para diagnosticar la presencia de TB cuando se incrementa el tiempo de recuperación de la muestra, siendo de aproximadamente 50% y 91% para 48 y 96 horas, respectivamente. La especificidad del método en todos los casos es del 97,92% - 100%, el resultado de este último parámetro es esperable puesto que Φ mCherry_{bomb} presenta un rango de huésped limitado y solo puede infectar bacterias del género *Mycobacterium*.

Los valores predictivos miden la eficacia real de una prueba diagnóstica, en este caso es la probabilidad de padecer o no TB una vez conocido el resultado empleando FluoFagos. Este es un parámetro post-prueba diagnóstica y los resultados dependen de la prevalencia de la enfermedad, es decir del porcentaje de la población que se ve afectada por TB.

Los VPP's (Valor Predictivo Positivo), indican la probabilidad de tener TB si el resultado obtenido con el FluoFago es positivo. Los VPP's más bajos al relacionar los dos métodos correspondieron a 98,85% y 98,94% cuando las muestras se recuperaron durante 96 horas; seguido de 100% para las muestras que fueron infectadas 48 horas post-recuperación. Estos datos indican que de cada 98,85% - 100% de los esputos diagnosticados como TB (+) resultaron ser verdaderamente muestras provenientes de pacientes con TB cuando el método del FluoFago así lo determinó. Es decir que estos pacientes fueron diagnosticados como realmente enfermos cuando se obtuvo el resultado usando el método de cultivo en LJ (Tabla 8). Los VPP dependen de forma importante de la prevalencia de la enfermedad, ya que al aumentar la prevalencia, aumenta el VPP lo cual se debe fundamentalmente a que disminuye el número de falsos positivos.

Los VPN's (Valores Predictivos Negativos), indican la probabilidad de no tener TB si el resultado de la prueba con el FluoFago es negativo, es decir que sea diagnosticado de forma correcta cuando es un paciente verdaderamente sano. En el presente estudio los VPN's oscilan entre 50,53% y 85,45%, observándose claramente una mayor probabilidad de diagnosticar de forma correcta cuando se incrementan los tiempos de recuperación de la muestra a 96 horas (Tabla 8).

Tabla 8. Evaluación de la performance para el diagnóstico de TB con el FluoFago Φ mCherry_{bomb} Vs. cultivo en medio LJ.

Condición	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)	Intervalo de Confianza 95%	Kappa
48hs \geq 1	51,34	100	100	51,34	0,6206 – 0,7325	0,4172
48hs \geq 2	49,73	100	100	50,53	0,6097 – 0,7225	0,4016
96hs \geq 1	91,98	97,92	98,85	86,24	0,9056 – 0,9646	0,8703
96hs \geq 2	91,44	97,92	98,94	85,45	0,9013 – 0,9619	0,863

Por último, al analizar los resultados obtenidos al calcular el índice de Kappa para las cuatro condiciones, cuando se recuperaron las muestras durante 48 horas y usando la presencia de un bacilo fluorescente en 100 campos como criterio para determinar una

muestra positiva, el índice de kappa fue de 0,4172 que indica que existe una concordancia moderada entre ambos métodos. Al aumentar el criterio de positividad a dos bacilos por 100 campos el índice de kappa disminuye a 0,4016 representando una concordancia débil. Al aumentar los tiempos de recuperación a 96 horas la concordancia obtenida fue 0.8703 y 0.863 empleando uno o dos bacilos cada 100 campos, respectivamente y aunque se observa una leve disminución al emplear el criterio de dos bacilos positivos en 100 campos la concordancia entre ambos métodos es muy buena en ambos casos. Estas interpretaciones del índice kappa están basadas en la propuesta por López (López et al. 2001).

De las 283 muestras clínicas evaluadas en el diseño II, 187 fueron confirmadas positivas para TB por el método de cultivo en medio LJ. En la Tabla 9, se registran los datos globales obtenidos de la determinación de resistencia a RIF infectadas a las 48 horas post-recuperación. En color negro se registran los datos obtenidos cuando se tuvo en cuenta una muestra como positiva cuando se observaron uno o más bacilos en 100 campos y en color azul cuando se tuvo en cuenta como punto de corte para determinar la positividad de una muestra la presencia de dos o más bacilos en 100 campos.

Los resultados obtenidos realizando 48 horas de recuperación previo a la infección con el FluoFago, demuestran que se obtuvo un 94,11% (176 muestras) de concordancia entre ambos métodos, de las cuales se identificaron 4 muestras, correspondientes al 2,13%, resistentes a RIF. Sin embargo, un 5,34% (10 muestras) fueron determinadas como sensibles a RIF por el método del FluoFago y resistentes por el método de las proporciones; los resultados previamente descritos corresponden al establecer como punto de corte la presencia de uno o más bacilos fluorescentes en 100 campos.

Tabla 9. Datos globales de la determinación de resistencia a RIF en muestras de esputo infectadas a las 48 horas post-recuperación usando el método del FluoFago Vs. cultivo en medio LJ, usando diferentes puntos de corte.

	Cultivo RIF ^R	Cultivo RIF ^S	Σ
FluoFago RIF ^R	4, 3	1, 1	5, 4
FluoFago RIF ^S	10, 11	172, 172	182, 183
Σ	14, 14	173, 173	187

Al cambiar el punto de corte a dos bacilos o más se obtuvieron resultados similares. Disminuyendo tan solo un 0,53% (correspondiente a una muestra) los resultados concordantes y aumentando de 5,29% a 5,88% la cantidad de muestras determinadas como sensibles a RIF utilizando Φ mCherry_{bomb} y como resistentes a RIF por el método de las proporciones (Tabla 9).

Tabla 10. Datos globales de la determinación de resistencia a RIF en muestras de esputo infectadas a las 96 horas post-recuperación usando el método del FluoFago Vs. cultivo en medio LJ, usando diferentes puntos de corte.

	Cultivo RIF ^R	Cultivo RIF ^S	Σ
FluoFago RIF ^R	14, 14	2, 1	16, 15
FluoFago RIF ^S	0, 0	171, 172	171, 172
Σ	14, 14	173, 173	187

Al aumentar el tiempo de recuperación de las muestras a 96 horas antes de realizar la infección con el FluoFago, aumentó la concordancia entre los métodos al 98,93% siendo evidente el aumento en la determinación de muestras resistentes a RIF con el método del FluoFago, detectándose la totalidad de las muestras determinadas como tal usando el método de las proporciones (Tabla 10). Se registraron solamente dos muestras discordantes, determinándose como resistentes a RIF con el FluoFago y como sensibles por el método de las proporciones. Los datos descriptos corresponden cuando se empleó como criterio de positividad la presencia de un bacilo o más en 100 campos, datos registrados en color negro. Cuando se analizan los datos registrados al aumentar el criterio de positividad a dos bacilos o más en 100 campos (datos en color azul), los resultados son muy semejantes disminuyendo a solo un caso la discordancia obtenida al comparar los dos métodos.

Considerando los datos registrados en las Tablas 9 y 10, podemos inferir que para realizar la determinación de muestras resistentes a RIF de forma correcta usando el método en validación se sugiere aumentar los tiempos de recuperación antes de llevar a cabo el proceso de infección. Probablemente, este tiempo de recuperación se pueda reducir obteniendo resultados similares si se cuenta con una muestra clínica completa para poder hacer el diagnóstico de TB y su determinación de resistencia a RIF por el método del FluoFago.

Con los resultados obtenidos de las 187 muestras clínicas del diseño II que resultaron positivas para TB por cultivo en medio LJ, se determinaron los parámetros estadísticos para comparar la *performance* y resistencia a RIF de los FluoFagos con el método de las proporciones aceptado por la OMS como método de referencia (Tabla 11).

Tabla 11. Evaluación de la performance para la determinación de *Mycobacterium spp.* resistente a RIF usando el método del FluoFago Φ mCherry_{bomb} Vs. Método de las proporciones.

Condición	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)	Intervalo de Confianza 95%	Kappa
48hs \geq 1	28,57	99,42	80,00	99,42	0,8972 – 0,9703	0,3973
48hs \geq 2	21,42	99,42	75,00	93,98	0,8906 – 0,9664	0,3104
96hs \geq 1	100	98,94	87,50	100	0,9619 – 0,9987	0,9275
96hs \geq 2	100	99,42	93,33	100	0,9706 – 0,999	0,9626

A partir de los resultados registrados en la Tabla 11, se nota un elevado incremento de la sensibilidad al aumentar los tiempos de recuperación de los esputos. Se logró detectar el 100% de los casos de muestras resistentes a RIF que fueron identificadas como tal por el método de referencia. En cuanto a los valores de especificidad se mantuvieron en un rango de 98,94% - 99,42% en las cuatro condiciones evaluadas, detectando correctamente las muestras TB sensibles a RIF; evitando así que a pacientes con TB sensible se les instaure un tratamiento con fármacos para tratar TB resistente, que en su mayoría son más tóxicos generando diversos efectos adversos en los pacientes. El índice kappa se hace mayor al incrementar el tiempo de recuperación, indicando una

concordancia muy buena entre los métodos cuando se recuperan las muestras durante 96 horas antes de realizar la infección con Φ mCherry_{bomb}.

Durante el desarrollo del diseño II, fue posible identificar 14 muestras clínicas de *Mycobacterium spp.* resistentes a RIF (Figura 26); 4 de ellas se identificaron cuando se realizó la infección a las 48 horas post-recuperación y las 10 restantes cuando se recuperaron durante 96 horas. Del total de muestras determinadas como resistentes a RIF, tres resultaron aislamientos identificados *a posteriori* como TB-XDR y uno como TB-preXDR remarcando la importancia del diagnóstico temprano de resistencia a RIF en muestras clínicas.

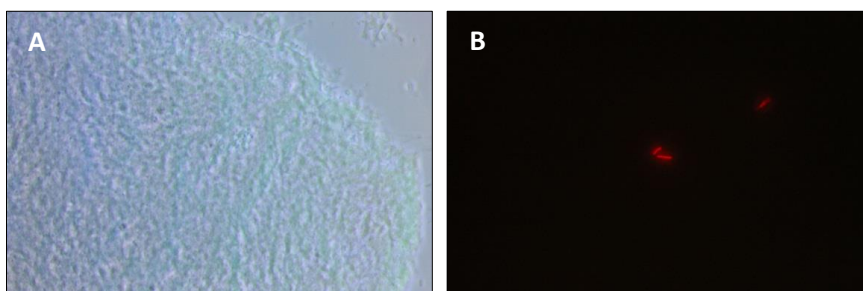


Figura 26. Microfotografía de una infección de esputo realizada con Φ mCherry_{bomb} en presencia de RIF 4 μ g/ml. A-contraste de fase, B-microscopía de fluorescencia. Aumento 100x.

Relación entre el número de bacilos fluorescentes detectados y el número de UFC presentes en la muestra.

Al revisar la ficha clínica de los pacientes con los cuales se obtuvieron los resultados discordantes, varias de ellas coinciden con muestras clínicas provenientes de personas que se encontraban en el momento de la toma de la muestra (esputo) en tratamiento para el control de la TB; este factor permite inferir que los bacilos presentes en el esputo estaban siendo afectados por los fármacos y/o los bacilos presentes ya se encontraban en un bajo número y por lo tanto no se pudieron detectar usando el FluoFago pero si por cultivo. Es de resaltar que el medio LJ, ofrece los nutrientes necesarios para el óptimo crecimiento de las micobacterias; y el tiempo de incubación de los cultivos (30 – 40 días) permite la recuperación y replicación de los bacilos que pueden estar presentes, a pesar de que la carga inicial bacteriana en la muestra sea baja.

En vista que la cantidad de bacilos presentes en el remanente es un factor influyente en la detección de *M. tb* usando el método del FluoFago, decidimos evaluar la relación entre los bacilos fluorescentes observados en 100 campos posterior a la infección con Φ mCherry_{bomb} y las UFC desarrolladas en el cultivo en medio LJ a los diferentes tiempos de recuperación. En la Figura 27 se observa que existe una relación directa entre el número de colonias desarrolladas en medio de cultivo LJ y la cantidad de bacilos detectados por microscopía de fluorescencia. Cuando se infecta con el FluoFago recuperando las muestras previamente durante 48 horas, se detecta una muy baja cantidad de bacilos fluorescentes (1-2) cuando se reporta un crecimiento de 20-100 colonias, sin embargo esta cantidad aumenta a un promedio de 13 a 27 bacilos en 100 campos cuando existe un crecimiento superior a 100 colonias.

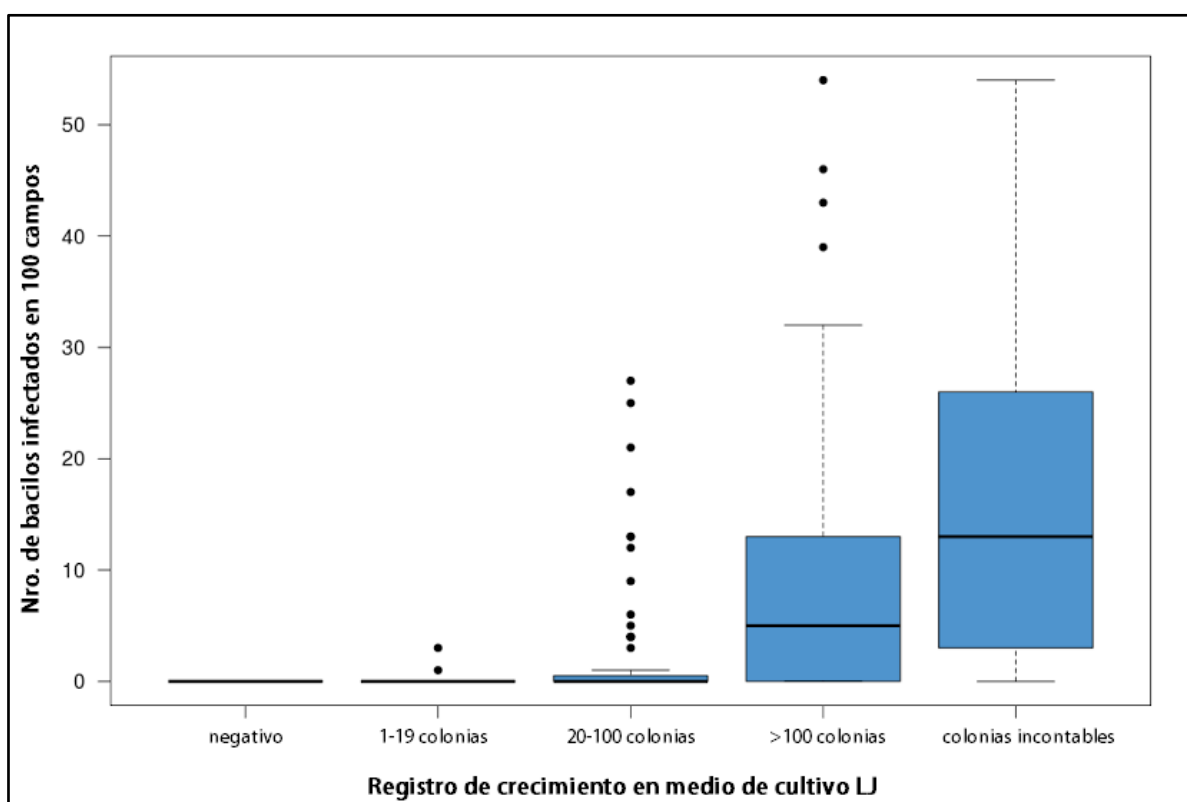


Figura 27. Relación entre el número de bacilos infectados con Φ mCherry_{bomb} a las 48 horas post-recuperación y las UFC desarrolladas en medio LJ.

La cantidad de bacilos detectados por microscopía de fluorescencia se vio incrementada cuando el tiempo de recuperación se realizó durante 96 horas previo a la infección, como se observa en la Figura 28. A pesar de registrarse un escaso crecimiento en medio de

cultivo LJ (1 – 19 colonias), fue posible detectar un promedio de 8 bacilos en 100 campos y a medida que aumentó la presencia de colonias se observaron más bacilos. Si se comparan las Figuras 27 y 28, nuevamente podemos inferir que el tiempo de recuperación es un parámetro importante que permite mejorar la sensibilidad del método en evaluación, aumentando la probabilidad de observar un mayor número de bacilos que expresan la proteína fluorescente.

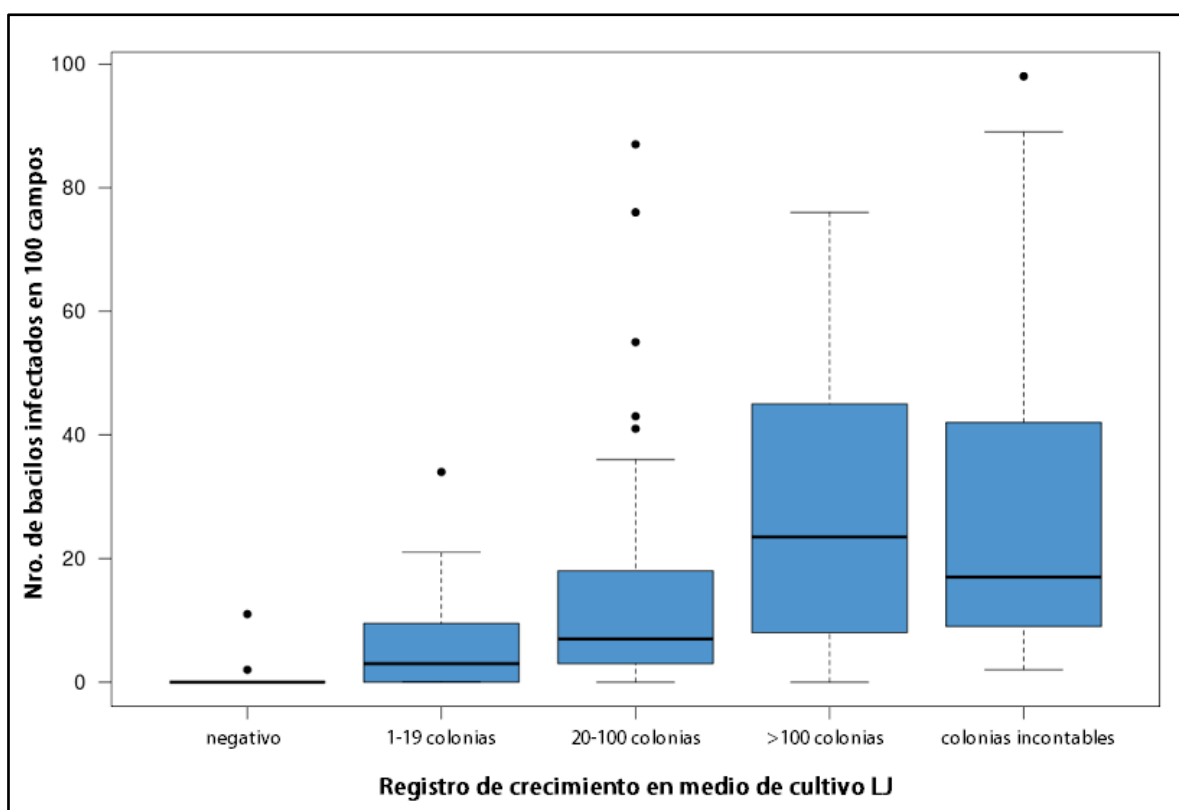


Figura 28. Relación entre el número de bacilos infectados con $\Phi mCherry_{bomb}$ a las 96 horas post-recuperación y las UFC desarrolladas en medio LJ.

Evaluación de muestras discordantes a partir de cultivos

Al evaluar la *performance* del FluoFago para la detección de *Mycobacterium spp.* en esputo, fueron de particular interés aquellas muestras que resultaron negativas por el método del FluoFago y positivas por cultivo aún luego de 96 horas de recuperación de la muestra (Tabla 7). Con la finalidad de tratar de inferir lo que sucedía con estos resultados discordantes, se infectaron cultivos obtenidos a partir de estas mismas muestras con $\Phi mCherry_{bomb}$ durante toda la noche a 37°C y seguidamente las muestras fueron tratadas de la misma manera descrita anteriormente para analizarlas por microscopía de

fluorescencia. En la figura 29, se muestran los resultados obtenidos después de la infección de una de las muestras que inicialmente resultaron discordantes entre los métodos. Todos los cultivos fueron exitosamente infectados permitiendo argumentar que la discordancia inicial se pudo deber a la ausencia o muy baja cantidad de bacilos presentes en el remanente y/o a la necesidad de aumentar los tiempos de recuperación que permita la reactivación metabólica de los bacilos presentes. Estos resultados demuestran que la discordancia presentada no es una consecuencia de un proceso de resistencia a la infección con FluoFagos en los aislamientos analizados.

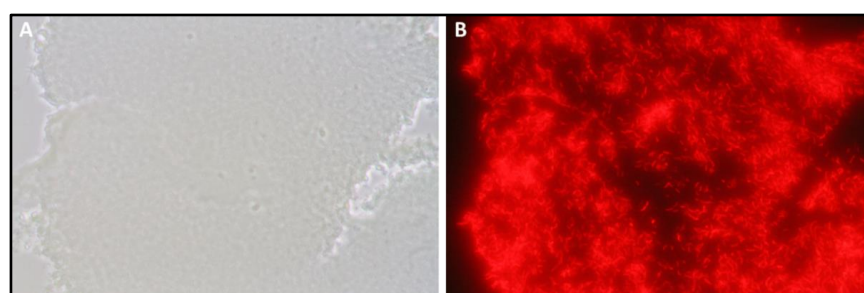


Figura 29. Infección con FluoFago de cultivo proveniente del MGIT correspondiente al paciente p5317.

Infección con FluoFagos en muestras contaminadas

Una ventaja adicional de los FluoFagos es que a pesar de la presencia de microorganismos contaminantes que hayan podido quedar como resultado de una inadecuada decontaminación de la muestra clínica o mala manipulación, es posible identificar las micobacterias viables presentes en la muestra. En la Figura 30 se observa un agregado típico de micobacterias rodeado de cocobacilos contaminantes que no alteran la detección de los bacilos fluorescentes en la muestra. De acuerdo a las normas y guía técnica de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) para el diagnóstico microbiológico de la TB (OPS 2008), la contaminación aceptada cuando se utiliza el método de Petroff para la decontaminación de muestras clínicas no debe superar el 4% sobre el total de tubos sembrados, este porcentaje puede ser aceptado hasta en un 9% si se utilizan medios de cultivo con mayor enriquecimiento como es el caso del MGIT. En varias ocasiones, los problemas de contaminación pueden conllevar a un retraso en el diagnóstico de la enfermedad, propiciando la diseminación de la enfermedad y de cepas resistentes.

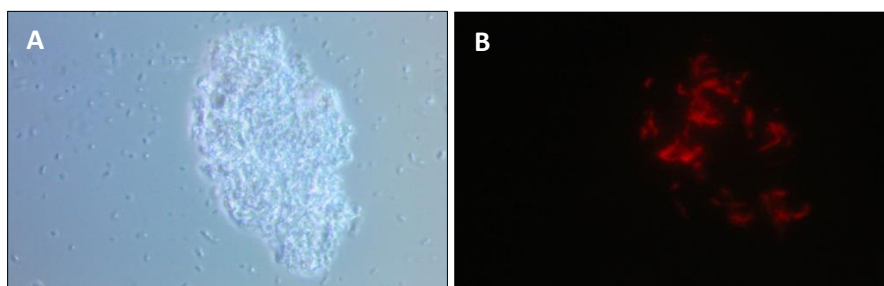


Figura 30. Microfotografías de infecciones en muestras de esputo con FluoFagos usando un aumento de 100x. A) Contraste de Fase B) Microscopía de fluorescencia.

Diferenciación entre especies del complejo tuberculosis y micobacterias no tuberculosas

Durante el desarrollo experimental del diseño I cuando se evaluó la eficiencia en el diagnóstico de TB usando el FluoFago, se identificaron como positivas para TB muestras clínicas que al realizar los aislamientos se identificaron como *M. kansasii*, *M. szulgai* y *M. fortuitum*. Mientras que durante la evaluación del diseño II resultaron 2 muestras clínicas resistentes a RIF, que correspondieron a *M. abscessus* y *M. avium*.

Al conocer la clasificación de estas especies, que fueron reconocidas por Φ mCherry_{bomb}, se planteó evaluar una estrategia que permitiera distinguir entre *M. tb* y micobacterias atípicas o no tuberculosas. Para ello, se evaluó la actividad del ácido p-nitrobenzoico (PNB) que inhibe selectivamente a las especies del complejo *M. tb*.

Se crecieron cultivos de *M. tb* usado como control y de las micobacterias atípicas identificadas durante el estudio hasta fase exponencial. De cada uno de los cultivos se tomaron tres alícuotas, una usada como control de infección y las restantes fueron incubadas con 500µg/ml de PNB a 37°C durante 24 y 48 horas. Posterior a los tiempos de incubación, las muestras se centrifugaron y el pellet se resuspendió en medio nuevo; se realizó la infección con Φ mCherry_{bomb} y se procedió como se explicó anteriormente hasta su visualización por microscopía de fluorescencia. En la figura 31, se muestran los resultados de la infección de las diferentes especies micobacterianas al exponerlas previamente a PNB. Se observó una inhibición de *M. tb* a las 24 horas de incubación, mientras que las otras especies fueron infectadas por el FluoFago. De estos resultados

inferimos que la incubación con PNB es una alternativa que permite de forma rápida identificar la presencia de *M. tb*, especie bacteriana de importancia a nivel de salud pública. Al ser infectadas otras especies micobacterianas, se amplían las posibilidades para que esta nueva metodología basada en fagos reporteros sea implementada ofreciendo una primer aproximación en el diagnóstico de otras micobacterias de interés.

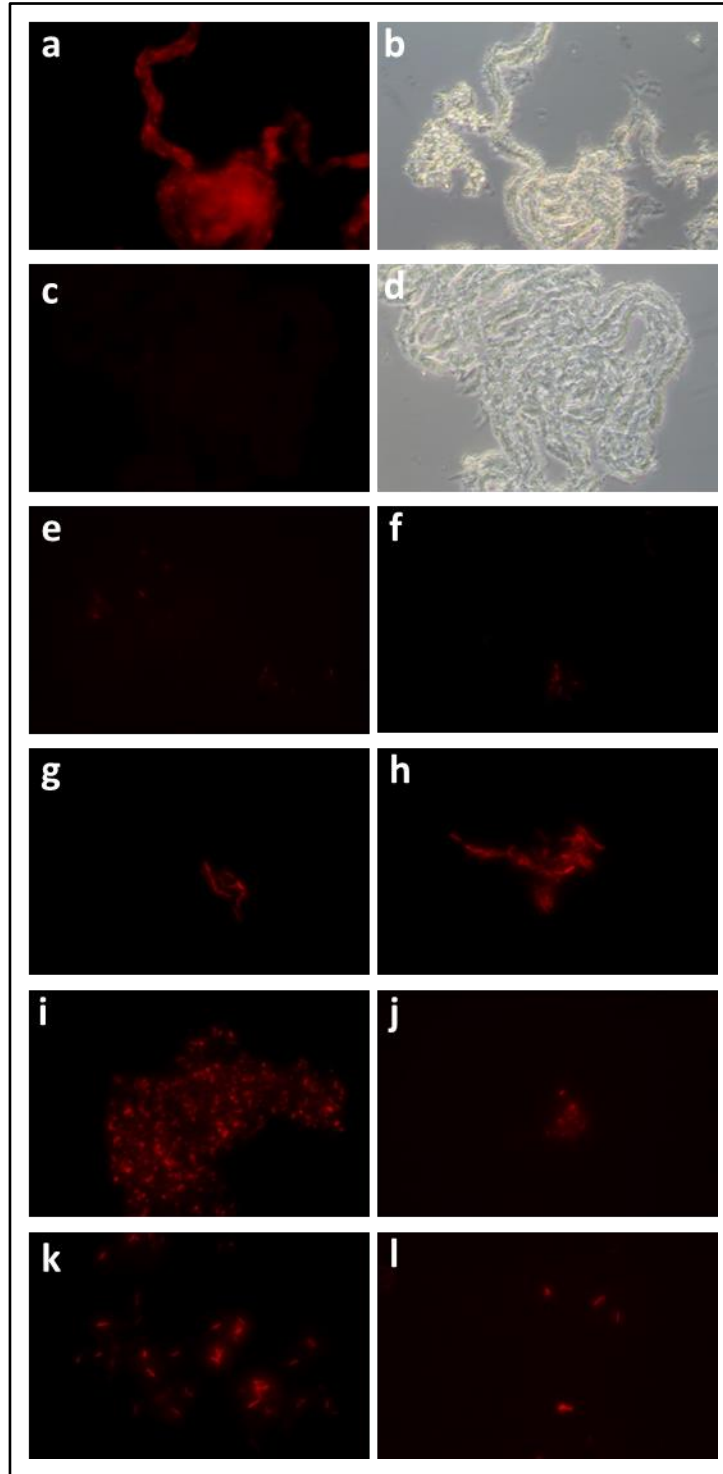


Figura 31. Efecto del PNB en la inhibición de micobacterias. a- *M. tb* sin PNB, b- Contraste de fase de *M. tb* sin PNB, c- *M. tb* + PNB, d- Contraste de fase de *M. tb* + PNB, e- *M. szulgai* + PNB, f- *M. szulgai* sin PNB, g- *M. kansasii* + PNB, h- *M. kansasii* sin PNB, i- *M. fortuitum* + PNB, j- *M. fortuitum* sin PNB, k- *M. abscessus* + PNB, l- *M. abscessus* sin PNB

Determinación de resistencia a diferentes fármacos a partir de aislamientos clínicos TB-XDR empleando FluoFagos

Finalmente, se planteó examinar de forma extendida el patrón de resistencia de dos aislamientos que fueron identificados como Rifampicina resistente con FluoFagos y posteriormente como TB-XDR en los registros del Lab. de la TBC.

Para ello, se crecieron los cultivos hasta fase exponencial y se tomaron 10 alícuotas de 100µl de cada cultivo, una de ellas se usó como control de la infección y las restantes se incubaron durante 24 horas en presencia de los siguientes fármacos empleados en el tratamiento de la TB: isoniacida, estreptomycin, ofloxacina, etambutol, kanamicina, capreomicina, levofloxacina, etionamida y amikacina. Posteriormente, los cultivos se infectaron con el FluoFago durante toda la noche a 37°C, transcurrido este tiempo se fijaron con PFA 2% final y se procesaron para ser visualizadas por microscopía de fluorescencia. Los resultados obtenidos por el método del FluoFago se compararon con los registrados en la base de datos de estos pacientes, en donde previamente se realizó la determinación de resistencia por métodos de referencia (Tabla 12).

Tabla 12. Determinación de los patrones de resistencia a partir de aislamientos clínicos usando el método del FluoFago.

Fármaco	Aislamiento 1		Aislamiento 2	
	<i>FluoFago</i>	<i>Referencia</i>	<i>FluoFago</i>	<i>Referencia</i>
Rifampicina	resistente	resistente	resistente	resistente
Isoniacida	resistente	resistente	resistente	resistente
Estreptomycin	resistente	sensible	sensible	sensible
Etambutol	sensible	resistente	sensible	resistente
Kanamicina	resistente	resistente	resistente	resistente
Capreomicina	sensible	sensible	resistente	resistente
Levofloxacina	resistente	resistente	sensible	resistente
Amikacina	resistente	sensible	sensible	sensible
Ofloxacina	sensible	sensible	resistente	resistente

Al comparar los resultados obtenidos por el método del FluoFago y el método de referencia, se observa una buena correlación para la mayoría de los fármacos evaluados. Sin embargo, también se presentan algunas discordancias, estos resultados surgen de ensayos preliminares lo cual sugiere que es necesario determinar la concentración mínima inhibitoria de éstos fármacos con la metodología de FluoFagos; de tal forma que se logre establecer una mejor correlación con los resultados reportados por métodos de referencia.

Aunque preliminares, estos resultados indican que los FluoFagos pueden ser empleados como una metodología rápida y simple para determinar el patrón completo de susceptibilidad a antibióticos de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*.

CAPITULO IV. ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO EPIDEMIOLÓGICAS DE LOS INDIVIDUOS PARTICIPANTES

Conocer las características clínico-epidemiológicas de los pacientes participantes de este estudio, quienes ingresaron al Lab. de Bacteriología de la TBC del Instituto de Tisioneumonología Dr. Raúl Vaccarezza – Hospital Muñiz de la ciudad de Buenos Aires; nos ofrece una primera aproximación del estado actual de la TB y nos permite conocer las características y factores que pueden influir en el desarrollo y éxito de curación de la enfermedad tuberculosa en esta población particular.

Los criterios de inclusión establecidos fueron aquellas personas que firmaron el consentimiento informado aprobado previamente por el comité de ética del Hospital Muñiz, en donde se avala el uso del remanente de esputo entregado al Lab. de la TBC con la finalidad de evaluar el método basado en el empleo de FluoFagos para el diagnóstico de *Mycobacterium spp.* Los criterios de exclusión establecidos fueron los pacientes con muestras clínicas diferentes al esputo, esputos salivares (muestras tomadas de forma incorrecta) y muestras de esputo con poca cantidad (volumen) que no permitía que quedara un mínimo de remanente posterior a las pruebas realizadas de forma rutinaria por parte del laboratorio. Las comparaciones para establecer una muestra como TB (+) se basó en el rescate de bacilos en el medio de cultivo Lowenstein Jensen.

Para ello, se realizó un estudio descriptivo – retrospectivo en el período comprendido de Julio del 2014 hasta Agosto del 2016, con los datos almacenados en las historias clínicas de los 425 pacientes colaboradores en este estudio. Las historias clínicas de internación, consultorios externos, dispensario y fichas epidemiológicas registradas tanto en el departamento de estadística del Hospital como consultorios externos y del Laboratorio de la TBC fueron revisadas con el fin de recopilar la información de interés para este estudio. Este trabajo requirió una búsqueda exhaustiva de la información durante meses, teniendo en cuenta que las historias clínicas no se encuentran en formato digital y un mismo paciente puede tener varias historias clínicas en diferentes áreas del hospital; inclusive algunas historias fueron inasequibles ya que requerían permisos especiales por encontrarse en el pabellón de personas privadas de la libertad.

Se elaboró una base de datos en la que se incluyeron los datos demográficos (edad, género, orientación sexual, nacionalidad, ocupación), datos clínicos (inmunosupresión asociada del tipo de infección VIH, enfermedades de transmisión sexual, oncológicos, diabetes y otras enfermedades asociadas con la TB), datos relacionados con el tratamiento (clasificación del paciente al ingreso, tipo de alta) y otros factores tales como el consumo de drogas ilícitas, consumo de alcohol, fuentes de contagio, condiciones de hacinamiento-prisión.

Es de importancia conocer los factores descriptos con anterioridad, ya que el riesgo de infectarse está determinado fundamentalmente por el número de fuentes de contagio existente en la población y está fuertemente influenciado por las condiciones de vida tanto en el ámbito social, económico y cultural.

Distribución por edad y género

Para analizar la distribución del desarrollo de TB respecto a la edad, se formaron los siguientes rangos etarios: 0-19, 20-34, 35-44, 45-64 y >65 años (Bossio et al. 2012). Posteriormente se aplicó el test no paramétrico de Wilcoxon para el análisis de muestras pareadas.

En la Figura 32 se presenta la distribución según grupo de edades, la TB afecta principalmente a adultos jóvenes con edades comprendidas entre los 20 – 34 años de edad (39,76%), sin embargo podemos inferir que otros rangos como los que comprenden individuos en edades entre los 35 – 44 años y de 45 – 64 años, también hacen un aporte importante en la estadística de distribución correspondiendo al 18,35% y 23,52%, respectivamente. Observándose una marcada disminución en personas mayores de 65 años (4,7%), este tipo de distribución es característico de los países en vía de desarrollo.

En países desarrollados, la proporción de casos aumenta a medida que se acerca a edades más avanzadas, alcanzando su pico máximo en personas mayores de 65 años. Esta situación se debe principalmente a ancianos con enfermedades crónicas que favorecen la reactivación de procesos antiguos de infección con *M. tb*.

En los grupos etarios que abarca desde los 20 a 64 años de edad que se ven mayormente afectados por TB, se presenta una mayor frecuencia de casos en hombres correspondiendo al 51,76% respecto al 29,88% en mujeres. A pesar de la pequeña población estudiada, estos resultados presentan el mismo comportamiento que los reportados por el SNVS. El 2,35% del porcentaje de frecuencia de casos en hombres está representado por personas del género masculino con otras orientaciones sexuales (masculinos bisexuales, masculinos homosexuales y transgénero). Al realizar el análisis de Wilcoxon teniendo en cuenta la población heterosexual se obtiene que $p= 0.02057$, lo que permite inferir que no existen diferencias significativas entre las poblaciones analizadas.

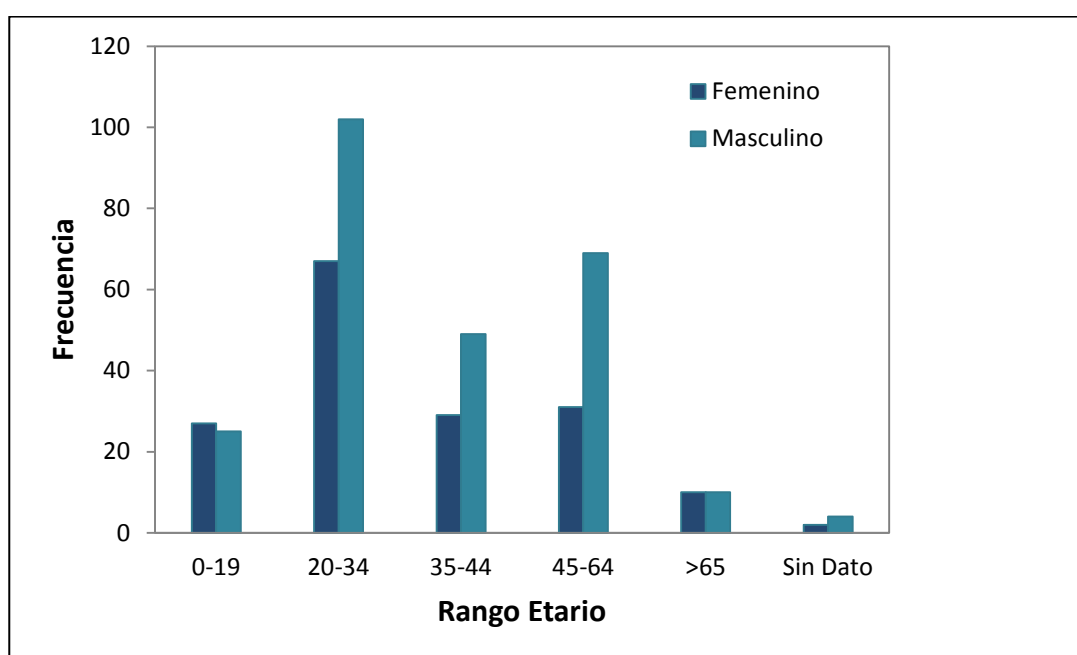


Figura 32. Distribución de la edad Vs. Género.

En la Figura 33 se representa la distribución de la edad comparándola con la población TB (+) y TB (-). Podemos inferir que a menor edad se presenta la mayor distribución de casos de TB (+) respecto a la población con diagnóstico negativo para TB, presentando además una edad promedio (mediana) menor que la población TB (-). El valor de $p=0.004489$ indica que existen diferencias significativas en la población TB (+) y TB (-) respecto a la edad.

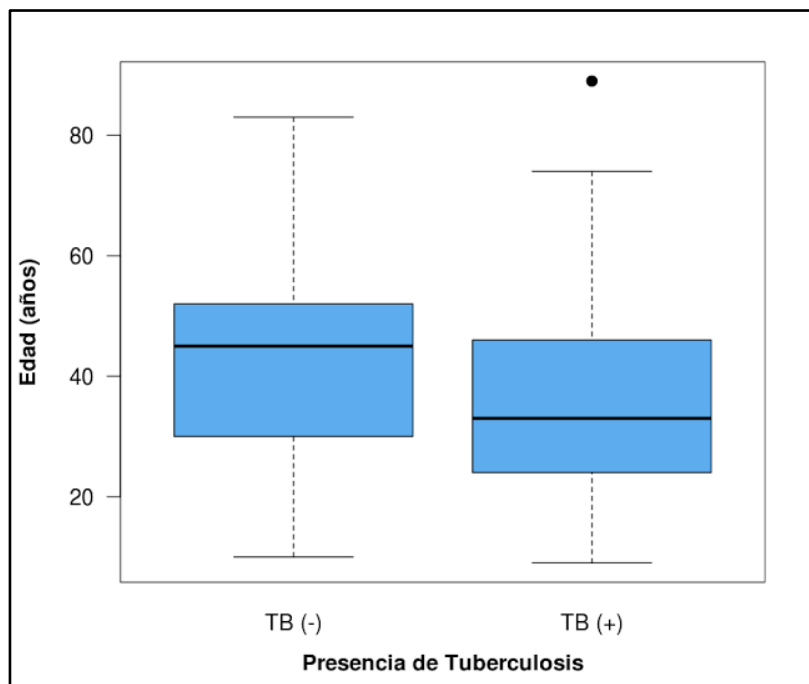


Figura 33. Relación de las presencia de TB Vs. Edad

Lo anteriormente expuesto muestra cómo la población en edad productiva, es la más afectada por la enfermedad, convirtiéndose esto en un grave problema debido a que una persona bacilífera puede llegar a contagiar entre 15 y 20 personas en un año de acuerdo a reportes y se deduce que en esta edad desarrollan actividades que generen ingresos económicos estando en contacto con otras personas aumentando la probabilidad de diseminar los bacilos (WHO 2016a).

Nacionalidad

En los últimos años uno de los factores que ha influido en el número de casos registrados de TB en la capital de Buenos Aires es la inmigración, gran parte de estas personas provienen de países suramericanos que registran una alta incidencia de la enfermedad tuberculosa y de TB resistente.

Datos difundidos por el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INDEC), indican que la Ciudad Autónoma de Buenos Aires es la jurisdicción con mayor proporción de población nacida en el extranjero, representando un 13,2% sobre la población; se estima que en su mayoría son provenientes de Bolivia, Perú y Paraguay.

De acuerdo a los datos de la situación de la TB en las Américas, entre los países con mayor incidencia de TB para la población del año 2014, se encuentran: Bolivia, Perú, Ecuador y Paraguay correspondiendo a 200, 120, 54 y 43 casos por cada 100000 habitantes, respectivamente (OPS 2015). Estos datos se ven reflejados en la Figura 34, en donde se relaciona la frecuencia de casos presentados respecto a la nacionalidad y diagnóstico de TB. La mayor frecuencia registrada en casos de personas con TB (+) de otras nacionalidades diferente a la Argentina, provienen de Bolivia (15,52%), seguido de Perú (6,11%) y Paraguay (3,05%).

De la población peruana que ingresa al Lab. de la TBC para realizar el diagnóstico de TB, el 84,61% (22 casos) son diagnosticados con la enfermedad tuberculosa y tan solo el 15,39% (4 casos) tienen diagnóstico negativo para TB. Este alto porcentaje de diagnóstico de TB (+) en la población que ingresa con sospecha de la enfermedad, son concordantes teniendo en cuenta que Perú, pese a las estrategias implementadas para reducir la enfermedad sigue ocupando el segundo lugar entre los países de América con la estadística más alta. Por otra parte, en personas de nacionalidad boliviana y paraguaya, el 71,21% (47 casos) y el 61,53% (8 casos), respectivamente fueron diagnosticados como TB (+); estos resultados se corresponden con la alta incidencia de TB que presentan estos países y su relación de inmigrantes en la Argentina. Finalmente, los países con menos casos representativos son Uruguay con 4 casos y Colombia que se encuentra representada por un único caso que resulto TB (+).

De los 110 pacientes extranjeros, el 72,72% (80 casos) se diagnosticaron TB (+). Un total del 14,58% correspondiente a 62 personas participantes del presente estudio no tienen registrada su nacionalidad.

Para analizar si existían variaciones en el rango de edad en que se presenta con mayor probabilidad la TB respecto a la nacionalidad, se realizaron dos grupos: argentinos y extranjeros. Se aplicó el test de Wilcoxon y no se observaron diferencias significativas entre las dos poblaciones respecto al desarrollo de la enfermedad, obteniendo un valor de $p=0.2673$.

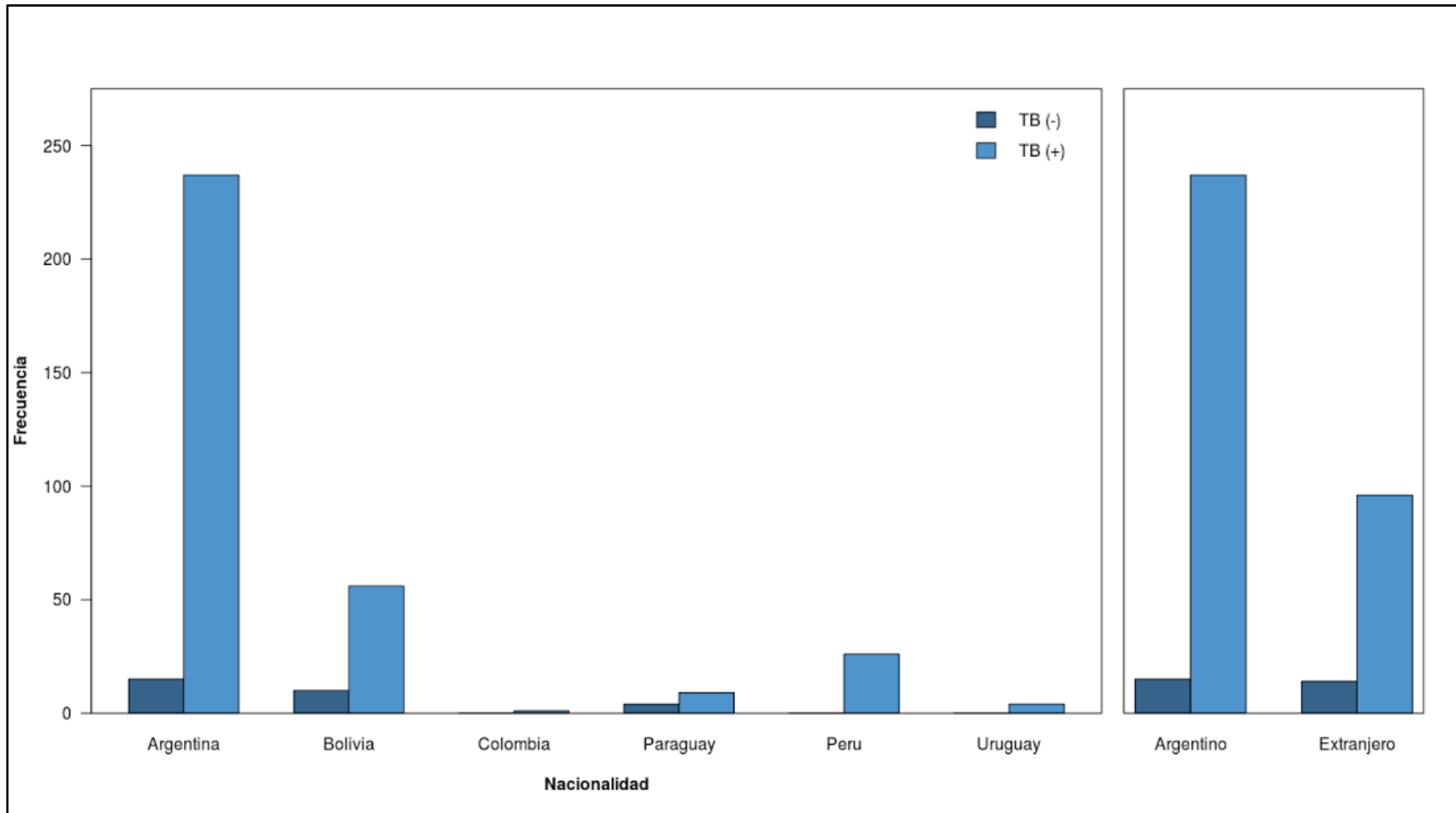


Figura 34. Frecuencia de los casos de TB Vs. Nacionalidades

TB Vs. VIH – SIDA y Diabetes (DBT)

La tuberculosis es la enfermedad infecciosa oportunista más frecuente en pacientes con infección por VIH – SIDA. Se puede presentar con cualquier nivel de linfocitos CD4, presentando un riesgo entre 21 a 34 veces mayor los pacientes con infección VIH que pacientes sin la infección y el riesgo de morir por TB en los pacientes inmunosuprimidos también se ve incrementado cuatro veces más que en pacientes VIH negativos (Shankar et al. 2014).

Actualmente la TB ocupa el primer lugar entre las infecciones oportunistas marcadoras del SIDA, siendo ésta en el ámbito local la primera patología que se presenta como comorbilidad en los casos diagnosticados TB (+). Para llevar a cabo este análisis se diferenció entre las personas con diagnóstico de TB (-) y pacientes negativizados, tomándose en cuenta como TB (-) los pacientes que ingresaron al Lab. de la TBC con sospecha de presentar la enfermedad tuberculosa con clasificación de ingreso "virgen", es decir que nunca tuvieron la enfermedad y no se presentó crecimiento de bacilos en medio de cultivo LJ. Mientras que los pacientes negativizados, son aquellos que tuvieron diagnóstico de TB (+), iniciaron tratamiento y lograron negativizar el cultivo, independientemente si se trata de tratamientos culminados o en tratamiento.

En la Figura 35, se observa que la población VIH (+) con diagnóstico de TB (-) representa el 3,33% (11 casos) mientras que al analizar la población TB (+) los casos de VIH corresponde al 24,24% (80 casos). Aplicando el análisis estadístico de Fisher, obtenemos un valor de $p=0.008769$, lo cual indica que existen diferencias significativas entre la población TB (+) y TB (-) respecto a la enfermedad del VIH – SIDA.

Otra de las asociaciones morbosas más frecuentes es la diabetes (DBT), los pacientes con DBT tienen un mayor riesgo de sufrir de TB, especialmente cuando la DBT es severa y de difícil control. Por otra parte, en algunos pacientes con VIH – SIDA y DBT requieren cambios y manejos terapéuticos diferentes respecto a los pacientes que no sufren de estas enfermedades. Al igual que el VIH – SIDA, la DBT aumenta el riesgo de contraer TB;

esto debido a que disminuye la función inmunitaria aumentando el riesgo de adquirir la infección tuberculosa (Ronacher et al. 2015).

Del total de la población diagnosticada con TB (+), el 5,88% (25 casos) padecían de DBT; mientras que la población TB (-) sólo un 0,23% (1 caso) no tenía DBT (Figura 35). A pesar de que la población en estudio es pequeña y se presentan desvíos en el muestreo, aparentemente se observa una mayor relación reportada de casos de DBT en pacientes con tuberculosis pero al realizar el análisis de Fisher obtenemos un valor de $p=0.4957$ sugiriendo que no existen diferencias significativas entre estas dos enfermedades

De los resultados obtenidos podemos inferir que las personas con VIH – SIDA presentan mayor probabilidad de desarrollar TB. Sin embargo, es importante recalcar que este análisis puede ser sesgado como consecuencia de un mayor número de casos cuyo diagnóstico fue TB (+) en comparación con el número de casos TB (-), tal como se observa en la figura 35.

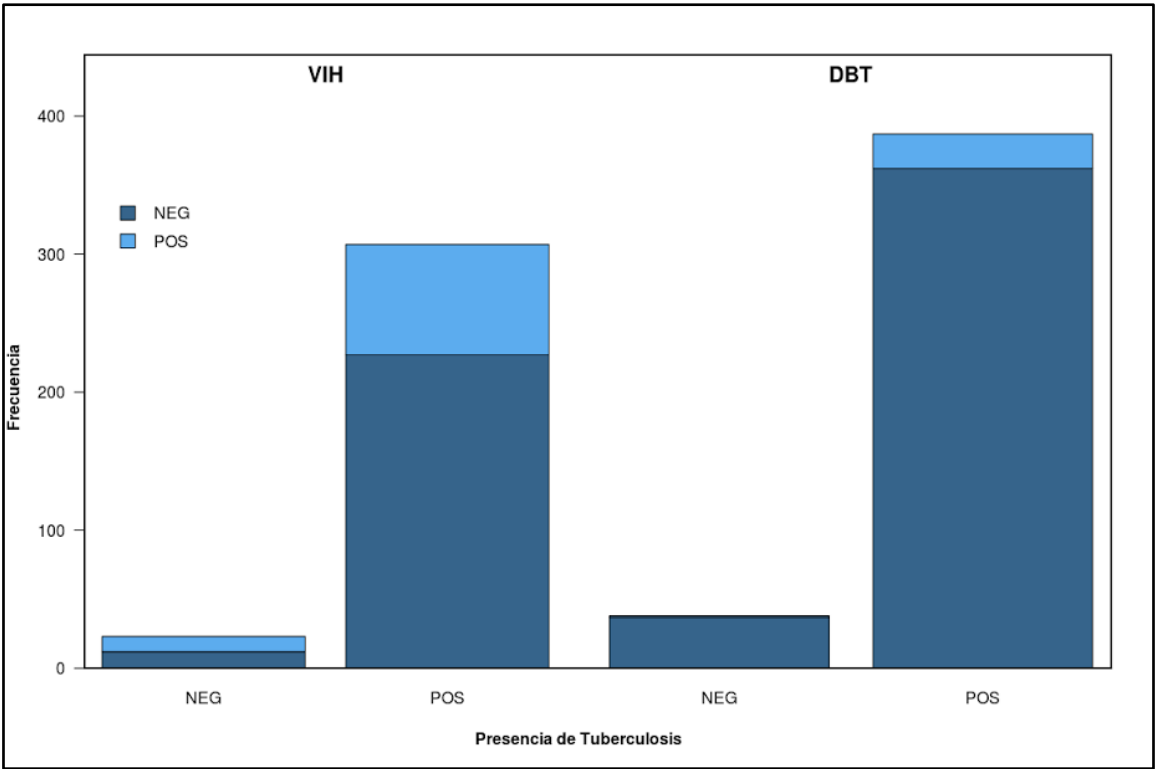


Figura 35. Frecuencia de casos de TB Vs. VIH y DBT

Otras enfermedades

Otras enfermedades estuvieron presentes en la población en estudio, presentándose en la mayoría de los casos en los pacientes con diagnóstico de TB (+), respecto a las personas con TB (-), entendiéndose como tal la población descrita anteriormente.

En estos términos, se relacionó la enfermedad tuberculosa con la presencia de otras enfermedades pulmonares, enfermedades inmunosupresoras, psiquiátricas y otras.

Entre las enfermedades pulmonares que se presentaron en la población se registran: neumonía, bronquitis, EPOC - Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica, bronquiectasias. Por otra parte las enfermedades inmunosupresoras estuvieron representadas por DBT, cáncer, corticoterapia, embarazo, colagenopatías: lupus, esclerodermia, artritis reumatoidea, Polimiositis, enfermedad de Raynaud; también se registraron otras enfermedades infecciosas como sífilis, hepatitis B y C, VPH, gonorrea, chagas y diarrea por *Clostridium difficile*. Finalmente, una parte de la población manifestó sufrir enfermedades mentales.

De acuerdo a los grupos establecidos se registra que en cuanto a las enfermedades pulmonares se refiere el 8,7% (37 casos) de los pacientes con diagnóstico TB (+) presenta alguna de las enfermedades pulmonares mencionadas anteriormente, respecto al 0,7% (3 casos) de personas que presentan enfermedades pulmonares pero presentan diagnóstico TB (-) (Figura 36). De acuerdo al análisis realizado usando el test de Fischer tenemos que no existen diferencias significativas asignando un valor de $p=1$.

La inmunosupresión es uno de los factores que puede influir de manera negativa en el éxito del control y tratamiento de la enfermedad. En estos pacientes se busca la detección temprana de la infección – tuberculosis latente, con el fin de reducir el riesgo de progresión a enfermedad tuberculosa.

Del total de la población en estudio un 34,35% (146 casos) corresponden a personas que presentan algún tipo de inmunosupresión, mientras que un 65,64% (279 casos) no se les diagnosticó o no refirieron presentar enfermedades o suministro de tratamiento

inmunosupresores. Al analizar la población TB (+), un 34,10% (132 casos) corresponden a personas inmunodeprimidas, respecto al 36,84% (14 casos) de personas con TB (-).

La presencia de otras enfermedades infecciosas en la población estuvo marcada en la población TB (+) en la cual se registró en un 21,2% (90 casos) respecto a las personas TB (-) en donde solo un 2,4% (10 casos) desarrollaron otras enfermedades infecciosas. Del total de la población en estudio un 23,52% (100 casos) corresponden a personas que presentan algún tipo de enfermedad infecciosa, mientras que un 76,47% (325 casos) no se les diagnosticó o no refirieron presentar este tipo de enfermedades. De esto se puede inferir, que probablemente las personas con TB (+) pudieron estar internadas en el hospital aumentando la probabilidad de infección con alguna de estas enfermedades en donde se incluyen infecciones de alta frecuencia a nivel intrahospitalario. Sin embargo al analizar estos datos con la prueba de Fisher, se obtiene un valor de $p=0,6896$ sugiriendo que estas diferencias no son significativas y que los resultados obtenidos en el presente estudio son debidos al azar. Se debe tener en cuenta que existen desvíos en el muestreo que pueden influir de forma directa en el análisis de los resultados.

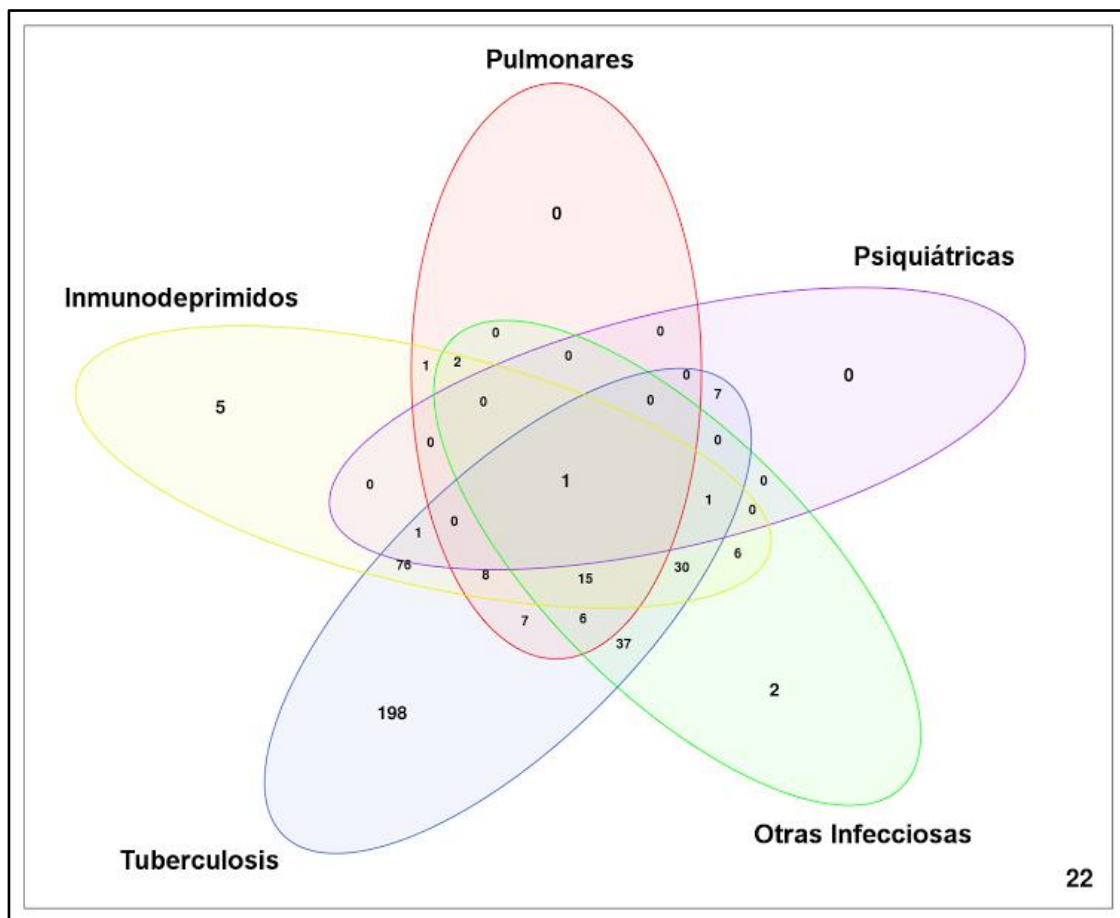


Figura 36. Relación entre enfermedades presentes en la población en estudio.

Las enfermedades de transmisión sexual exceptuando el VIH – SIDA estuvieron presentes en la población en donde se registró un 8,7% (37 casos) y 1,2% (5 casos) en pacientes TB (+) y TB (-), respectivamente. Esto indica que del total de la población en estudio un 9,88% (42 casos) presentan alguna enfermedad de transmisión sexual distinta al VIH – SIDA, mientras que un 90,11% (383 casos) no se les diagnosticó o no refieren este tipo de enfermedades. A partir del análisis de Fisher ($p=0,406$), se pudo establecer que no existen diferencias significativas entre la población que presenta este tipo de enfermedades y el desarrollo de TB.

Las enfermedades psiquiátricas, a pesar de estar presentes en algunas de las personas involucradas en el estudio, fueron las que presentaron un menor protagonismo con tan solo el 2,4% (10 casos) en la población TB (+) y ningún caso reportado en personas TB (-). Es importante tener en cuenta esta población debido a la dificultad que estos pacientes

pueden representar para llevar a cabo el tratamiento; algunos de estos casos concluyeron con la fuga hospitalaria y el subsecuente abandono del tratamiento.

Es destacable el único caso de un paciente TB (+) que además presenta por lo menos una de las enfermedades de cada una de la clasificación realizada. Se trata de un paciente de género femenino, entre 35 – 44 años de edad, argentina, diagnosticada con neumonía, VIH (+), diabetes, esquizofrénica, no refiere trabajo e ingresa como una paciente con abandono de tratamiento para TB; esta paciente tiene de desenlace el fallecimiento.

Por último, se registran 22 casos de personas TB (-) que no presentaron el desarrollo de ninguna de las enfermedades consideradas anteriormente.

Ocupaciones

Las condiciones del espacio físico del trabajo es otro de los factores determinantes para que aumenten las probabilidades de desarrollo de la enfermedad tuberculosa, además del tipo de trabajo. Algunas ocupaciones favorecen a la diseminación de la enfermedad al realizarse en espacios reducidos, otras ocupaciones en su mayoría son llevadas a cabo por inmigrantes de países con una importante incidencia de TB, tal como se observó en un grupo de la población analizada y también se presentaron algunos casos de personas que se desempeñan en el ámbito de la salud presentando un mayor riesgo de contagiarse.

En la Figura 37, se detalla la frecuencia con la que se desarrollan las ocupaciones referidas por las personas participantes del presente estudio discriminando entre la población TB (+) y TB (-). Del total de la población participante solamente se registran datos de este parámetro del 64,47% (274 casos), por el contrario el 35,52% (151 casos) no aportaron información.

Las ocupaciones que se presentaron con mayor frecuencia en la población TB (+) fueron: personas que no trabajan 21,29% (53 casos), seguido de las personas que desempeñan trabajos manuales tales como construcción, costura, zapatería, estilista, pintor y soldador, en este ítem se excluyeron las personas que se desempeñan en la costura ya que este

trabajo será analizado de forma independiente; éstos trabajos agrupados como manuales se presentaron en un 14,05% (35 casos); seguidamente se ubican de acuerdo a la frecuencia, las personas del área de educación en la cual se incluyeron tanto estudiantes como maestras, representado por un 10,84% (27 casos) y otras ocupaciones referidas se presentaron en menor frecuencia.

Como se mencionó anteriormente, se observa que algunas ocupaciones son desempeñadas principalmente por inmigrantes. Tal es el caso de las personas que se desempeñan en el área de la costura que está integrada principalmente por personas de la comunidad boliviana. Analizando la población TB (+) que desempeña esta labor, se registró que de un total de 18 personas, 16 son de nacionalidad boliviana; mientras que de la población TB (-) 2 de 5 personas son de esta nacionalidad. Esta ocupación es una de las que mayor riesgo representa, puesto que es bien conocido que muchos bolivianos ingresan a la Argentina para desempeñarse en esta labor en donde la infraestructura en donde desarrollan esta actividad es propicia para la diseminación de la TB, por tratarse de lugares cerrados con poca ventilación y en su mayoría trabajan en condiciones de hacinamiento. Además, de acuerdo a los reportes de la OMS, Bolivia es uno de los países en la región de las Américas con mayor incidencia de la enfermedad tuberculosa.

Es interesante destacar el caso de ocupaciones en las cuales prácticamente todos los individuos presentaron un diagnóstico positivo para TB. Tal es el caso de las personas que se desempeñan como trabajadores temporarios, personas que viven en situación de calle o trabajadores en el área de la salud. En este último grupo este resultado es esperable ya que aquellas personas en situación de riesgo o de las que se sospecha un posible contagio son sujetas al diagnóstico de enfermedad. El grupo de personas que viven en situación de calle genera una gran problemática debido a su alta vulnerabilidad que hace difícil el manejo y control de la TB, diseminando la enfermedad entre la comunidad.

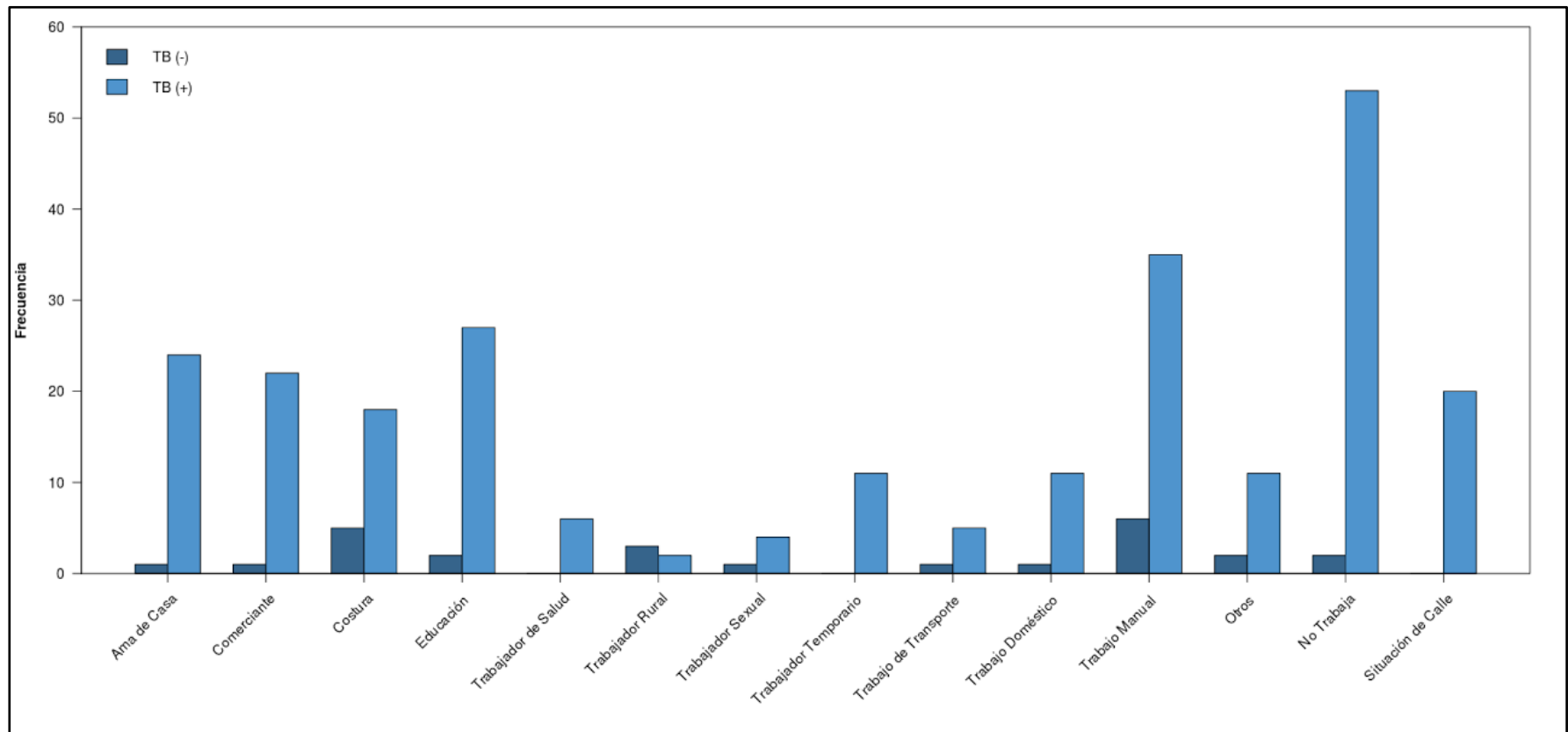


Figura 37. Relación de las ocupaciones desempeñadas por las personas participantes en el presente estudio y el desarrollo de la enfermedad tuberculosa.

Adicciones

Otro de los factores que afecta en gran medida la culminación y éxito de un tratamiento son las conductas adictivas que pueden presentar los pacientes. El perfil de estas personas ante el consumo de alcohol o drogas los hace vulnerables a presentar cualquier posibilidad de abandono de tratamiento, ya sea por los efectos fisiológicos o manifestaciones conductuales del consumo. El consumo de alcohol, tabaquismo o drogas ilícitas son cofactores que junto a condiciones de pobreza, desempleo, hacinamiento, entre otros contribuyen al desarrollo de la enfermedad tuberculosa.

De la población en estudio diagnosticada con TB (+), un 6,76% (19 casos) son tabaquistas como única adicción. Sin embargo, se presentó un 13,87% (39 casos) en donde adicionalmente refieren el consumo de drogas ilícitas o alcohol y un 11,38% (32 casos) refieren el consumo de tabaco, drogas ilícitas y alcohol; a partir de los datos anteriores podemos concluir que el 32% de la población TB (+) son tabaquistas. Si se compara con la población con TB (-) definiendo esta población como aquellas personas que nunca sufrieron de la enfermedad tuberculosa y nunca tuvieron crecimiento de bacilos en el medio de cultivo LJ, podemos inferir que el consumo único de tabaco corresponde al 4% representado por un único caso y el 16% (4 casos) que refirieron el consumo de tabaco y alcohol; esto indica que el 20% de esta población son tabaquistas. Sin embargo, al analizar los datos usando la prueba de Fisher no se encuentran diferencias significativas, obteniendo un valor de $p=0,2636$ (figura 38).

El consumo de alcohol es otra de las adicciones que se presenta con frecuencia en la población estudiada, una de las complicaciones que puede presentar el consumo de sustancias etílicas es la alteración en la regulación inmune conllevando a la inmunodeficiencia, esto posiblemente ocurre por alteraciones en el equilibrio de las citoquinas y como consecuencia se aumenta la probabilidad de desarrollar TB y otras enfermedades. Además el consumo continuo puede ocasionar la absorción inadecuada de nutrientes y como consecuencia se presentan casos de desnutrición con el subsiguiente deterioro del sistema inmune, condición que favorece a la aparición de infecciones (Patra et al. 2014; Rao et al. 2016).

Analizando los casos presentados se observa que el 8,54% (24 casos) y 12% (3 casos), de personas TB (+) y TB (-), respectivamente presentan como único hábito adictivo la ingesta de alcohol. Sin embargo, se presentan casos en donde esta adicción está asociada a otras, encontrándose representada por un 23,11% (65 casos) y 16% (4 casos) en personas diagnosticadas con TB (+) y TB (-), respectivamente (Figura 38). El test de Fischer no presenta diferencias significativas respecto al consumo de alcohol y el desarrollo de la enfermedad tuberculosa, esto se infiere al obtener un $p=0.824$.

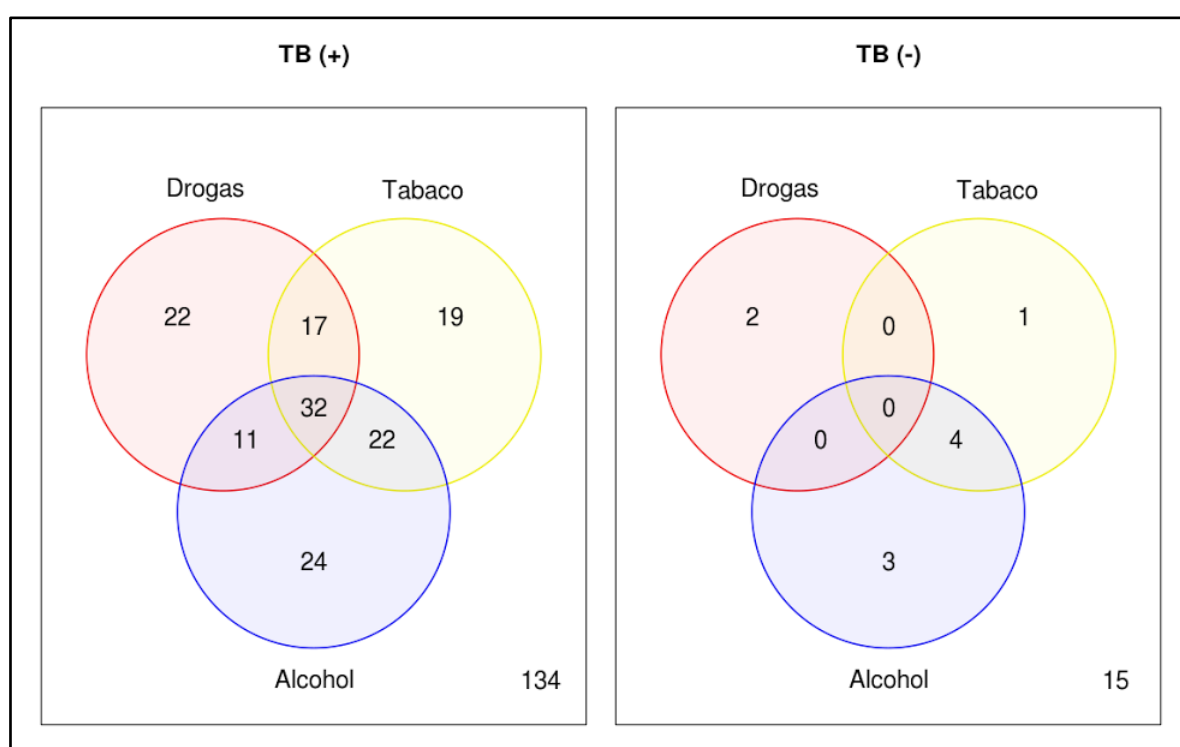


Figura 38. Interacción de las diferentes adicciones presentadas en la población en estudio respecto al diagnóstico de tuberculosis.

El consumo de drogas ilícitas especialmente de marihuana, paco y pasta base en la población en estudio genera una problemática de importancia al favorecer formas graves de la enfermedad tuberculosa, al tratarse de pacientes con alta probabilidad de abandono de tratamiento; conllevando a la diseminación de estas cepas. Esta población en estado de vulnerabilidad y con diagnóstico de TB (+) está representada por un 29,15% (82 casos) que consumen drogas ilícitas como única adicción o en asociación con otras. Generalmente, son personas con desnutrición, que viven en condiciones de precariedad que ingresan en un estado de salud comprometido que en muchas ocasiones culmina en

el fallecimiento. Si se comparan los datos anteriores con los de la población TB (-), tenemos que se registra un 8% correspondiente a dos personas que presentan adicción por drogas ilícitas. El análisis por el test de Fisher no indica que existan diferencias significativas, se obtuvo un valor de $p=0,2972$.

En términos generales, tenemos que un 52,31% (147 casos) y 40% (10 casos) se trata de personas con algún tipo de adicción en la población TB (+) y TB (-), respectivamente. Un total de 119 personas no presentaron ningún tipo de registro en este ítem.

Es pertinente destacar que a pesar de que las drogas con mayor consumo son el paco, pasta base y marihuana, también se presentaron registros de consumo de cocaína y endovenosas. Si bien, todas ellas representan una complicación para terminar con éxito el tratamiento para la enfermedad, la adicción a drogas endovenosas refiere un problema aún mayor ya que aumenta la probabilidad de adquirir otras enfermedades de importancia que pueden enlentecer el tratamiento y su éxito.

Contacto

Este parámetro hace referencia al estudio de todas las personas expuestas o relacionadas al *caso índice* que es el primer caso conocido de TB de cada grupo, y por lo tanto el que da comienzo a la evaluación de los contactos. El estudio de los contactos representa gran importancia ya que permite diagnosticar contactos infectados o enfermos, lo cual conlleva a la instauración del tratamiento de forma precoz; además al tener en cuenta los contactos se puede reconstruir la cadena de transmisión para identificar en algunas ocasiones el *caso índice* real.

A partir de la importancia que representa conocer este factor se analizó si existe una relación entre las personas que desarrollan la enfermedad TB (+) y quienes tienen diagnóstico de TB (-) respecto a si tuvieron contacto con alguna persona con tuberculosis.

En la Figura 39, se observa la relación existente entre las personas que desarrollan la enfermedad con el estudio de contactos. El 39,56% (127 casos) de las personas TB (+)

conocen haber estado en algún momento en contacto con una persona enferma de TB, mientras que por el contrario dentro de la población TB (-) sólo un 28% (9 casos) refieren haber estado en contacto con alguien que tiene la enfermedad tuberculosa. De este último registro podemos inferir que este grupo de personas pueden estar infectadas y probablemente en algún momento de la vida desarrollen la enfermedad o que se realizó un óptimo control y manejo del contacto. Por otra parte, un 57,63% (185) del total de la población con registro de este factor refiere no conocer haber estado en contacto con al menos una persona enferma de TB; sobre el total de la población en estudio 104 personas que corresponde al 24,47% no registra esta información. A pesar de que el porcentaje de las personas TB (+) que estuvieron en contacto con una persona enferma es mayor que el obtenido en la población TB (-), a partir del análisis de Fisher se puede concluir que no hay diferencias significativas entre estos valores. Esto se deduce a partir del valor de $p=0,09298$. Nuevamente, es importante destacar el desvío del muestreo.

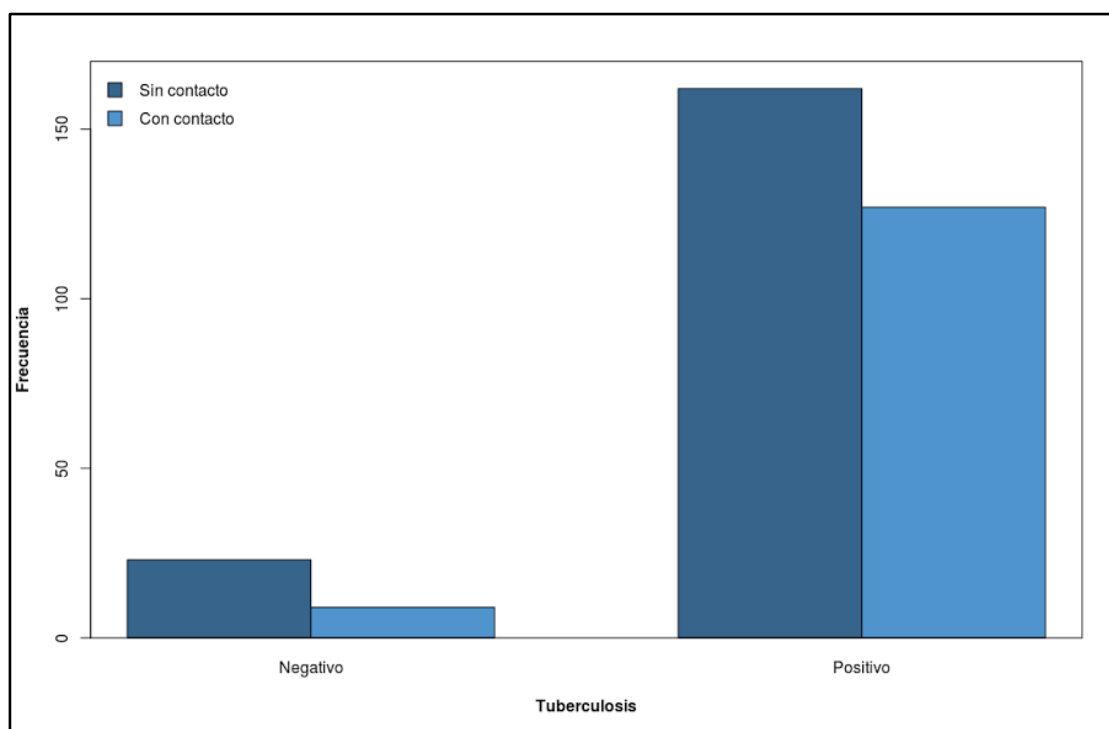


Figura 39. Relación entre el desarrollo de TB y el estudio de contactos.

Existen algunas situaciones especiales que requieren atención, puesto que representan un mayor riesgo de infectarse con el bacilo. Entre estas situaciones se destacan las personas que han estado en instituciones cerradas tal como prisiones. En la población en

estudio se registraron algunos de estos casos donde un 9.3% (31 casos) corresponden a personas con TB (+) que estuvieron o se encuentran privados de la libertad, caso contrario ocurrió con la población TB (-) en la cual no se registró ningún caso de personas que hayan presentado antecedentes carcelarios. Del total de la población con registro de este parámetro un 91,46% (332 casos) refieren no haber estado nunca en prisión. Este parámetro no fue notificado por un 12,6% del total de la población en estudio, lo cual corresponde a 62 personas. La TB puede llegar a ser 100 veces más prevalente dentro de las cárceles que fuera de ellas y esto suele ocurrir por el hacinamiento, la ventilación insuficiente que presentan estos lugares y también al desconocimiento de las medidas preventivas y falta de supervisión y cumplimiento de tratamiento. Esto se ve reflejado en la población analizada, ya que de 31 personas que presentan antecedentes carcelarios todos desarrollaron la enfermedad. A pesar de que no se presentaron diferencias significativas al analizar los resultados con la prueba de Fisher, registrando un valor de $p=0,1552$; probablemente esto se pueda atribuir a los desvíos en el muestreo.

Clasificación del paciente al ingreso y Tipo de alta

El manejo y control de la enfermedad tuberculosa representa un desafío al requerir de períodos de tiempos prolongados para tratarla, el promedio de tiempo oscila entre 6 meses en el caso de TB sensible a los fármacos hasta 2 años o más, en el caso de TB con múltiples resistencias. Durante este tiempo, muchos de los pacientes abandonan el tratamiento al sentir que su salud se ve mejorada; sin embargo, al poco tiempo regresan por presentar recaídas aumentando cada vez más las probabilidades de presentar TB resistente a los fármacos, situación que conlleva a usar fármacos más tóxicos, menos efectivos en algunos casos, más costosos y extensos.

Se analizó la clasificación del paciente al momento de su ingreso al Lab. de la TBC y se obtuvo que la mayor representación estuvo dada por aquellas personas que se definieron como "vírgenes" al momento de su ingreso, definiéndose como tal aquellas personas que nunca han tenido TB e ingresan por sospecha de esta infección. Este grupo de la población se encuentra representado por un 34,82% (148 casos), seguido de las personas que se encontraban al momento de entregar la muestra en tratamiento, correspondiendo

a un 24% (102 casos). Un 17,65% (75 casos) ingresaron clasificados como abandono, como su nombre lo indica corresponde a los pacientes que no se presentaron ni a controles ni a buscar la medicación durante más de dos meses consecutivos. Mientras que un 12% (51 casos), estuvieron representados por personas tratadas previamente y en menor proporción se encontraron casos de personas con recaídas, correspondiendo a un 0,94% (4 casos). Finalmente la frecuencia más baja corresponde a un fracaso terapéutico registrada por un 0,24%, denominándose como tal a pacientes sin tratamiento previo, quienes iniciaron el tratamiento por TB con BK (+) y continúan presentándola al quinto mes o más durante el transcurso del tratamiento. Del total de la población un 10,35% (44 casos) no registró ninguna información que permitiera realizar la clasificación descripta anteriormente a su ingreso. Los datos obtenidos se grafican en la Figura 40.

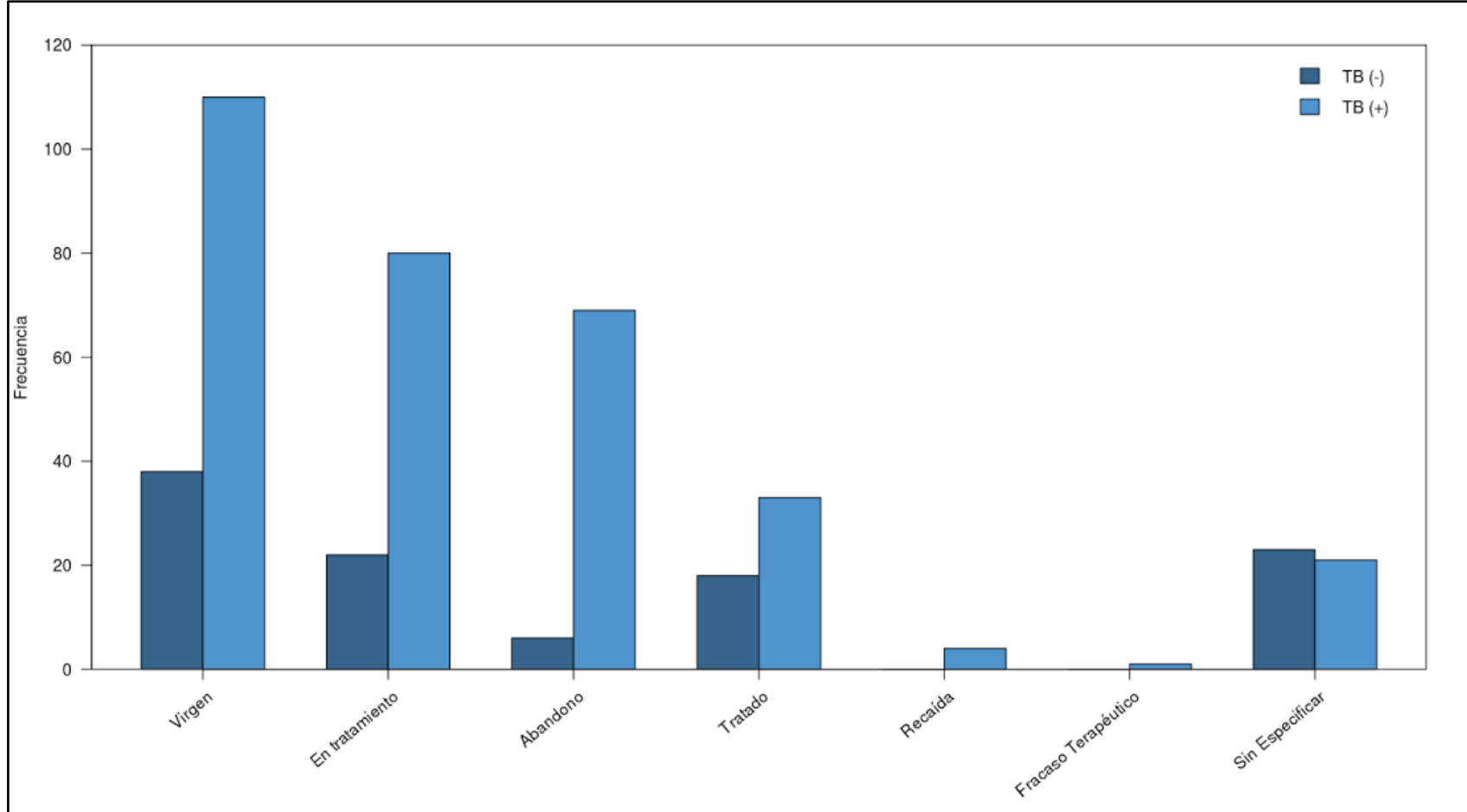


Figura 40. Clasificación de los pacientes a su ingreso al Lab. de la TBC, de acuerdo a su historia clínica del manejo de la enfermedad tuberculosa.

A pesar que el tratamiento de la enfermedad es prolongado como se mencionó anteriormente; se recabó la información registrada en las historias clínicas al momento de culminar con este estudio y no en función del tiempo del tratamiento de los pacientes.

Teniendo en cuenta lo anterior, la mayor parte de la población continuaba en tratamiento registrándose un 55,52% (171 casos), seguido por una frecuencia muy similar por los pacientes que completaron tratamiento y quienes abandonaron, correspondiendo a un 15,91% (49 casos) y 15,58% (48 casos), respectivamente. Es preocupante, observar el número de fallecimientos presentados durante el estudio; este grupo presentó un 10,71% de desenlaces fatales (33 casos) y finalmente se presentaron unos pocos casos de personas que fueron derivadas a otros hospitales, estos pacientes en su mayoría concurren al Lab. de la TBC del Hospital Muñiz debido a que en sus lugares de residencia no logran acertar con la enfermedad de la persona que acude en búsqueda de ayuda profesional sin mejoría de la sintomatología, una vez diagnosticados son derivados a lugares más cercano a su residencia para facilitar el tratamiento de la enfermedad (Figura 41).

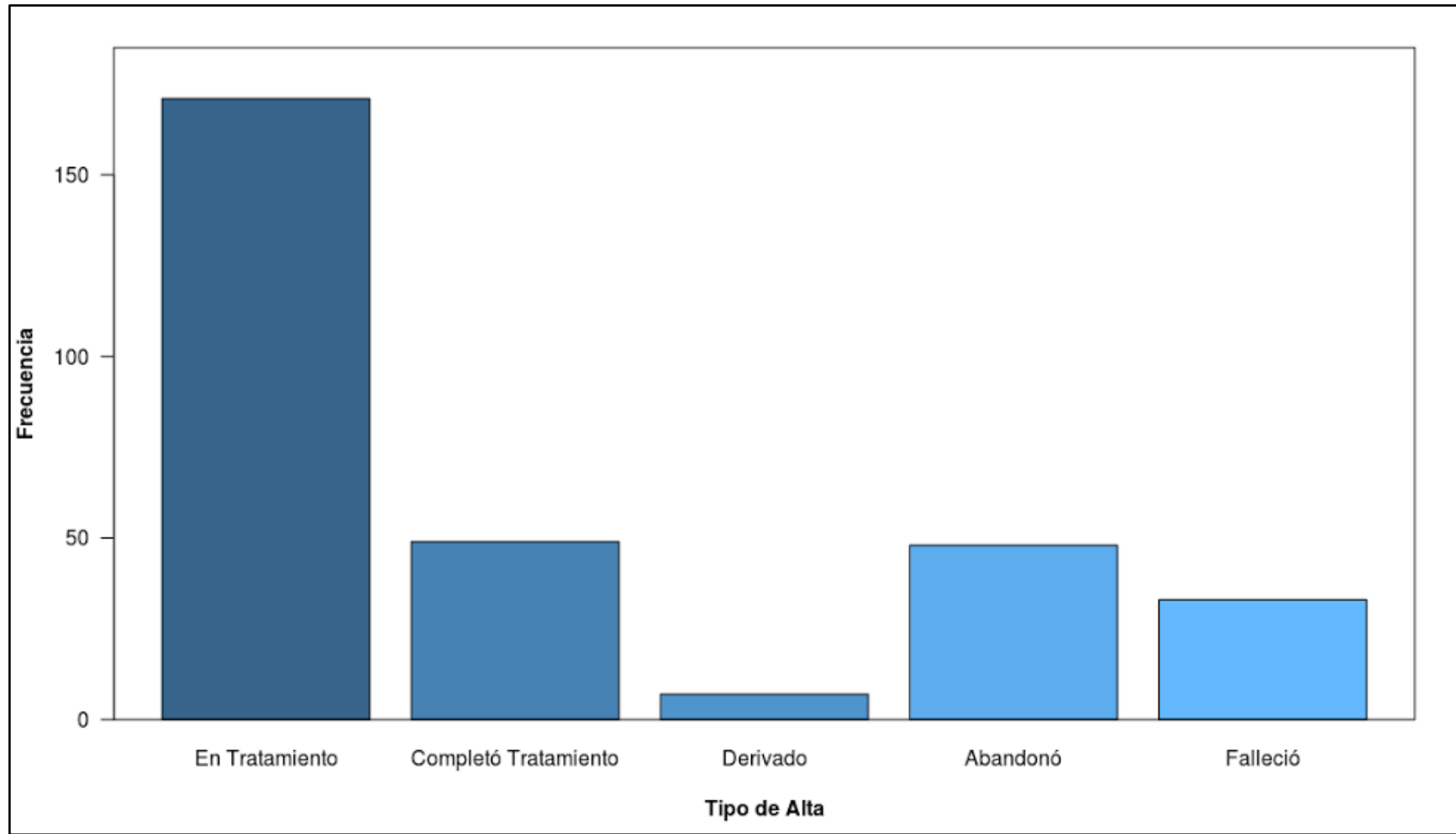


Figura 41. Tipo de alta de los pacientes del presente estudio con diagnóstico de TB (+).

DISCUSIÓN

La TB es una enfermedad infecto-contagiosa crónica que afecta a un tercio de la población mundial, de los cuales el 10% pueden desarrollar TB y un elevado número pueden permanecer sin diagnosticarla a tiempo (López-Hernández et al. 2016; Glaziou et al. 2013). Es por esto, que el diagnóstico de la TB activa y la determinación de susceptibilidad a los fármacos de manera rápida, es fundamental para evaluar el tratamiento a seguir y evitar la diseminación de cepas resistentes. En la actualidad, el desarrollo de nuevas metodologías que combinen rapidez, sensibilidad, especificidad, seguridad para el operador y bajo costo para la determinación del diagnóstico y resistencia a los fármacos más comunes empleados en el tratamiento de la TB, continúa siendo un reto.

Existe una variedad de métodos disponibles que permiten detectar y determinar la presencia de *M. tb* y su patrón de susceptibilidad a fármacos, sin embargo algunos de ellos como es el caso del cultivo, que es el método de referencia, es laborioso y tarda entre 3– 6 semanas para notificar el aislamiento de micobacterias y algunas semanas adicionales para realizar la especiación y las pruebas de susceptibilidad a fármacos (Naveen & Peerapur 2012). Se encuentran otros métodos disponibles automatizados que permiten no solo diagnosticar la presencia de *M. tb* sino también la susceptibilidad a fármacos, algunos de ellos son: MGIT, Xpert MTB/RIF, GenoType MTBDRplus, entre otros (Rahman et al. 2016; Springer et al.; Blakemore et al. 2010; Palomino et al. 2014; Porras et al. 2005).

A pesar de que estos métodos permiten la notificación de una forma más rápida del diagnóstico, el costo de los equipos e insumos limitan su aplicación en países en desarrollo en donde la incidencia de TB es alta y son solo genotípicos (Demers et al. 2016; Sharma et al. 2010; Teo et al. 2011; Rahman et al. 2016; Rufai et al. 2014).

El estudio de las características y ventajas que ofrecen los micobacteriófagos, los ha convertido en candidatos de interés para el desarrollo de nuevo métodos para el diagnóstico de *Mycobacterium spp.* y determinación de susceptibilidad a fármacos. En las últimas décadas, se han diseñado metodologías basadas en el ensayo de amplificación de

fagos, fagos reporteros de luciferasa y más recientemente nuestro grupo ha creado los fagos reporteros de proteínas fluorescentes (De La Iglesia et al. 2009; Albert et al. 2007; Takiff & Heifets 2002; Banaiee et al. 2003; Dusthacker, Hassan, et al. 2008; Piuri et al. 2009; Rondón et al. 2011; Jain et al. 2012).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos empleando la primera generación de FluoFagos, se planteó la evaluación de la segunda generación de fagos reporteros, que presentan características mejoradas tales como incorporación de *tags* en la cápside del fago y FluoFagos que acarrean el gen reportero *mCherry_{bomb}* cuya expresión ha sido optimizada para micobacterias (Urdániz et al. 2016).

CAPÍTULO I. INCORPORACIÓN DE "TAGS" EN LA CÁPSIDE DE FLUOFAGOS

Se ha demostrado la utilidad para diversos enfoques que presenta la adición de etiquetas de afinidad a bacteriófagos, entre los que se destaca la captura de complejos fago-bacteria (Tolba et al. 2010). Algunos fagos tales como T4 y λ tienen proteínas de decoración de la cabeza (Hoc y Soc para T4 y D para λ) que pueden ser modificadas, incluyendo la adición de una etiqueta fluorescente, con poca o ninguna reducción de la infectividad (Pope et al. 2011; Ford et al. 1998; Kreuter 1996). Aunque pocos viriones de fagos han sido estructuralmente definidos como los viriones lambda y T4, los análisis de genómica sugieren que la mayoría de fagos con morfología Siphoviridae no tienen proteínas de decoración en la cabeza y por lo tanto no se pueden modificar simplemente utilizando este enfoque. La modificación de la propia subunidad de la cápside ofrece un enfoque alternativo, algunos estudios de genómica comparativa muestran ejemplos en los que las subunidades de la cápside que están estrechamente relacionadas difieren en sus longitudes como resultado de adiciones en el extremo C-terminal (G. F. Hatfull 2012), lo que sugiere que una fusión, en el extremo C-terminal, especialmente una pequeña, puede ser bien tolerada por el bacteriófago.

De acuerdo a los resultados obtenidos, al emplear la estrategia de BRED para adicionar en el extremo C-terminal de la proteína de la cápside de TM4 (gp9) una etiqueta de Strep II (STAG), fue posible recuperar placas de lisis, identificando la presencia de mutantes

mediante PCR, aunque la frecuencia correspondió a $<1/100$ placas. Luego de múltiples rondas de purificación y *screening*, no fue posible obtener la mutante en las placas secundarias; a partir de esto se puede inferir que aunque es probable la incorporación del STAG en gp9, este fago modificado no se puede purificar homogéneamente en ausencia del fago salvaje debido a que no logra ensamblarse correctamente la cápside cuando las 415 copias de la proteína contienen el *tag*.

A partir de los resultados empleando la estrategia de BRED, surgió una nueva alternativa basada en el crecimiento de las partículas de fago en una cepa que expresa una fusión gp9-STAG proporcionando la posibilidad de generar fagos que presenten el STAG en partículas mixtas conteniendo ambas formas, tanto la nativa como la de fusión de la proteína de la cápside. Esto quiere decir, que en el interior de las micobacterias se producen proteínas de la cápside del fago que tienen el *tag*, existiendo la posibilidad de que el fago sin poder discriminar entre las que presentan el *tag* o no, integre una de ellas. Los resultados obtenidos, revelan que el ensamblaje de la cápside con la proteína de fusión no inhibió el crecimiento del fago, recuperando títulos de fagos similares a los que se alcanzaron al amplificar usando la cepa salvaje. La electroinmunomicroscopía permitió reconocer que una proporción sustancial de las partículas fágicas contenían al menos una subunidad del STAG, aunque no fue posible obtener una cuantificación precisa (Figura 16). Sin embargo mediante el análisis de ELISA, se obtuvo una correlación entre el aumento del número de partículas del fago y la señal proveniente del STAG.

Un alto porcentaje de partículas de STAG-gfp Φ fueron recuperadas usando perlas magnéticas recubiertas de Strep-Tactin; sorprendentemente una inesperada y alta proporción de fagos que no tienen el STAG-gp9 también fueron capturados. Sin embargo, esto no sucedió con el fago D29, usado como control (Tabla 4). Estos resultados, pueden ser explicados como una reacción cruzada e inespecífica con proteínas nativas de TM4 (Figura 18).

Como se mencionó anteriormente, una de las aplicaciones que ofrecen las partículas de fago etiquetados con el STAG es la captura de complejos fago-bacteria con fines

diagnósticos. Este desarrollo se propone para su uso específico como método de diagnóstico de la TB, donde la recuperación de bacilos presentes en el esputo se hace difícil en algunos casos, además esta metodología permite detectar aquellas bacterias viables y competentes para ser infectadas por el fago que pueden ser fácilmente detectadas por microscopia de fluorescencia (Jain et al. 2012).

Los resultados obtenidos, demuestran que el empleo de un FluoFago con el *tag* en la cápside permite una mayor recuperación de complejos fago-bacteria, empleando perlas magnéticas recubiertas de Strep Tactin, respecto al fago amplificado en la cepa salvaje. Pese a que se modificaron diferentes parámetros, no fue posible incrementar la diferencia en la proporción de bacterias capturadas. Esto puede reflejar una limitación inherente como consecuencia de la baja adsorción, tal como se ha reportado para TM4 y otros micobacteriófagos (Jacobs-Sera et al. 2012 Barsom & Hatfull 1996). Otra explicación que se plantea es que el virión sea desplazado de la superficie de la bacteria una vez que se completa la inyección del ADN, aunque es muy poco probable que esto ocurra. Una estrategia para aumentar la eficiencia de recuperación de los complejos fago bacteria sería aislar mutantes con una adsorción mejorada.

Otra ventaja que ofrece la incorporación de *tags*, es que permite simplificar el protocolo de captura de los complejos fago-bacteria al poder detectar la presencia de bacilos fluorescentes sin la necesidad de eluir las perlas magnéticas, ya que éstas no interfieren en la detección de la fluorescencia (Figura 19).

Este enfoque ofrece una amplia aplicación para la adición de etiquetas a otros tipos de fagos de Micobacterias y fagos de otros huéspedes simplemente amplificando los mismos en una cepa en la que se expresa la proteína de la cápside conteniendo la etiqueta deseada.

A pesar de los resultados obtenidos en los ensayos realizados y las ventajas que demostró el empleo de STAG- *gfp*Φ, no fue posible evaluar su eficiencia en muestras clínicas debido al costo de las perlas magnéticas recubiertas de StrepTactin. Esta limitación

probablemente pueda ser superada desarrollando perlas magnéticas que reconozcan el STAG de forma casera para disminuir los costos y poder evaluar estos ensayos en el ámbito hospitalario.

CAPÍTULO II. EVALUACIÓN DE PARÁMETROS DE IMPORTANCIA EN EL PROCESO DE INFECCIÓN CON FLUOFAGOS

La identificación y evaluación de diversos factores que pueden afectar la viabilidad de las micobacterias o la integridad de los micobacteriófagos, afectando el proceso de infección y expresión de la proteína fluorescente; permite modificar diferentes parámetros con la finalidad de definir las condiciones óptimas para la obtención de mejores resultados.

La decontaminación de muestras clínicas no estériles es el primer paso que conlleva a la realización de pruebas para el diagnóstico de la TB. Las muestras de esputo frecuentemente se encuentran asociadas a un excesivo crecimiento de contaminantes tales como: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*, entre otras. Estas especies presentan un crecimiento más rápido que *M. tb*, interfiriendo en su eficiente aislamiento (Asmar & Drancourt 2015). Sin embargo, es conocido que las micobacterias también se pueden ver afectadas por estos procesos de decontaminación.

La evaluación de los métodos de Petroff modificado y NaOH-NALC empleados para la decontaminación de esputos, evidencian que al emplear este último método se recuperaron una mayor cantidad de bacilos en todos los ensayos realizados (Figura 20). Está reportado que el empleo de NaOH genera condiciones alcalinas resultando tóxicas no sólo para los organismos contaminantes sino también para las micobacterias (Burdz et al. 2003), considerándose que cerca del 60% de las micobacterias pueden morir posterior a estos protocolos (Chatterjee et al. 2013). Nuestros resultados son concordantes con el estudio reportado por Chatterjee y colaboradores, en donde evalúan los efectos de diferentes métodos reportando una mayor recuperación con el método NaOH-NALC, en donde la cantidad de aislamientos obtenidos de *M. tb* posterior a la decontaminación es proporcional a la carga micobacteriana inicial de la muestra (Chatterjee et al. 2013). Los resultados de este trabajo son respaldados por los descriptos anteriormente, al encontrar

una importante disminución del crecimiento micobacteriano posterior a los protocolos de descontaminación respecto al desarrollo de colonias en el control.

La baja recuperación obtenida de micobacterias posterior al protocolo de descontaminación (aproximadamente dos órdenes de magnitud menos que en el control), puede ser explicada ya que los dos métodos evaluados emplean NaOH como agente descontaminante; sin embargo, la recuperación mayor de bacilos al emplear el método NaOH-NALC, puede deberse al empleo de la N-acetil-cisteína que es un agente mucolítico y probablemente permite que los bacilos queden más expuestos conllevando al aumento en la recuperación.

A partir de lo anteriormente expuesto, se plantea la posibilidad de evaluar nuevas metodologías o cambios que permitan recuperar una mayor cantidad de micobacterias y eliminar en alto porcentaje la flora acompañante presente en las muestras de esputo. Estos cambios se pueden basar en el empleo de estos mismos protocolos usando menor tiempo de exposición con el NaOH o disminuyendo el porcentaje del mismo. Sin embargo, esta reportado que este tipo de modificaciones aumenta la recuperación de las micobacterias, afectando en menor medida su viabilidad pero así mismo aumentan las probabilidades de contaminación (Peres et al. 2009; Scheicher et al. 2003; Chatterjee et al. 2013). Al respecto, Mole y colaboradores reportaron una reducción en la tasa de contaminación del 14,3% al 0,8% al usar nistatina, oxacilina y aztreonam (Mole et al. 2007). Un punto importante en el proceso de descontaminación, es la neutralización empleada por cada protocolo. Existen algunos métodos más fuertes, que afectan la viabilidad de las micobacterias. Además, algunos de ellos conlleva a que la neutralización sea más dificultosa; lo anteriormente expuesto es de resaltar ya que de acuerdo a ensayos realizados en el presente trabajo se demostró la influencia del pH en el proceso de infección e infectividad del FluoFago.

Es importante evaluar nuevas opciones de descontaminación teniendo cuenta el bajo porcentaje de recuperación que se obtuvo de *M. tb* con los dos métodos ensayados, esto llevado al ámbito clínico puede proporcionar resultados falsos negativos en el momento

de diagnosticar TB, esta situación puede presentarse especialmente en personas coinfectadas por el VIH que suelen ser paucibacilares.

Con respecto al efecto del pH durante el procesamiento, Carroll y colaboradores reportan que una de las ventajas que presenta la proteína fluorescente Φ mCherry_{bomb} es que no se ve afectada por las condiciones de pH (Carroll et al. 2010). Sin embargo, no es conocido si las condiciones de pH pueden causar la inactivación de los FluoFagos o si los receptores o el reconocimiento de los mismos se pueden ver afectados. Está reportado que algunos bacteriófagos no pueden persistir si se exponen a pH ácido, sin embargo, la sensibilidad a pH ácido depende del tipo de bacteriófago (Dabrowska et al. 2005).

De acuerdo a los resultados de este estudio se puede inferir que la exposición de *M. tb* a un medio de cultivo a pH ácido afecta en alguna medida la viabilidad de las micobacterias o los receptores de reconocimiento. Esta deducción surge al observar que la cantidad de bacilos infectados cuando previamente se expone a *M. tb* a pH 5 y posteriormente se infecta a pH neutro, es menor respecto al control.

En relación a la influencia del pH en la infectividad del fago, los resultados demuestran que Φ mCherry_{bomb} pierde su infectividad cuando es expuesto a pH ácido. Este resultado se demostró al titular una fracción de stock del FluoFago expuesta previamente a pH 5, los resultados indican una inhibición total de UFP. Al respecto, Jończyk y colaboradores describen los resultados obtenidos en diversos estudios al evaluar la influencia del pH en la infectividad de diferentes bacteriófagos. Algunos de éstos, disminuyeron su infectividad al ser expuestos a un pH ácido, hasta perder su actividad completamente al exponerse durante 1 hora a pH 3; en esta misma revisión se reportó que el bacteriófago PM2 fue sensible a pH bajo perdiendo completamente su actividad a pH 5 (Jończyk et al. 2011).

De acuerdo a lo anteriormente expuesto, podemos concluir que el pH afecta a Φ mCherry_{bomb} ya sea de manera directa si es expuesto a pH ácido o indirecta cuando las bacterias fueron previamente expuestas a ese pH afectando negativamente el proceso

de infección. Además, a partir de los resultados se debe tener en cuenta que el proceso de descontaminación, incluida la neutralización, es de suma importancia, ya que una neutralización incorrecta de las muestras clínicas puede conllevar a resultados erróneos o a la disminución de la sensibilidad del método del FluoFago para diagnosticar la presencia de las micobacterias viables.

La evaluación de los diferentes factores que pueden influir en el proceso de infección y expresión de la proteína fluorescente al usar Φ mCherry_{bomb} coloca de manifiesto las ventajas que ofrece el empleo de métodos basados en el uso de micobacteriófagos, una importante característica y ventaja de estos métodos se basa en que son reveladores del estado metabólico de la bacteria, lo que significa que solo pueden infectar y expresar la proteína fluorescente si las bacterias son viables (Piuri et al. 2009; Jain et al. 2011). Esta característica los hace interesantes respecto a los métodos basados en biología molecular, que identifican regiones de ADN específicas de las micobacterias sin discriminar su viabilidad. Este parámetro es de gran importancia, ya que permite determinar la necesidad de instaurar un tratamiento para frenar la cadena de transmisión de la TB. Cuando se cursa una TB activa los bacilos presentes se pueden encontrar en diferentes estados metabólicos, estas poblaciones heterogéneas pueden afectar no solo el diagnóstico de la enfermedad sino también su tratamiento (Jain et al. 2016).

Al evaluar la eficiencia de la infección con Φ mCherry_{bomb} empleando poblaciones de *M. tb* en diferentes fases de crecimiento se pudo determinar que el FluoFago presenta la capacidad de infectar poblaciones micobacterianas tanto en fase exponencial como estacionaria, siempre y cuando se encuentren viables. Los resultados obtenidos son comparables con reportes previos en donde se demostró que el fago TM4 infecta eficientemente micobacterias que han entrado en fase estacionaria (Dusthacker, Hassan, et al. 2008; Piuri & Hatfull 2006). No obstante, en poblaciones que se encuentran en fase exponencial se observa una mayor intensidad de la fluorescencia; de lo cual se puede inferir que a pesar que el FluoFago sea capaz de infectar bacterias en distintos estados metabólicos, éstos influyen en la expresión y síntesis de la proteína reportera.

La estabilidad reportada para la proteína mCherry respecto a otras variantes (Carroll et al. 2014; Carroll et al. 2010), se evidenció al realizar visualizaciones periódicas de las infecciones; la señal fluorescente fue perceptible hasta 12 semanas posterior a la infección, este tiempo fue superior al reportado previamente para FluoFagos reporteros de GFP en donde se observó fluorescencia hasta 4 semanas después de la infección (Piuri et al. 2009). Estos resultados permiten proponer el empleo de esta metodología, aun cuando el laboratorio no cuente con un microscopio de fluorescencia y se deba realizar el desplazamiento de las infecciones hasta otro lugar; además en esta instancia las infecciones ya no representan un riesgo biológico puesto que se encuentran fijadas con PFA 2% final que elimina por completo la viabilidad de las bacterias (Figura 21).

Lo anteriormente descrito, permite concluir que Φ mCherry_{bomb} presenta las características buscadas en el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos; convirtiéndolo en candidato para su evaluación en ensayos clínicos.

CAPITULO III. EVALUACIÓN DE LA *PERFORMANCE* DE FLUOFAGOS PARA LA DETECCIÓN Y DETERMINACIÓN DE RESISTENCIA A RIFAMPICINA DE *Mycobacterium tuberculosis* DIRECTAMENTE EN ESPUTOS

En los últimos años nuestro grupo se ha enfocado en el estudio, diseño y evaluación de los FluoFagos, como una nueva alternativa de diagnóstico de la TB activa y para la búsqueda de nuevas drogas antituberculosis (Piuri et al. 2009; Rondón et al. 2011; Piuri et al. 2013; Urdániz et al. 2016). En estudios previos se logró demostrar la utilidad que ofrecen los FluoFagos para la detección de *M. tb* y su resistencia a RIF, KAN, ETB y OFLO; estos resultados se demostraron usando cepas de *M. tb* de laboratorio y ofrecieron una primera aproximación de las ventajas de este método (Piuri et al. 2009). Posteriormente, se obtuvieron los primeros resultados de la *performance* de la primera generación de FluoFagos usando aislamientos clínicos, logrando discriminar entre aislamientos sensibles y resistentes a INH, RIF y STR (Rondón et al. 2011).

Recientemente, se construyó una nueva generación de FluoFagos que acarrean el gen reportero mCherry_{bomb} cuya expresión ha sido optimizada para micobacterias (Urdániz et

al. 2016). Contando con esta nueva construcción se propuso la evaluación de su *performance* para el diagnóstico de *Mycobacterium spp.* y su resistencia a RIF usando directamente muestras de esputo.

El diseño I se enfocó en el diagnóstico de la enfermedad tuberculosa usando Φ mCherry_{bomb} y se compararon los resultados con el cultivo en medio LJ. La sensibilidad alcanzada correspondió a un 81,3%, menor que la reportada con la primera generación de FluoFagos, a pesar de estar evaluando una versión optimizada (Rondón et al. 2011); sin embargo se debe resaltar que en ese trabajo se empleaban cultivos de los aislamientos clínicos, mientras que en este caso se usa directamente el esputo. Estos resultados se pueden explicar al tener en cuenta que hubo variaciones en las condiciones previo al proceso de infección, las cuales posibilitaron establecer las óptimas para los ensayos posteriores. A partir de estos resultados se infirió que la disminución en la sensibilidad pudo deberse a la baja cantidad de bacterias presentes en el remanente de la muestra empleada y al estado metabólico no óptimo de las mismas, en el que adicionalmente pudo haber influido negativamente el proceso de decontaminación del esputo. Estos factores que afectan el óptimo proceso de infección y expresión de la proteína, pueden ser solventados al establecer un tiempo de recuperación que permita la duplicación de los bacilos presentes y/o su reactivación metabólica. La evaluación de estas variaciones realizadas en el diseño I, permitió perfeccionar el protocolo en una segunda etapa para mejorar la sensibilidad del método.

A pesar de lo expuesto anteriormente, pudo determinarse la presencia de *Mycobacterium spp* viables en esputo en un período de 1 a 8 días; tiempo menor si se compara con el requerido para la obtención de colonias en medio LJ que corresponde entre 3 a 6 semanas (Naveen & Peerapur 2012).

El enfoque del diseño II, estuvo dado por el diagnóstico de la enfermedad y la resistencia a RIF. A partir de las condiciones evaluadas en el diseño I, se planteó realizar la recuperación de las muestras clínicas posterior al proceso de decontaminación durante 48 y 96 horas, antes de realizar la infección. Los resultados de sensibilidad al evaluar la

eficiencia para detectar la enfermedad correspondieron al 51,34% y 91,98% cuando se recuperaron durante 48 y 96 horas, respectivamente. La sensibilidad alcanzada al recuperar los remanentes de las muestras clínicas durante 96 horas, está correlacionada con el meta-análisis realizado por Pai, en donde se compara la *performance* de métodos basados en el empleo de bacteriófagos en diferentes estudios, registrando una sensibilidad del 86 - 100%; sin embargo la mayoría de éstos usan aislamientos y tan solo dos estudios que hacen parte de este meta-análisis evalúan la *performance* directamente en muestras de esputo (Pai et al. 2005). A pesar de tener una sensibilidad levemente menor que algunos de los métodos comparados, es interesante resaltar la rapidez en brindar el diagnóstico cuando se emplea Φ mCherry_{bomb} que puede oscilar de 72 – 120 horas desde el momento de recepción de la muestra.

El tiempo requerido para la detección de *M. tb* y la resistencia a RIF son similares a los reportados por Sivaramakrishnan para la detección de resistencia empleando fagos reporteros de la luciferasa, pero en este caso a partir de cultivos de aislamientos clínicos (Sivaramakrishnan et al. 2013). Otro reporte, notifica que el tiempo de obtención de los resultados empleando fagos reporteros de proteínas fluorescentes oscila entre 5 – 9 días empleando directamente muestras clínicas (O'Donnell et al. 2015); nuestros resultados resaltan el menor tiempo requerido para el diagnóstico al emplear Φ mCherry_{bomb}.

La rapidez de Φ mCherry_{bomb} en comparación con los métodos fenotípicos disponibles lo hace atractivo para ser implementado como una metodología complementaria a las ya existentes. Sumado a esto, la mínima manipulación de microorganismos vivos requerida para llevar adelante este ensayo disminuye los riesgos para el operador.

Respecto a la especificidad se obtuvieron valores del 100 y 97,92% a las 48 y 96 horas, respectivamente. Estos resultados, son similares a los reportados para la primera generación de FluoFagos y son esperables puesto que Φ mCherry_{bomb} presenta un rango de huésped limitado, que se ve representado en la proporción de verdaderos negativos identificados (Rondón et al. 2011).

En términos generales, es importante que una prueba diagnóstica brinde una alta sensibilidad que permita captar a todas las personas portadoras de la enfermedad y así poder tratarlas a tiempo mejorando su calidad de vida y evitando la diseminación de la TB. Sin embargo, en el caso de la TB y otras enfermedades es igualmente importante tener un método diagnóstico específico, puesto que permite evitar errores instaurando tratamientos en personas sanas y más aun tratándose de tratamientos que presentan efectos adversos de importancia.

Contar con un método de diagnóstico que detecte resistencia a RIF es de gran interés debido a que este fármaco es marcador de TB-MDR y en estos casos se hace necesario instaurar un régimen terapéutico diferente para el tratamiento y control de la enfermedad (Kuaban et al. 2015; Lorenzo et al. 2013; Ahmad & Mokaddas 2014).

Φ mCherry_{bomb} demostró su capacidad para discriminar entre cepas sensibles y resistentes a RIF en un corto tiempo. En el diseño II, se evaluaron 283 muestras clínicas de las cuales 187 fueron TB (+) y 14 de ellas confirmadas por el método de las proporciones como resistentes a RIF. La sensibilidad obtenida a las 48 y 96 horas fue de 28,57% y 100%, respectivamente. Esta diferencia presentada en la sensibilidad al recuperar durante distintos tiempos puede ser explicada en función a la distribución heterogénea que pueden presentar los bacilos en la muestra; además puede ser atribuida a la presencia de poblaciones mixtas de bacilos RIF resistentes y sensibles, adicionalmente a los parámetros mencionados con anterioridad, tal como la necesidad de requerir mayor tiempo de recuperación de los bacilos presentes en la muestra para aumentar la cantidad y reactivar su metabolismo. Estos requerimientos anteriores pueden presentarse sobre todo al realizar el diagnóstico de muestras provenientes de pacientes que ya se encuentran en tratamiento, debido a la influencia que ejercen los fármacos sobre las poblaciones micobacterianas.

Estudios previos reportan que los límites de detección para los ensayos basados en el empleo de fagos requieren de 100-300 bacilos/ml, por lo cual al aumentar los tiempos de recuperación, pueden presentarse más ciclos de replicación conllevando a un aumento en

la sensibilidad (Albay et al. 2003; van der Merwe et al. 2014).

Al comparar la sensibilidad obtenida usando Φ mCherry_{bomb} con otros métodos aprobados por la OMS para la determinación de la resistencia a RIF, se obtuvo una mayor sensibilidad con el FluoFago (100%) respecto al método de la resazurina (95%) y el XpertMTB/RIF (94,1%) de acuerdo a estudios previos (Miyata et al. 2013; Palomino et al. 2002; Chang et al. 2012). Mientras Hemvani, reportó la misma sensibilidad realizando la determinación de resistencia a este fármaco directamente en muestras de esputo usando una metodología basada en fagos (Hemvani et al. 2012); si se compara con la primera generación de FluoFagos, la sensibilidad para la detección de este fármaco aumentó del 94% al 100% (Rondón et al. 2011) aun cuando aquí se evaluó directamente a partir de muestra de esputo. Mientras que O'Donnell y colaboradores reportaron una sensibilidad para determinar resistencia a RIF directamente en muestras de esputo de un 85% (O'Donnell et al. 2015).

La correlación de los resultados obtenidos en el presente estudio con otros previos, permite resaltar la *performance* alcanzada con Φ mCherry_{bomb}, obteniendo una especificidad entre un 98,94% - 99,42% en las diferentes condiciones evaluadas. Sumado a esto, Φ mCherry_{bomb} requiere de bajos costos para la detección y determinación de la resistencia a la RIF, en el caso del XpertMTB/RIF el costo por determinación es de aproximadamente \$95 dólares, mientras que la detección empleando el FluoFago es de \$0,25 centavos de dólar por determinación, es decir 1 dólar para las cuatro condiciones evaluadas por muestra.

Otros métodos que emplean fagos tienen bajos costos, sin embargo requieren de mayor tiempo para brindar el diagnóstico y además presentan otras desventajas respecto a esta nueva generación de FluoFagos al requerir una mayor manipulación de la muestra biológica, en el caso de los Fagos Reporteros de Luciferasa se requiere la adición de un sustrato exógeno y el uso de un luminómetro. El método del XpertMTB/RIF, aceptado por la OMS a pesar de brindar los resultados en tan solo 2 horas presenta el inconveniente de su alto costo y además al ser un método molecular detecta *M. tb* viables y no viables,

propiciando resultados falsos positivos (OMS, 2014; Rahman et al. 2016; Rufai et al. 2014; Teo et al. 2011). A pesar de que el estado fisiológico de *M. tb* presente en el esputo es controversial, pudiendo existir subpoblaciones algunos activos, otros quiescentes; se plantea que el empleo de Φ mCherry_{bomb}, realizando una previa recuperación de la muestra, puede ser una herramienta alternativa para su determinación.

El método de las proporciones define como criterio de resistencia, el crecimiento en el medio de cultivo en presencia del fármaco superior al 1% en comparación con el control. Por debajo de esta proporción la cepa se considera sensible y si la proporción es igual o superior se considera resistente (Canetti, 1965). Debido a los escasos reportes que establecen criterios de resistencia empleando métodos basados en fagos (Rondón et al. 2011); se propuso evaluar la performance usando dos criterios para determinar una muestra clínica como resistente o sensible dependiendo de la cantidad de bacilos fluorescentes observados en 100 campos. Al no registrarse diferencias importantes al incluir estos criterios de positividad, se plantea que la presencia de un bacilo fluorescente es suficiente para determinar la presencia de *M. tb* y/o su resistencia de acuerdo a las condiciones de la infección. Estos resultados están correlacionados con la alta especificidad que presenta Φ mCherry_{bomb}.

Durante la evaluación de la *performance* del FluoFago en muestras clínicas se identificaron a posteriori especies de micobacterias no tuberculosas, pertenecientes a las especies: *M. szulgai*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. abscessus* y *M. avium*; las cuales habían sido determinadas como TB (+) y algunas de ellas resistentes a RIF. Estas micobacterias medioambientales no tuberculosas, abundan y pueden cultivarse a partir de fluidos corporales no estériles, tal como el esputo y otras muestras respiratorias. La identificación de estas micobacterias se ha llevado a cabo en función de las características fenotípicas y pruebas bioquímicas (Vald & Cid, 2016).

Es importante la diferenciación entre estas especies y el complejo *M. tb*, ya que el régimen terapéutico de las micobacterias atípicas se basa en las opiniones de expertos, debido a que existe una poca o nula correlación entre la resistencia presentada *in vivo*

con la registrada *in vitro*, además el tratamiento de la enfermedad pulmonar causada por estas micobacterias es arduo, largo y costoso (Salzer et al. 2016; Wassilew et al. 2016).

El FluoFago Φ mCherry_{bomb} y los fagos derivados de TM4 infectan todas las cepas de *M. tb* probadas hasta la fecha. El amplio rango de huésped que presentan estos fagos, extienden las ventajas para ser usados con otros fines (Jain et al. 2011; Urdániz et al. 2016). De las especies micobacterianas no tuberculosas, identificadas en el presente estudio, se evidenció que *M. avium* presenta una menor señal fluorescente respecto a las otras; de acuerdo a reportes previos algunos aislamientos de esta especie, presentaron una baja señal cuando fueron ensayados con fagos reporteros de luciferasa que también son derivados de TM4 (Riska et al. 1997).

La correcta discriminación entre especies pertenecientes al complejo *M. tb* y especies micobacterianas no tuberculosas, se logró mediante el uso del ácido para-nitrobenzoico (PNB) que inhibe selectivamente las especies pertenecientes al complejo *M. tb* (Shakoor et al. 2010). Sharma y colaboradores evaluaron el efecto del PNB para discriminar entre 12 especies micobacterianas empleando 112 aislamientos, logrando una correcta determinación entre estos dos grupos de micobacterias excepto de la especie *M. marinum* (Sharma et al. 2010). Al respecto, Shakkor reporta que el empleo de p-nitro- α -acetamino- β -hidroxi-propiofenona (NAP) es superior que el PNB para la diferenciación de *M. marinum* y *M. kansasii* (Shakoor et al. 2010). Al comparar los resultados obtenidos con estudios previos respecto al tiempo requerido para obtener la inhibición de especies del complejo *M. tb*, en el presente estudio se observó una inhibición a las 24 horas, mientras que Sharma reportó un tiempo promedio de notificación de 5,9 días y 4,5 días para *M. tb* y micobacterias no tuberculosas, respectivamente (Sharma et al. 2010). Sin embargo, otros reportes informan 6,3 días y 2,5 días para *M. tb* y micobacterias no tuberculosas, respectivamente (Giampaglia et al. 2007).

El FluoFago Φ mCherry_{bomb}, no solo brinda la posibilidad de ser usado para la determinación de resistencia a RIF; resultados de este estudio revelan concordancias en el patrón de resistencia a otros fármacos de primera línea, segunda línea y

fluoroquinolonas empleados en el tratamiento de la TB. Sin embargo, se requiere estandarizar las condiciones óptimas para mejorar los resultados con algunos fármacos que fueron discordantes al compararse con el método de referencia. A futuro se plantea evaluar la metodología automatizada empleando un fluorímetro (Urdániz 2016) para determinar rápidamente el patrón completo de susceptibilidad a antibióticos en aislamientos clínicos.

La excelente *performance* demostrada por Φ mCherry_{bomb} en el presente estudio, expone las ventajas de la segunda generación de FluoFagos como una alternativa para el diagnóstico de la TB activa y la determinación de resistencia a RIF; ofreciendo resultados de forma rápida (48 – 96 horas) con alta sensibilidad y especificidad, surge como una metodología económica (\$0,25 centavos de dólar por determinación) facilitando su implementación en países de escasos recursos económicos, requiriendo un mínimo de manipulación de muestras potencialmente patógenas brindando condiciones de bioseguridad al operador, y ensayos preliminares permiten vislumbrar su potencial uso para la determinación de patrones de resistencia a diversos fármacos.

CAPITULO IV. ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO EPIDEMIOLÓGICAS DE LOS INDIVIDUOS PARTICIPANTES

Entre los principales factores de riesgo asociados a la aparición de la TB se encuentran: la pobreza, el sistema inmune deteriorado, la emigración de un país con alta incidencia de TB, el abuso de alcohol o de drogas, la desnutrición, el hacinamiento, el historial de contactos con personas TB (+), entre otros (Castillo Ávila et al. 2013). El estudio de estos factores, permitió identificar cuáles de ellos afecta a la población en estudio y cómo influyen en el éxito de curación de la enfermedad tuberculosa. La falta de información y acceso a algunas de las historias clínicas y faltas en los registros de información de los pacientes, fue una de las principales limitaciones para realizar este estudio. Sin embargo, a partir de los datos recuperados fue posible tener una primera aproximación de las características clínico – epidemiológicas de la población participante.

A pesar de la existencia de un sinnúmero de reportes en donde se establecen los factores mayormente relacionados con el desarrollo de la enfermedad tuberculosa, en el presente estudio no fue posible correlacionar algunos de ellos debido a desvíos en el muestreo. Este sesgo en la información surge como consecuencia del desequilibrio entre la población participante TB (+) y TB (-). Esto se debe a que el objetivo final de esta tesis surge como consecuencia del interés en conocer algunas características clínicas de la población participante que permitieran explicar los resultados obtenidos en la evaluación de la *performance* del FluoFago y no fue planteado inicialmente como un estudio epidemiológico poblacional.

De acuerdo a una nota descriptiva de la OMS, la tuberculosis afecta principalmente a los adultos en los años más productivos de su vida, lo que no significa que los demás grupos de edad estén exentos de riesgo (OMS 2016). Esta distribución etaria se corresponde con la obtenida en el presente estudio, presentando el mismo comportamiento entre argentinos y extranjeros. Teniendo en cuenta que la mayor distribución por edad, se dio en el rango de personas de 20-34 años, esta población de adultos jóvenes, representa un impacto importante en un grupo poblacional eje de la economía (Bossio et al. 2012). Además, al tener en cuenta la población del presente estudio en donde se registró mayor cantidad de casos de TB correspondiendo a la población entre 20-64 años; se observa que la enfermedad tuberculosa se presenta mayormente en hombres (51,76%) que en mujeres (29,88%), estos resultados son concordantes con lo reportado por el SNVS para la República Argentina (ANLIS 2016).

Los altos índices de inmigración correlacionados con presiones socioeconómicas se encuentran relacionados de forma significativa a la mortalidad por TB, sugiriendo que estas poblaciones presentan una mayor vulnerabilidad a la enfermedad (Bates et al. 2004). Se considera que el incremento en la incidencia de casos registrados de TB en la capital de Buenos Aires es la inmigración proveniente en su mayoría de países sudamericanos que registran cifras importantes en el número de casos de TB. Sin embargo, Rivera y colaboradores reportan que si bien la incidencia de TB en inmigrantes aumentó significativamente en los últimos años, no representan un factor de riesgo sanitario relevante, debido a que no constituyen la mayoría de los casos ni a nivel país, ni

en el área metropolitana de Buenos Aires, ni siquiera en las áreas de alta incidencia de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (Rivera et al. 2014). De acuerdo a nuestros resultados y teniendo en cuenta sólo aquellos casos que presentan registro en la nacionalidad, se observa una representación de 253 personas de nacionalidad argentina, respecto a 110 extranjeros, de esta última población 80 fueron notificados con TB (+), observándose una mayor preponderancia de la población boliviana. La distribución de acuerdo a la nacionalidad presentada en este estudio se corresponde de una mejor manera con otros reportes, los cuales notifican que la población extranjera se encuentra representada por un 17% - 30% (González & Sáenz 2012).

Uno de los mayores problemas en la actualidad, lo constituye la coinfección de la TB y el VIH-SIDA. En las personas coinfectadas, estos dos patógenos se potencian mutuamente, acelerando el deterioro de las funciones inmunológicas. Se ha reportado que la coinfección por VIH es el factor de riesgo más importante para desarrollar TB, aumentando la susceptibilidad primaria o de reinfección y también el riesgo de reactivación de la TB en pacientes con TB latente; las personas infectadas con el VIH presentan una probabilidad veinte veces mayor de desarrollar TB, respecto a las personas no infectadas con el virus (Lawn & Zumla 2011). La infección por *M. tb* también tiene un impacto sobre la respuesta inmune al VIH, acelerando la progresión de la infección del VIH-SIDA (Bruchfeld et al. 2015). A partir de los resultados obtenidos en el presente estudio, se encontraron diferencias significativas ($p=0.008769$) entre la población TB (+) y TB (-) que presentaban coinfección por VIH, corroborando la estrecha relación que existe entre estas dos enfermedades. Es importante destacar que sólo 330 personas de 425 incluidas en el presente estudio, tienen información sobre su condición de VIH; se debe considerar que el VIH al comprometer el estado inmunológico del paciente y en consecuencia, el éxito del tratamiento para la TB, estas dos condiciones se deberían de conocer y abordar en forma conjunta para contribuir a mejorar la salud de los pacientes TB-VIH/SIDA (+). Esta falta de registro en la información también es reportada en informes de la República Argentina (ANLIS 2016).

La TB, como es bien conocido es una enfermedad que se desarrolla por múltiples factores; no solamente las personas inmunosuprimidas por el VIH-SIDA presentan mayor

riesgo de adquirir *M. tb* y desarrollar la enfermedad. Otras enfermedades y condiciones de salud aumentan la probabilidad de contraer TB, la DBT es otra de las enfermedades que se asocia con la enfermedad pulmonar al presentarse tres veces más el riesgo de TB en esta población (Lawn & Zumla 2011). Como se mencionó en un principio, al no ser el objetivo inicial de este estudio el análisis epidemiológico poblacional, sino el estudio de las características clínico-epidemiológicas de una población, se presentaron desviaciones en el muestreo que no permitieron establecer relaciones directas y significativas entre otras enfermedades y la TB, siendo que es conocida la relación entre varias de ellas.

Sumado a los factores clínicos que pueden aumentar las probabilidades de desarrollar la enfermedad tuberculosa, existen factores socio-económicos que también intervienen incrementando las posibilidades de infección con *M. tb* y desarrollo de la enfermedad pulmonar. El ámbito laboral es uno de estos factores, existen estudios reportando que el personal de salud que se desempeña en centros donde se atiende a pacientes con TB está expuesto a este riesgo en mayor medida que el personal de salud que se desempeña en otros ámbitos. Casas y colaboradores reportaron una incidencia de la infección por *M. tb* en esta población del 15,4% (Casas et al. 2015); en nuestro estudio se reportaron 6 casos de personas que se desempeñan en esta área y los 6 fueron diagnosticados TB (+), de lo cual podemos afirmar si se compara con otras ocupaciones, que existe una estrecha relación entre esta ocupación y la probabilidad de adquirir la enfermedad tuberculosa.

Por otra parte, Fica y colaboradores describen que dentro de esta población existen algunos que presentan un riesgo mayor correspondiendo a los médicos, estudiantes de medicina y enfermeras; este mismo comportamiento fue descrito en un estudio realizado en Brasil, en donde se reporta un riesgo cuatro veces más elevado en estudiantes de medicina (Silva V et al. 2002; Fica C et al. 2008). A partir de este estudio, se puede resaltar que la mayoría de casos de diagnóstico TB (+) se enmarcó en la población que no desarrolla ninguna actividad laboral, esto permite destacar la vulnerabilidad de la población que asiste a este hospital, dificultando el manejo y control del tratamiento, ya que por lo general esta misma población es la que está más estrechamente relacionada con el consumo de drogas ilícitas y alcohol, un

comportamiento similar se observó en el presente estudio con las personas en situación de calle, en donde todos fueron diagnosticados TB (+).

Una relación bastante controversial surge a partir de la vinculación de la alta incidencia de casos registrados en la población de nacionalidad boliviana, con el desempeño en el área de la costura y el desarrollo de la TB. A lo cual Goldberg y colaboradores destaca que más que la asociación de la TB con la inmigración boliviana, en términos de "enfermedad importada", este fenómeno se vincula mayormente con los modos de vida y trabajo realizado por la mayoría de estos inmigrantes en la República Argentina.

Al respecto y apoyando esta idea, están descriptos algunos estudios en donde no se registran evidencias de transmisión de cepas extranjeras autóctonas andinas a pacientes argentinos a través de los inmigrantes que llegan enfermos o contraen la enfermedad en el país; pero sí se observa un comportamiento en sentido contrario, por ejemplo la cepa M, que se diseminó entre los inmigrantes bolivianos que buscaron asistencia en los hospitales metropolitanos involucrados en el brote con esta cepa. Existiendo una correlación de TB con la cepa M con internaciones previas en el Hospital Muñiz o en cárceles, más no con personas provenientes de países con alta incidencia (Goldberg 2010; Monteserin et al. 2013; Eldholm et al. 2015; Waisman et al. 2006).

Una variable más que se encuentra estrechamente relacionada a la TB es la asociación entre familiares o conocidos que han padecido la enfermedad, esto indica que al estar expuesto al agente causal así mismo se ven incrementadas las posibilidades de adquirir la enfermedad. Esta situación se presenta con gran frecuencia debido a las medidas preventivas insuficientes dentro del núcleo familiar de la persona que padece de TB, conllevando a incrementar el riesgo de contagio (Castillo Ávila et al. 2013).

Esta situación se relaciona a su vez con las condiciones de vivienda, debido a que es común que sean familias numerosas conviviendo en espacios reducidos. De acuerdo al presente estudio el 39,56% de las personas diagnosticadas TB (+), tuvieron contacto previo con personas portadoras de la enfermedad; sin embargo, el test de Fisher arrojó un valor de p no significativo ($p=0.09298$) entre estas dos variantes, este resultado se da probablemente por el sesgo existente en la población TB (+) y TB (-). A pesar de que este

estudio no pudo establecer una fuerte asociación entre estos dos parámetros está descripta la transmisión de cepas de *M. tb* entre miembros de la misma familia (González & Sáenz 2012; Morcillo et al. 2014).

Las adicciones juegan un rol importante en la adherencia y culminación con éxito del tratamiento de la enfermedad tuberculosa, esta descripto que el consumo de tabaco, drogas ilícitas y el alcohol aumentan el riesgo de desarrollar TB (Lawn & Zumla 2011; Gajalakshmi et al. 2003). En el presente estudio registró un 52,31% (147 casos) y 40% (10 casos) se trata de personas con algún tipo de adicción en la población TB (+) y TB (-), respectivamente.

Finalmente, la adherencia y éxito en el tratamiento está dado por varios factores. Al tratarse de una enfermedad que requiere de tratamientos extensos y muchas veces ocasionan efectos adversos de importancia, los pacientes tienden a abandonarlo cuando su estado de salud se ve mejorado o cuando empiezan a aparecer otros síntomas consecuencia del tratamiento. Herrero y colaboradores, reportaron que las personas del género masculino se convierten en un factor de riesgo importante de la no adherencia, debido a que esta población, por lo general son quienes trabajan para generar ingresos de manutención para su núcleo familiar y su ausencia laboral para el cumplimiento de citas médicas presenta un fuerte impacto en la economía de estas familias. Además, la población masculina está mayormente relacionada a conductas de estilo de vida tales como las adicciones que influye negativamente en el éxito del tratamiento (Herrero et al. 2015). A la culminación del presente estudio, la mayoría de la población continuaba en tratamiento, registrándose además una similitud en el número de pacientes que terminaron el tratamiento de forma exitosa y los pacientes que abandonaron. No se puede desestimar el registro de personas que fallecieron, ya que esto indirectamente puede indicar la falta de un diagnóstico precoz de TB para instaurar tratamientos correctos y a tiempo para mejorar la calidad de vida de estas personas y así mismo detener la cadena de transmisión.

A partir del estudio de las características clínico epidemiológicas de esta población se puede inferir que la TB continua siendo una enfermedad asociada a la pobreza, a

condiciones de hacinamiento, en donde factores como el VIH-SIDA continúan teniendo una gran influencia y la distribución se sigue presentando con desigualdad de género.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- La metodología basada en el empleo de FluoFagos que acarrean el StrepTag permite la recuperación de complejos fago-bacteria de forma sencilla y eficiente. A pesar de las ventajas exhibidas en ensayos de laboratorio, no fue posible evaluar la *performance* en el ámbito hospitalario para la captura de micobacterias presentes en muestras clínicas debido a los costos de las perlas magnéticas recubiertas de StrepTactin. Encontrar un sistema alternativo que permita el reemplazo de las perlas magnéticas comerciales, brinda una nueva opción para el diagnóstico precoz de la tuberculosis.
- La segunda generación de FluoFagos – Φ mCherry_{bomb} detectan bacterias viables, permitiendo la identificación y determinación de resistencia a RIF de *M. tb* de manera rápida (48 – 96 horas) y sencilla a un bajo costo por determinación (\$0,25 dólares).
- La fijación de las muestras biológicas posterior al proceso de infección con Φ mCherry_{bomb}, permite la manipulación segura ofreciendo mayor bioseguridad al operador sin disminuir la fluorescencia, la cual permanece estable hasta por tres meses, ofreciendo la posibilidad de trasladar la muestra de forma segura para su análisis.
- El empleo del PNB en los ensayos con el FluoFago discrimina rápidamente entre especies de micobacterias no tuberculosas y las pertenecientes al complejo *M. tb*, permitiendo instaurar el régimen terapéutico adecuado.
- Ensayos preliminares vislumbran el potencial de Φ mCherry_{bomb} para la determinación de resistencia a fármacos de primera y segunda línea, además las fluoroquinolonas empleadas en el tratamiento de la TB.

- El estudio de las características clínico-epidemiológicas de la población, permitió identificar algunos de los factores mayormente asociados al desarrollo de la enfermedad. Además, reconocer los componentes más influyentes en el tratamiento y éxito del control de la enfermedad; permite adoptar medidas para disminuir la deserción al tratamiento, disminuyendo la transmisión de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, S. & Mokaddas, E., 2014. Current status and future trends in the diagnosis and treatment of drug-susceptible and multidrug-resistant tuberculosis. *Journal of Infection and Public Health*, 7(2).
- Ahuja, S.D. et al., 2012. Multidrug Resistant Pulmonary Tuberculosis Treatment Regimens and Patient Outcomes : An Individual Patient Data Meta-analysis of 9 , 153 Patients. , 9(8).
- Albay, A. et al., 2003. The evaluation of FASTPlaqueTB??? test for the rapid diagnosis of tuberculosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 46(3), pp.211–215.
- Albert, H. et al., 2007. Evaluation of a rapid screening test for rifampicin resistance in re-treatment tuberculosis patients in the Eastern Cape. *South African medical journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde*, 97(9), pp.858–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17985057>.
- Alsultan, A. & Peloquin, C.A., 2014. Therapeutic Drug Monitoring in the Treatment of Tuberculosis : An Update.
- Ambandamurthy, V.A.K.S. et al., 2002. ARTICLES A pantothenate auxotroph of Mycobacterium tuberculosis is highly attenuated and protects mice against tuberculosis. , pp.1171–1174.
- Andrew, P.W. & Roberts, I.A.N.S., 1993. Construction of a Bioluminescent Mycobacterium and Its Use for Assay of Antimycobacterial Agents. , 31(9), pp.2251–2254.
- Andrews, J.R. et al., 2008. Exogenous reinfection as a cause of multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis in rural South Africa. *The Journal of infectious diseases*, 198(11), pp.1582–1589.
- Anthony, R.M. et al., 2006. Light emitting diodes for auramine O fluorescence microscopic screening of Mycobacterium tuberculosis. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 10(9), pp.1060–1062.
- Asmar, S. & Drancourt, M., 2015. Chlorhexidine decontamination of sputum for culturing Mycobacterium tuberculosis. *BMC microbiology*, 15(1), p.155. Available at: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/15/155>.
- Ayubi, E. et al., 2016. The Clinical Usefulness of Tuberculin Skin Test versus Interferon-Gamma Release Assays for Diagnosis of Latent Tuberculosis in HIV Patients : A Meta-Analysis.
- Banaiee, N. et al., 2001. Luciferase Reporter Mycobacteriophages for Detection , Identification , and Antibiotic Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis in Mexico. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(11), pp.3883–3888.
- Banaiee, N. et al., 2003. Rapid identification and susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis from MGIT cultures with luciferase reporter mycobacteriophages. *Journal of Medical Microbiology*, 52(7), pp.557–561.

- Bardarov, S. et al., 1997. Conditionally replicating mycobacteriophages: a system for transposon delivery to Mycobacterium tuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(20), pp.10961–6. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=23545&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Bardarov, S. et al., 2003. Detection and drug-susceptibility testing of M . tuberculosis from sputum samples using luciferase reporter phage : comparison with the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) system. , 45, pp.53–61.
- Bardarov, S. et al., 2002. Specialized transduction : an efficient method for generating marked and unmarked targeted gene disruptions in. *Microbiology*, 148(2002), pp.3007–3017.
- Bates, I. et al., 2004. Vulnerability to malaria , tuberculosis , and HIV / AIDS infection and disease . Part 1 : household level. *Lancet Infectious Disease*, 4(May), pp.267–277.
- Beach, L., 1994. Dormancy of Mycobacterium tuberculosis and Latency of Disease. , 13(11), pp.908–914.
- Bemer, P. et al., 2002. Multicenter Evaluation of Fully Automated BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube 960 System for Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis. , 40(1), pp.150–154.
- Bemer, P. et al., 2004. Multicenter Evaluation of the MB / BACT System for Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis. *Society*, 42(3), pp.1030–1034.
- Ben-kahla, I. & Al-hajoj, S., 2016. Drug-resistant tuberculosis viewed from bacterial and host genomes. *International Journal of Antimicrobial Agents*. Available at:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.07.010>.
- Binetti, A.G., 2011. *Bacteriófagos autóctonos de S. thermophilus: aislamiento, caracterización y obtención de mutantes fagorresistentes*. Tesis para obtener el grado de Doctor en Química. Universidad Nacional del Litoral.-.
- Blakemore, R. et al., 2010. Evaluation of the Analytical Performance of the Xpert MTB / RIF Assay ☒ †. , 48(7), pp.2495–2501.
- Bossio, J.C., Arias, S.J. & Fernández, H.R., 2012. Tuberculosis en Argentina: desigualdad social y de género. *Salud Colectiva*, 8(SUPPL.), pp.77–91. Available at:
<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edselc&AN=edselc.2-52.0-84874006750&lang=es&site=eds-live>.
- Brennan, P.J., 2003. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis*, 83(1–3), pp.91–97.
- Breslauer, D.N. et al., 2009. Mobile Phone Based Clinical Microscopy for Global Health Applications. , 4(7), pp.1–7.

- Brosch, R. et al., 2002. A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(6), pp.3684–3689. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=122584&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Bruchfeld, J., Correia-Neves, M. & Kallenius, G., 2015. Tuberculosis and HIV coinfection. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(7), pp.1–16.
- Burdz, T.V.N., Wolfe, J. & Kabani, A., 2003. Evaluation of sputum decontamination methods for Mycobacterium tuberculosis using viable colony counts and flow cytometry. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 47(3), pp.503–509.
- Calef, K.R. et al., 2013. Fast detection of drug interaction in Mycobacterium tuberculosis by a checkerboard resazurin method. , pp.10–13.
- Cambau, E., 2016. Mycobacterium tuberculosis drug resistance testing: challenges, recent developments and perspectives. *Clinical Microbiology and Infection*. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2016.10.022>.
- Canettf, G., 1965. THE AMERICAN REVIEW. , 92(November), pp.687–703.
- Carriere, C. et al., 1997. Conditionally replicating luciferase reporter phages: improved sensitivity for rapid detection and assessment of drug susceptibility of Mycobacterium tuberculosis. *Journal of clinical microbiology*, 35(12), pp.3232–3239.
- Carroll, P. et al., 2014. Identification of the translational start site of codon-optimized mCherry in Mycobacterium tuberculosis. , pp.2–6.
- Carroll, P. et al., 2010. Sensitive detection of gene expression in mycobacteria under replicating and non-replicating conditions using optimized far-red reporters. *PLoS ONE*, 5(3).
- Casas, I. et al., 2015. Guía para la prevención y control de la tuberculosis en el personal sanitario. *Medicina Clínica*, 145(12), p.534e1-534e13. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.medcli.2015.06.018>.
- Castillo Ávila, I.Y., Cogollo Milanés, Z. & Alvis Estrada, L.R., 2013. Factores asociados a la prevalencia de tuberculosis en el distrito de Cartagena. *Revista Salud Universidad Industrial de Santander*, 45(2), pp.21–27. Available at: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4767133>.
- Chang, K. et al., 2012. Rapid and effective diagnosis of tuberculosis and rifampicin resistance with Xpert MTB/RIF assay: A meta-analysis. *Journal of Infection*, 64(6), pp.580–588. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2012.02.012>.
- Chat, T., To, A. & Chat, C.D.C., 2001. Virus Maturation Involving Large Subunit Rotations and Local Refolding. , 292(April), pp.744–749.
- Chatterjee, M. et al., 2013. Effects of different methods of decontamination for successful

- cultivation of *Mycobacterium tuberculosis*. *Indian Journal of Medical Research*, 138(OCT), pp.541–548.
- Chauca, J.A., Palomino, J. & Guerra, H., 2007. Evaluation of the accuracy of the microplate Alamar Blue assay for rapid detection of MDR-TB in Peru. , 11(September 2006), pp.820–822.
- Choi, R. et al., 2017. Recommendations for Optimizing Tuberculosis Treatment : Therapeutic Drug Monitoring , Pharmacogenetics , and Nutritional Status Considerations. , pp.97–107.
- Collins, L.A. & Franzblau, S.G., 1997. Microplate Alamar Blue Assay versus BACTEC 460 System for High-Throughput Screening of Compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. , 41(5), pp.1004–1009.
- Dabrowska, K. et al., 2005. A review: Bacteriophage penetration in vertebrates. *Journal of Applied Microbiology*, 98(1), pp.7–13.
- Demers, A.-M. et al., 2016. Direct susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* for pyrazinamide using the BACTEC MGIT 960 system. *Journal of clinical microbiology*, 54(February), p.JCM.03162-15. Available at: <http://jcm.asm.org/lookup/doi/10.1128/JCM.03162-15> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26912751>.
- Dorman, S.E. et al., 2014. Interferon- γ Release Assays and Tuberculin Skin Testing for Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection in Healthcare Workers in the United States. , 189, pp.77–87.
- Dusthacker, A., Kumar, V., et al., 2008. Construction and evaluation of luciferase reporter phages for the detection of active and non-replicating tubercle bacilli. *Journal of Microbiological Methods*, 73(1), pp.18–25.
- Dusthacker, A., Hassan, V.N.S. & Kumar, V., 2008. Tape measure protein having MT3 motif facilitates phage entry into stationary phase cells of *Mycobacterium tuberculosis*. *Computational Biology and Chemistry*, 32(5), pp.367–369.
- Eldholm, V. et al., 2015. Four decades of transmission of a multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* outbreak strain. *Nature communications*, 6(May), p.7119. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4432642&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Faksri, K. et al., 2015. Development and application of single-tube multiplex real-time PCR for lineage classification of *Mycobacterium tuberculosis* based on large sequence polymorphism in Northeast Thailand. *Tuberculosis*, 95(4), pp.404–410. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2015.04.009>.
- Falzon, D. et al., Resistance to fluoroquinolones and second-line injectable drugs : impact on multidrug-resistant TB outcomes. , pp.156–168.

- Fica C, A. et al., 2008. Tuberculosis in healthcare workers. *Revista chilena de infectología : órgano oficial de la Sociedad Chilena de Infectología*, 25(4), pp.243–55. Available at: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0716-10182008000400001&script=sci_arttext%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18769770.
- Fletcher, H.A. & Schrager, L., 2016. TB vaccine development and the End TB Strategy : importance and current status. , pp.212–218.
- Fonseca, L.D.S. et al., 2012. Comparative evaluation under routine conditions of the nitrate reduction assay , the proportion assay and the MGIT 960 assay for drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. , 107(February), pp.142–144.
- Ford, M.E. et al., 1998. Mycobacteriophage TM4 : genome structure and gene expression. , 79, pp.63–73.
- Forrellad, M.A. et al., 2013. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence*, 4(1), pp.3–66. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/viru.22329>.
- Franke, M.F. et al., 2015. Counting Pyrazinamide in Regimens for Multidrug-Resistant Tuberculosis. , 12(5).
- Fu, X. et al., 2015. Mycobacteriophages : An important tool for the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* (Review). , pp.13–19.
- Gajalakshmi, V. et al., 2003. Smoking and mortality from tuberculosis and other diseases in India: Retrospective study of 43 000 adult male deaths and 35 000 controls. *Lancet*, 362(9383), pp.507–515.
- Gall, K. & Barker, L.P., 2006. Differential green fluorescent protein expression from mycobacterial promoter constructs in *Escherichia coli* and *Mycobacterium marinum*.
- Gandhi, N.R. et al., 2010. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. *The Lancet*, 375(9728), pp.1830–1843. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60410-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60410-2).
- Garberi, J. et al., 2011. Diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* using molecular biology technology. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(2), pp.89–93. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60002-6](http://dx.doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60002-6).
- Giampaglia, C.M.S. et al., 2007. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* from other mycobacteria with 4-nitrobenzoic acid using MGIT960. , 11(April), pp.803–807.
- Glaziou, P. et al., 2013. Global epidemiology of tuberculosis. *Semin Respir Crit Care Med.*, 34(1), pp.3–16.
- Goh, K.S. & Rastogi, N., 2010. Simple and rapid method for detection of nitrate reductase activity of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium canettii* grown in the Bactec

- MGIT960 system. *Journal of Microbiological Methods*, 81(2), pp.208–210. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2010.03.005>.
- Goldberg, A., 2010. Sociocultural factors in the health care process of patients with tuberculosis, of Vaccarezza Institute of Muñiz Hospital, 2009. *Revista Argentina de Salud Pública*, 1(5), pp.13–21.
- González, C. & Sáenz, C., 2012. Tratamiento directamente observado de la tuberculosis en un hospital de la ciudad de Buenos Aires. *Medicina*, 72(1), pp.371–379.
- Gonzalo, X. & Drobniewski, F., 2013. Is there a place for β -lactams in the treatment of multidrug-resistant/ extensively drug-resistant tuberculosis? Synergy between meropenem and amoxicillin/clavulanate. , (October 2012), pp.366–369.
- Gross, L.A. et al., 2000. The structure of the chromophore within DsRed , a red fluorescent protein from coral.
- Grove, D., 2000. Leaders Modern laboratory diagnosis of mycobacterial infections. , pp.727–732.
- Hatfull, G.F., 2012. Complete Genome Sequences of 138 Mycobacteriophages. *Journal of Virology*, 86(4), pp.2382–2384.
- Hatfull, G.F., 2010. Mycobacteriophages : Genes and Genomes.
- Hatfull, G.F., 2012. *The Secret Lives of Mycobacteriophages* 1st ed., Elsevier Inc. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-394621-8.00015-7>.
- Hazbo, M.H. et al., 2003. Photographic and Luminometric Detection of Luciferase Reporter Phages for Drug Susceptibility Testing of Clinical Mycobacterium tuberculosis Isolates. , 41(10), pp.4865–4869.
- Helb, D. et al., 2010. Rapid Detection of Mycobacterium tuberculosis and Rifampin Resistance by Use of On-Demand , Near-Patient Technology \square †‡. , 48(1), pp.229–237.
- Hemvani, N., Patidar, V. & Chitnis, D.S., 2012. A simple and economical in-house phage technique for the rapid detection of rifampin, isoniazid, ethambutol, streptomycin, and ciprofloxacin drug resistance in Mycobacterium tuberculosis, directly on decontaminated sputum samples. *International Journal of Infectious Diseases*, 16(5), pp.e332–e336. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2011.12.016>.
- Hernando, M. & Hazbón, M.H., 2004. Recent advances in molecular methods for early diagnosis of tuberculosis and drug-resistant tuberculosis.
- Herrero, M.B., Ramos, S. & Arrossi, S., 2015. Determinants of non adherence to tuberculosis treatment in Argentina: barriers related to access to treatment. *Rev Bras Epidemiol Apr-Jun*, 18(2), pp.287–298.
- Hong, X. & Hopfinger, a J., 2004. Construction, molecular modeling, and simulation of Mycobacterium tuberculosis cell walls. *Biomacromolecules*, 5, pp.1052–1065.

- Van Ingen, J. et al., 2012. Resistance mechanisms and drug susceptibility testing of nontuberculous mycobacteria. *Drug Resistance Updates*, 15(3), pp.149–161. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drug.2012.04.001>.
- Jacobs-Sera, D. et al., 2012. On the nature of mycobacteriophage diversity and host preference. *Virology*, 434(2), pp.187–201. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2012.09.026>.
- Jacobs, W. et al., 1993. Rapid assessment of drug susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* by means of luciferase reporter phages. *Science*, 260(5109), pp.819–822. Available at: <http://www.sciencemag.org/content/260/5109/819.short>.
- Jacobs, W.R., Tuckman, M. & Bloom, B.R., 1987. Introduction of foreign DNA into mycobacteria using a shuttle phasmid. *Nature*, 327(6122), pp.532–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3473289>.
- Jain, P. et al., 2016. *Mycobacterium tuberculosis* Persistent Cells in Human Sputum. , 7(5), pp.1–13.
- Jain, P. et al., 2011. Reporter phage and breath tests: Emerging phenotypic assays for diagnosing active tuberculosis, antibiotic resistance, and treatment efficacy. *Journal of Infectious Diseases*, 204(SUPPL. 4), pp.1142–1150.
- Jain, P. et al., 2012. ϕ 2GFP10, a high-intensity fluorophage, enables detection and rapid drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(4), pp.1362–1369.
- Jiang, X. et al., 2013. Whole Cell Screen for Inhibitors of pH Homeostasis in *Mycobacterium tuberculosis*. , 8(7).
- Jończyk, E. et al., 2011. The influence of external factors on bacteriophages—review. *Folia Microbiol*, 56(February), pp.191–200.
- Keeler, E. et al., 2006. Reducing the global burden of tuberculosis: the contribution of improved diagnostics. *Nature*, 444 Suppl, pp.49–57.
- van Kessel, J.C. et al., 2007. Recombineering in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature methods*, 4(2), pp.147–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17179933>.
- van Kessel, J.C., Marinelli, L.J. & Hatfull, G.F., 2008. Recombineering mycobacteria and their phages. *Nature reviews. Microbiology*, 6(11), pp.851–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3503148&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Kieser, K.J. & Rubin, E.J., 2014. How sisters grow apart: mycobacterial growth and division. *Nat Rev Microbiol*, 12(8), pp.550–562. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24998739%5Cnhttp://www.nature.com.ezproxy3.lhl.uab.edu/nrmicro/journal/v12/n8/pdf/nrmicro3299.pdf>.

- Koul, A. et al., 2011. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature*, 469(7331), pp.483–490. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature09657>.
- Kreuter, J., 1996. Nanoparticles and microparticles for drug and vaccine delivery. *Journal of anatomy*, 189 (Pt 3(li), pp.503–505.
- Kuaban, C. et al., 2015. High effectiveness of a 12-month regimen for MDR-TB patients in. , 19(July 2014), pp.517–524.
- De La Iglesia, A.I., Stella, E.J. & Morbidoni, H.R., 2009. Comparison of the performances of two in-house rapid methods for antitubercular drug susceptibility testing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(2), pp.808–810.
- Lange, C. et al., 2014. consensus statement. , pp.1–41.
- Lange, C., 2015. Treatment of Tuberculosis.
- Lawn, S.D. & Zumla, A.I., 2011. Tuberculosis. *The Lancet*, 378(9785), pp.57–72.
- Lewandowski, C.M., Co-investigator, N. & Lewandowski, C.M., 2015. WHO Global tuberculosis report 2015. *The effects of brief mindfulness intervention on acute pain experience: An examination of individual difference*, 1, pp.1689–1699.
- López-Hernández, Y. et al., 2016. Mass Spectrometry applied to the identification of *M. tuberculosis* and biomarkers discovery. *Journal of Applied Microbiology*, pp.1485–1497. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/jam.13323>.
- López, A., Galparsoro, D.U. & Fernández, P., 2001. Medidas de concordancia : el índice de Kappa. , pp.2–6.
- Lorenzo, S. De et al., 2013. regimens in the treatment of MDR- / XDR-TB. , 41(6), pp.1386–1392.
- Louw, G.E. et al., 2009. Rv2629 191A / C nucleotide change is not associated with rifampicin resistance in Mycobacterium tuberculosis. , 47(4), pp.500–501.
- Luis, A. et al., 2014. Características epidemiológicas de pacientes con tuberculosis en el Hospital Tránsito Cáceres de Allende. *Ramr*, 4, pp.404–411.
- Lukyanov, K.A. & Belousov, V. V, 2014. Biochimica et Biophysica Acta Genetically encoded fluorescent redox sensors ☆. *BBA - General Subjects*, 1840(2), pp.745–756. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.05.030>.
- Lv, X. et al., 2013. Adverse Reactions Due to Directly Observed Treatment Strategy Therapy in Chinese Tuberculosis Patients : A Prospective Study. , 8(6), pp.1–8.
- M Chalfie, Y Tu, G Euskirchen, WW Ward, D.P., 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science (New York, N.Y.)*, 263(5148), pp.802–805.
- Maeurer, M., Schito, M. & Zumla, A., 2014. Totally-drug-resistant tuberculosis : hype versus hope. *The Lancet Respiratory*, 2(4), pp.256–257. Available at:

[http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600\(14\)70020-7](http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600(14)70020-7).

- Marais, B.J. et al., 2008. Use of Light-Emitting Diode Fluorescence Microscopy to Detect Acid-Fast Bacilli in Sputum. *Clinical Infectious Diseases*, 47(2), pp.203–207. Available at: <http://cid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1086/589248>.
- Marinelli, L.J. et al., 2008. BRED : A Simple and Powerful Tool for Constructing Mutant and Recombinant Bacteriophage Genomes. , 3(12).
- Martin, A. et al., 2006. A new rapid and simple colorimetric method to detect pyrazinamide resistance in Mycobacterium tuberculosis using nicotinamide. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58(2), pp.327–331.
- Martin, A. et al., 2009. Thin layer agar compared to BACTEC MGIT 960 for early detection of Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Microbiological Methods*, 78(1), pp.107–108. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2009.05.001>.
- Martin, A., Portaels, F. & Palomino, J.C., 2007. Colorimetric redox-indicator methods for the rapid detection of multidrug resistance in Mycobacterium tuberculosis: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(2), pp.175–183.
- Mayer, O. et al., 2016. Fluorescent reporter DS6A mycobacteriophages reveal unique variations in infectibility and phage production in mycobacteria. *Journal of Bacteriology*, 198(23), pp.3220–3232.
- Mboowa, G., Namaganda, C. & Ssengooba, W., 2014. Rifampicin resistance mutations in the 81 bp RRDR of rpoB gene in Mycobacterium tuberculosis clinical isolates using Xpert[®] MTB / RIF in Kampala , Uganda : a retrospective study. , pp.1–5.
- McNerney, R. & Traoré, H., 2005. A review: Mycobacteriophage and their application to disease control. *Journal of Applied Microbiology*, 99(2), pp.223–233.
- Mengatto, L., Chiani, Y. & Imaz, M.S., 2006. Evaluation of rapid alternative methods for drug susceptibility testing in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(August), pp.535–542.
- van der Merwe, R.G. et al., 2014. Phage-based detection of bacterial pathogens. *The Analyst*, 139(11), pp.2617–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24658771>.
- Migliori, G.B. et al., 2012. still on the increase ? , 39(6), pp.1290–1291.
- Miyata, M. et al., 2013. Comparison of resazurin microtiter assay performance and BACTEC MGIT 960 in the susceptibility testing of Brazilian clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis to four first-line drugs. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(1), pp.281–285.
- Mokry, J., 2016. Non-Tuberculous Mycobacteria : Classification , Diagnostics , and Therapy.

- Mole, R. et al., 2007. Improved contamination control for a rapid phage-based rifampicin resistance test for *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Medical Microbiology*, 56(10), pp.1334–1339.
- Molina Rueda, M.J., Martín-Vivaldi Jiménez, A. & Molina Rueda, F., 2016. *Notificación de casos de tuberculosis en la República Argentina. Período 1980 - 2015*, Buenos Aires. Available at: <http://www.anlis.gov.ar/iner/wp-content/uploads/2016/11/Notificacion-de-casos-de-Tuberculosis-en-la-Republica-Argentina-Periodo-1980-2015.pdf>.
- Monteserin, J. et al., 2013. Genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* in patients at risk of drug resistance in Bolivia. *Infect Genet Evol*, 17, pp.195–201.
- Moore, D.A.J. et al., 2006. Microscopic-observation drug-susceptibility assay for the diagnosis of TB. *The New England journal of medicine*, 355(15), pp.1539–1550.
- Morcillo, N.S. et al., 2014. Fitness of drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* and the impact on the transmission among household contacts. *Tuberculosis*, 94(6), pp.672–677.
- Müller-taubenberger, A. & Anderson, K.I., 2007. Recent advances using green and red fluorescent protein variants. , pp.1–12.
- Munro, S.A. et al., 2007. Patient Adherence to Tuberculosis Treatment : A Systematic Review of Qualitative Research. , 4(7).
- Musa, H.R. et al., 2005. Drug Susceptibility Testing of. *Microbiology*, 43(7), pp.3159–3161.
- Nasiri, M.J. et al., 2014. Drug resistance pattern of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients of five provinces of Iran. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7(3), pp.193–196. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60019-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60019-5).
- Naveen, G. & Peerapur, B. V., 2012. Comparison of the Lowenstein-Jensen medium, the middlebrook 7H10 medium and MB/BACT for the isolation of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) from clinical specimens. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 6(10), pp.1704–1709.
- Nice, L. et al., 2016. Original article Detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Brazil using a multimarker genetic assay for *katG* and *rpoB* genes. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 20(2), pp.166–172. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2015.12.008>.
- Niderweis, M., 2008. Nutrient acquisition by mycobacteria. *Microbiology*, 154(3), pp.679–692.
- Nunes-halldorson, V.S. & Duran, N.L., 2003. BIOLUMINESCENT BACTERIA : LUX GENES AS ENVIRONMENTAL BIOSENSORS. , pp.91–96.
- O'Donnell, M.R. et al., 2015. A Novel Reporter Phage To Detect Tuberculosis and Rifampin Resistance in a High-HIV-Burden Population. *Journal of clinical microbiology*, 53(7),

- pp.2188–94. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25926493>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4473227>.
- Ocheretina, O. et al., 2014. Correlation between genotypic and phenotypic testing for resistance to rifampin in Mycobacterium tuberculosis clinical isolates in Haiti: Investigation of cases with discrepant susceptibility results. *PLoS ONE*, 9(3).
- Olakunle, O.S. et al., 2014. Knowledge of tuberculosis management using directly observed treatment short course therapy among final year medical students in South Western Nigeria. *Pan African Medical Journal*, 18, pp.4–8.
- OMS, 2014. Diagnóstico de Tuberculosis Xpert MTB/Rif. , pp.2013–2014. Available at:
http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=24334&Itemid=.
- OMS, 2016. Tuberculosis. Available at:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/>.
- Onyebujoh, P. & Zumla, A., 2005. Treatment of tuberculosis: present status and future prospects. *Bulletin of the World ...*, 21246(5), pp.857–865. Available at:
http://www.scielo.org/scielo.php?pid=S0042-96862005001100016&script=sci_arttext&tlng=pt.
- OPS, 2008. MANUAL PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS. PARTE 2-CULTIVO. In p. 114. Available at:
http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/18616/tblabscultivo_2008.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
- Organización Panamericana de la Salud, 2008. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Normas y guía técnica. parte 2 Cultivo. *Tuberculosis*, p.114.
- Organización Panamericana de la Salud, 2015. Situación de la tuberculosis en el Perú en las Américas [sede Web]. Estados Unidos: OPS; 2015 [01 de octubre]. , pp.2015–2016. Available at: [file:///X:/DESCARGAS EN GENERAL/Google Chrome/2016-cha-hoja-informativa-situacion-tb-americas.pdf](file:///X:/DESCARGAS%20EN%20GENERAL/Google%20Chrome/2016-cha-hoja-informativa-situacion-tb-americas.pdf).
- Padya, L. et al., 2015. Molecular identification of mycobacterium species of public health importance in cattle in zimbabwe by 16S rRNA gene sequencing. *Open Microbiology Journal*, 9, pp.38–42. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4676045/pdf/TOMICROJ-9-38.pdf>.
- Pai, M. et al., 2005. Bacteriophage-based assays for the rapid detection of rifampicin resistance in Mycobacterium tuberculosis : a meta-analysis. , pp.175–187.
- Palmero, D. et al., 2015. First Series of Patients With XDR and Pre-XDR TB Treated With Regimens That Included Meropenem-clavulanate in Argentina. *Archivos de Bronconeumología (English Edition)*, 51(10), pp.e49–e52. Available at:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1579212915002773>.

- Palomino, J. et al., 2002. Resazurin Microtiter Assay Plate : Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis. , 46(8), pp.2720–2722.
- Palomino, J.C., Vandamme, P. & Martin, A., 2014. Classical and new assays for detecting drug resistance in tuberculosis. *Biomarkers in medicine*, 8(9), pp.1105–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25402580>.
- Pandey, A.K. et al., 2009. Nitrile-inducible gene expression in mycobacteria. *Tuberculosis*, 89(1), pp.12–16. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2008.07.007>.
- Parida, S.K. et al., 2014. Totally drug-resistant tuberculosis and adjunct therapies.
- Patil, S.S. et al., 2014. Resazurin Tube Method: Rapid, Simple, and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in the Clinical Isolates of Mycobacterium Tuberculosis. , (4), pp.151–157.
- Patra, J. et al., 2014. Tobacco smoking, alcohol drinking, diabetes, low body mass index and the risk of self-reported symptoms of active tuberculosis: Individual Participant Data (IPD) meta-analyses of 72,684 individuals in 14 high tuberculosis burden countries. *PLoS ONE*, 9(5).
- Peres, R.L. et al., 2009. Comparison of two concentrations of NALC-NaOH for decontamination of sputum for mycobacterial culture. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 13(12), pp.1572–1575.
- Pfyffer, G.E. et al., 1997. Comparison of the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) with Radiometric and Solid Culture for Recovery of Acid-Fast Bacilli. , 35(2), pp.364–368.
- Piuri, M. et al., 2013. Generation of affinity-tagged fluoromycobacteriophages by mixed assembly of phage capsids. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(18), pp.5608–5615.
- Piuri, M. & Hatfull, G.F., 2006. A peptidoglycan hydrolase motif within the mycobacteriophage TM4 tape measure protein promotes efficient infection of stationary phase cells. *Molecular Microbiology*, 62(6), pp.1569–1585.
- Piuri, M., Jacobs, W.R. & Hatfull, G.F., 2009. Fluoromycobacteriophages for rapid, specific, and sensitive antibiotic susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis. *PLoS ONE*, 4(3).
- Piuri, M., Jacobs Jr., W.R. & Hatfull, G.F., 2009. Fluoromycobacteriophages for rapid, specific, and sensitive antibiotic susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis. *PLoS ONE*, 4(3), p.e4870. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19300517.
- Poëa-guyon, S. et al., 2013. The enhanced cyan fluorescent protein : a sensitive pH sensor for fluorescence lifetime imaging. , pp.3983–3987.

- Pope, W.H. et al., 2011. Cluster k mycobacteriophages: Insights into the evolutionary origins of mycobacteriophage tm4. *PLoS ONE*, 6(10), pp.1–22.
- Porras, T.B. et al., 2005. Evaluación de métodos fenotípicos y genotípicos para la detección de farmacorresistencia de *Mycobacterium tuberculosis*. *Biomédica*, 25(1), pp.22–33. Available at: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572005000100004&lng=en&nrm=iso&tlng=es.
- Rahman, A. et al., 2016. Comparison of Xpert MTB / RIF Assay and GenoType MTBDR plus DNA Probes for Detection of Mutations Associated with Rifampicin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. , pp.1–11.
- Rao, V.G. et al., 2016. Smoking and alcohol consumption: Risk factors for pulmonary tuberculosis among the tribal community in central India. *Indian Journal of Tuberculosis*, pp.9–12. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijtb.2016.11.009>.
- Riska, P.F. et al., 1997. Specific identification of *Mycobacterium tuberculosis* with the luciferase reporter mycobacteriophage: use of p-nitro-alpha-acetylamino-beta-hydroxy propiophenone. *Journal of clinical microbiology*, 35(12), pp.3225–3231.
- Rockwood, N. et al., 2015. Risk factors for acquired rifamycin and isoniazid resistance: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*, 10(9), pp.1–23.
- Ronacher, K. et al., 2015. Acquired immunodeficiencies and tuberculosis: Focus on HIV/AIDS and diabetes mellitus. *Immunological Reviews*, 264(1), pp.121–137.
- Rond??n, L. et al., 2011. Evaluation of fluoromycobacteriophages for detecting drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(5), pp.1838–1842.
- Rufai, S.B. et al., 2014. Comparison of Xpert MTB / RIF with Line Probe Assay for Detection of Rifampin-Monoresistant *Mycobacterium tuberculosis*. , 52(6), pp.1846–1852.
- Sales, M.L. et al., 2014. Validation of a real-time PCR assay for the molecular identification of *Mycobacterium tuberculosis*. , 1369, pp.1363–1369.
- Salzer, H.J.F. et al., 2016. Personalized Medicine for Chronic Respiratory Infectious Diseases: Tuberculosis, Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Diseases, and Chronic Pulmonary Aspergillosis. *Respiration*, 92(4), pp.199–214.
- Sambandamurthy, V.K. & Jr, W.R.J., 2005. Live attenuated mutants of *Mycobacterium tuberculosis* as candidate vaccines against tuberculosis. , 7, pp.955–961.
- Sancineto, A.E., 2009. *Tuberculosis. Diagnóstico y Tratamiento* 1 edición. Lajouane, ed., Buenos Aires.
- Scheicher, M.E., Filho, J.T. & Vianna, E.O., 2003. Sputum induction: Review of literature and proposal for a protocol. *Sao Paulo Medical Journal*, 121(5), pp.213–219.

- Seaman, T. et al., 2003. The use of a novel phage-based technology as a practical tool for the diagnosis of tuberculosis in Africa. , 2(February), pp.40–45.
- Shakoor, S. et al., 2010. Use of p-nitrobenzoic acid in 7H10 agar for identification of Mycobacterium tuberculosis complex: a field study. *Research in Microbiology*, 14(May), pp.1644–1646.
- Shaner, N.C. et al., 2004. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. , 22(12), pp.1567–1572.
- Shankar, E.M. et al., 2014. HIV-Mycobacterium tuberculosis co-infection: A “danger-couple model” of disease pathogenesis. *Pathogens and Disease*, 70(2), pp.110–118.
- Sharma, B. et al., 2010. Evaluation of a Rapid Differentiation Test for Mycobacterium Tuberculosis from other Mycobacteria by Selective Inhibition with p-nitrobenzoic Acid using MGIT 960. *Journal of laboratory physicians*, 2(2), pp.89–92. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3040081&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Shiferaw, G. et al., 2007. Evaluation of microscopic observation drug susceptibility assay for detection of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(4), pp.1093–1097.
- Símboli, N. et al., 2005. In-house phage amplification assay is a sound alternative for detecting rifampin-resistant Mycobacterium tuberculosis in low-resource settings. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(1), pp.425–427.
- Sivaramakrishnan, G. et al., 2013. Luciferase reporter phage phAE85 for rapid detection of rifampicin resistance in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 6(9), pp.728–731. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645\(13\)60127-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645(13)60127-3).
- Snapper, S.B., Melton, R.E. & Kieser, S.M.T., 1990. Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of Mycobacterium smegmatis. , 4, pp.1911–1919.
- Sotgiu, G., Alffenaar, J.C., et al., 2015. International Journal of Infectious Diseases Therapeutic drug monitoring: how to improve drug dosage and patient safety in tuberculosis treatment. *International Journal of Infectious Diseases*, 32, pp.101–104. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2014.12.001>.
- Sotgiu, G., Centis, R. & Migliori, G.B., 2015. Tuberculosis Treatment and Drug Regimens.
- Springer, B. et al., 2009. Quantitative drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis by use of MGIT 960 and EpiCenter instrumentation. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(6), pp.1773–1780.
- Stella, E.J., De La Iglesia, A.I. & Morbidoni, H.R., 2009. Mycobacteriophages as versatile tools for genetic manipulation of mycobacteria and development of simple methods

- for diagnosis of mycobacterial diseases. *Revista Argentina de Microbiología*, 41(1), pp.45–55.
- Takiff, H. & Heifets, L., 2002. In search of rapid diagnosis and drug-resistance detection tools: Is the FASTPlaqueTB test the answer? *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 6(7), pp.560–561.
- Teo, J. et al., 2011. Comparison of Two Nucleic Acid Amplification Assays , the Xpert MTB / RIF Assay and the Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Assay , for Detection of Mycobacterium tuberculosis in Respiratory and Nonrespiratory Specimens . , 49(10), pp.3659–3662.
- The, F.O.F., Regimen, S.M. & Composition, R., 2016. the Shorter Mdr-Tb Regimen. , (May).
- Tolba, M. et al., 2010. Oriented immobilization of bacteriophages for biosensor applications. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(2), pp.528–535.
- Torrey, H.L. et al., 2016. High Persister Mutants in Mycobacterium tuberculosis. , pp.1–28.
- Traore, H. et al., 2007. Low-cost rapid detection of rifampicin resistant tuberculosis using bacteriophage in Kampala, Uganda. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 6, p.1. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1779803&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Tsien, R.Y., 1998. The green fluorescent.
- Urbanczik, R. et al., 2004. Appropriateness of using two instead of a single sputum specimen for monitoring treatment of pulmonary tuberculosis. , 8(12), pp.1510–1513.
- Urdániz, E. et al., 2016. Rapid Whole-Cell Assay of Antitubercular Drugs Using Second-Generation Fluoromycobacteriophages. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(5), pp.3253–3256. Available at: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.03016-15>.
- V, S., A, C. & A, K., 2002. Knowledge of risk factors and utilization of cervical cancer screening services among health care workers in a Teaching Hospital in Southwestern Nigeri. *International Journal of Medicine and Medical Science*, 23(10), pp.591–594. Available at: <http://internationalscholarsjournals.org/download.php?id=480971957105516725.pdf&type=application/pdf&op=1>.
- Vald, F. & Cid, A., 2016. REVISIÓN Micobacterias atípicas. , 95(6), pp.13–39.
- Vega, D., Moreno, J.E. & Mansilla, E.C., *Métodos de determinación de sensibilidad a los antimicrobianos en micobacterias*,
- Vilchèze, C. et al., 2013. HHS Public Access.
- Waisman, J.L. et al., 2006. Evaluación de las medidas de control adoptadas frente a la

epidemia de tuberculosis multirresistente asociada al sida en un hospital hispanoamericano. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 24(2), pp.71–76. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213005X06737302>.

Wassilew, N. et al., 2016. Pulmonary Disease Caused by Non-Tuberculous Mycobacteria. *Respiration*, 91(5), pp.386–402.

WHO, W.H.O., 2010. Framework for Implementing New Tuberculosis Diagnostics. , (July).

WHO, W.H.O., 2016a. *Global Tuberculosis Report*, Geneva, Switzerland. Available at: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/.

WHO, W.H.O., 2016b. *THE SHORTER MDR-TB REGIMEN*, Available at: http://www.who.int/tb/Short_MDR_regimen_factsheet.pdf.

Yew, W.W. & Koh, W., 2016. Emerging strategies for the treatment of pulmonary tuberculosis : promise and limitations ? , pp.15–29.

Yew, W.W. & Leung, C.C., 2006. Antituberculosis drugs and hepatotoxicity. , pp.699–707.

Zelmer, A. et al., 2012. using fluorescence imaging. , (May), pp.1948–1960.