



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

**Determinación de la estabilidad de medios de cultivo suplementados listos para ser
usados basados en MODS de *Mycobacterium tuberculosis***

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología

Karen Ysabel Lopez Dongo

Asesor

Dra. Patricia Sheen Cortavarria

Lima, Perú

2025

Jurado calificador

Presidente: Dr. Holger Maita Malpartida

Vocal: Dra. Manuela Renee Verastegui Pimentel

Secretaria: Mg. Ana Cecilia Colarossi Salinas



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Los egresados:

Nº	APELLIDOS Y NOMBRES
1.	LOPEZ DONGO KAREN YSABEL

Pertenecientes al programa de la **CARRERA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**, autores del trabajo titulado: **Determinación de la estabilidad de medios de cultivo suplementados listos para ser usados basados en MODS de *Mycobacterium tuberculosis***, el cual ha sido elaborado, sustentado y aprobado, según corresponda, para optar por el **TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA** bajo la modalidad de **TESIS**.

En calidad de docentes asesores de la Universidad Peruana Cayetano Heredia:

Nº	APELLIDOS Y NOMBRES DEL DOCENTE	FACULTAD	NIVEL DE ASESORÍA
1.	SHEEN CORTAVARRIA PATRICIA	FACIE	ASESOR

Declaramos que el contenido del presente documento es original y que las citas y referencias a otros autores cumplen con las normas académicas establecidas. En ese sentido, hacemos constar que:

- El documento presenta un porcentaje de similitud de **8%**, según el reporte emitido por el software **Turnitin®** (identificador de entrega: **3365273143**; fecha de entrega: **07/10/2025**).
- Tras una revisión detallada del reporte y del contenido del trabajo en cuestión, no se han identificado indicios de plagio.
- Se certifica que el documento respeta los principios de integridad académica y cumple con los requisitos institucionales de originalidad.

Lugar y fecha: **Lima, 07 de octubre de 2025**

Firma del asesor

Nº DNI: 09541127

ORCID: 0000-0002-7118-9301

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a todas las personas que me acompañaron y apoyaron a lo largo de estos cinco años de estudio. En especial, a mi mamá, Elisa Dongo, quien me ha cuidado con amor incondicional y ha sido mi mayor inspiración en cada etapa de mi vida. A mi papá, William López, en quien siempre puedo confiar, y cuyo esfuerzo y cariño constante han hecho posible que alcance muchas de mis metas; le estaré eternamente agradecida. También dedico este trabajo a mi hermano, a mi mami, a Darius y a toda mi familia, quienes han sido mi motivación para dar siempre lo mejor de mí.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a mi asesora, la doctora Patricia Sheen, y al doctor Mirko Zimic por el valioso apoyo brindado durante el desarrollo de mi tesis. Asimismo, expreso mi gratitud a mis compañeros del Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular, quienes con su dedicación, enseñanza y constante motivación contribuyeron significativamente a mi formación.

ÍNDICE

RESUMEN	Pág. 01
ABSTRACT	Pág. 02
I. INTRODUCCIÓN	Pág. 04
II. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN Y OBJETIVOS	Pág. 07
III. MATERIALES Y MÉTODOS	Pág. 08
3.1. Variantes de preparación del medio 7H9- OADC	Pág. 08
3.1.1. Medio mezclado en polvo	Pág. 08
3.1.2. Medio liofilizado	Pág. 09
3.1.3. PANTA	Pág. 10
3.2. Diseño del estudio	Pág. 10
3.3. Muestra biológica	Pág. 11
3.4. Determinación del crecimiento de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en los medios modificados	Pág. 13
3.5. Determinación cualitativa del crecimiento de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en los medios modificados	Pág. 15
3.6. Determinación cuantitativa del crecimiento de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en los medios modificados	Pág. 15
3.7. Evaluación de contaminación de medios modificados	Pág. 15
3.8. Evaluación de turbidez en medios modificados	Pág. 16
3.9. Evaluación de cambio de pH en medios modificados	Pág. 16
3.10. Análisis estadístico	Pág. 16
IV. RESULTADOS	Pág. 17

4.1.	Determinación cualitativa del crecimiento de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en los medios modificados	Pág. 17
4.2.	Determinación cuantitativa del crecimiento de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en los medios modificados	Pág. 19
4.3.	Evaluación de contaminación de medios modificados	Pág. 23
4.4.	Evaluación de turbidez en medios modificados	Pág. 26
4.5.	Evaluación de cambio de pH en medios modificados	Pág. 26
4.6.	Análisis de costos	Pág. 27
V.	DISCUSIÓN	Pág. 29
VI.	CONCLUSIONES	Pág. 38
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	Pág. 39
	ANEXOS	Pág. 45

RESUMEN

La prueba MODS (Microscopic-Observation Drug Susceptibility) representa una herramienta eficaz, rápida y de bajo costo para el diagnóstico de tuberculosis (TB) y la detección de resistencia a fármacos. Sin embargo, su implementación a gran escala se ve limitada por la compleja preparación del medio de cultivo 7H9-OADC-PANTA. En este contexto, el presente estudio evaluó la estabilidad microbiológica y funcional de dos formulaciones de medios deshidratados listos para usar: un medio mezclado en polvo y un medio liofilizado, como alternativas al medio convencional. Se prepararon ambos medios bajo condiciones controladas y se almacenaron a 4°C y 30°C por hasta 150 días. El desempeño de los medios de cultivo se analizó mediante el crecimiento cualitativo y cuantitativo de *Mycobacterium tuberculosis* (cepa H37Rv). Así mismo se analizó la contaminación, turbidez, pH y viabilidad económica, en comparación con el medio estándar. Los resultados demostraron que el medio mezclado en polvo mantuvo un desempeño comparable al medio convencional, con crecimiento sostenido de *M. tuberculosis* y sin alteraciones significativas a lo largo de 150 días en ambas temperaturas. Por el contrario, el medio liofilizado mostró disminución en el crecimiento, acidificación del pH y cambios físicos, al ser almacenado a 30°C, aunque conservó propiedades aceptables a 4°C. Ambas formulaciones presentaron tasas de contaminación dentro del rango esperado para cultivos MODS, siendo controladas eficazmente con el suplemento antimicrobiano PANTA. En términos de costos, el medio mezclado en polvo fue la opción más económica (S/. 20.50 por vial), seguido por el medio liofilizado (S/. 21.75), en comparación con el medio estándar (S/. 26.75). Este estudio concluye que el medio mezclado en polvo constituye una alternativa técnicamente viable, estable y rentable, ideal para ser implementada en laboratorios periféricos donde se requiere descentralizar

el diagnóstico de TB. Su uso podría reducir barreras logísticas y ampliar el acceso a diagnóstico oportuno en regiones con recursos limitados.

Palabras clave: Tuberculosis, MODS, Medio suplementado, 7H9-OADC, *Mycobacterium tuberculosis*

ABSTRACT

The Microscopic-Observation Drug Susceptibility (MODS) test represents an effective, rapid, and low-cost tool for the diagnosis of tuberculosis (TB) and the detection of drug resistance. However, its large-scale implementation is limited by the complex preparation of the 7H9-OADC-PANTA culture medium. In this context, the present study evaluated the microbiological and functional stability of two ready-to-use dehydrated media formulations: a mixed powder medium and a lyophilized medium, as alternatives to conventional medium. Both media were prepared under controlled conditions and stored at 4°C and 30°C for up to 150 days. Their performance was analyzed by the qualitative and quantitative growth of *Mycobacterium tuberculosis* (strain H37Rv), as well as their contamination, turbidity, pH, and economic viability, compared to the standard medium. The results demonstrated that the mixed powder medium maintained comparable performance to the conventional medium, with sustained growth of *M. tuberculosis* and no significant alterations over 150 days at both temperatures. In contrast, the lyophilized medium showed decreased growth, pH acidification, and physical changes (color and resuspension) when stored at 30°C, although it retained acceptable properties at 4°C. Both formulations presented contamination rates within the expected range for MODS cultures, being effectively controlled with the antimicrobial supplement PANTA. In terms of cost, the mixed powder medium was the most economical option (S/. 20.50 per vial),

followed by the lyophilized medium (S/. 21.75), compared to the standard medium (S/. 26.75). This study concludes that the mixed powder medium constitutes a technically viable, stable, and cost-effective alternative, ideal for implementation in peripheral laboratories where decentralized TB diagnosis is required. Its use could reduce logistical barriers and expand access to timely diagnosis in regions with limited resources.

Keywords: Tuberculosis, MODS, Supplemented medium, 7H9-OADC, *Mycobacterium tuberculosis*

I. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad que afecta a millones de personas en el mundo cada año. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el 2022, el número de nuevas personas diagnosticadas con TB a nivel mundial fue de 7.5 millones. Ese mismo año, alrededor de 410 000 personas desarrollaron TB multidrogo resistente. Además, TB causó la muerte de 1.30 millones de personas a nivel global [1]. Según el Ministerio de Salud y la OMS, en el Perú hay 35 000 a 50 000 casos de tuberculosis al año de los cuales el 10% son casos de tuberculosis multidrogo resistente [2]. Estas cifras evidencian la necesidad de mejorar la detección temprana de casos, incluyendo la identificación de cepas resistentes, para iniciar oportunamente el tratamiento adecuado y controlar la transmisión.

En la última década se han incorporado métodos de diagnóstico molecular que permiten detectar el ADN de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) y mutaciones asociadas a resistencia antimicrobiana de forma rápida [3]. Pruebas como Xpert MTB/RIF y los ensayos de línea genética ofrecen resultados en horas con alta sensibilidad y especificidad, y la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha recomendado su uso para la detección rápida de MDR-TB. Sin embargo, estas técnicas moleculares presentan limitaciones importantes. Su costo e infraestructura requerida dificultan su implementación universal en entornos de bajos recursos [4][5][6]. Además, solo identifican las mutaciones genéticas conocidas incluidas en su panel, por lo que pueden omitir mecanismos de resistencia no habituales. En otras palabras, un resultado molecular negativo en pruebas de resistencia no garantiza sensibilidad absoluta a los fármacos, ya que podrían existir otras mutaciones genéticas no identificadas por el ensayo. Por ejemplo, en el caso de pirazinamida (PZA), se han descrito decenas de mutaciones en el gen *pncA* con impactos variables en la resistencia fenotípica, y no es

factible que un test genético cubra todas las posibles mutaciones relevantes [7][8]. De hecho, las guías enfatizan que las pruebas moleculares no sustituyen al cultivo convencional ni a las pruebas fenotípicas de susceptibilidad; los cultivos siguen siendo necesarios para obtener el perfil completo de resistencia a medicamentos y monitorear el tratamiento [9]. En consecuencia, los métodos de cultivo permanecen como fundamento del diagnóstico de TB y MDR-TB, complementando a las técnicas moleculares cuando estas no logran identificar ciertas mutaciones asociadas a resistencias.

Dentro de los métodos fenotípicos, la prueba de susceptibilidad mediante observación microscópica MODS (*Microscopic-Observation Drug Susceptibility assay*) ha destacado como una alternativa rápida, sensible y de bajo costo para la detección simultánea de TB y resistencia a fármacos [10][11]. La prueba MODS se basa en inocular la muestra de esputo descontaminada en placas con medio líquido Middlebrook 7H9 enriquecido (suplemento OADC: oleato de albúmina, dextrosa y catalasa) y un cóctel antibiótico (PANTA) para inhibir contaminantes. En estas placas de 24 pocillos se observan al microscopio las colonias de *M. tuberculosis* crecidas, que forman estructuras en forma de cordón características (*cording*) de esta especie. Adicionalmente, la prueba incorpora pocillos con antibióticos de primera línea (p. ej. isoniazida e rifampicina) para realizar *in situ* una prueba de susceptibilidad. Una adaptación del método, conocida como MODS-Wayne, permite también evaluar la susceptibilidad a PZA mediante la detección del ácido pirazinóico (POA) producido por las micobacterias en presencia de PZA, evidenciado por un cambio de color al adicionar sulfato ferroso (prueba de Wayne). Gracias a este diseño, el ensayo MODS puede simultáneamente diagnosticar TB y determinar resistencia a isoniazida, rifampicina y PZA(vía MODS-Wayne) en un tiempo considerablemente menor que los

cultivos tradicionales sólidos o en sistemas automatizados [12]. Moore et al. [13] validaron este método en un entorno operativo en Perú, demostrando que un solo cultivo MODS de esputo alcanzó una sensibilidad del 97,8% para detección de TB, superior a la de métodos de referencia como el cultivo automatizado (89,0%) o en medio Löwenstein-Jensen (84,0%). El tiempo medio hasta la positividad de cultivo fue de apenas 7 días para MODS, comparado con 13 días en el sistema líquido automatizado y 26 días en Löwenstein-Jensen. Asimismo, la concordancia en los resultados de susceptibilidad a fármacos entre MODS y los métodos convencionales fue alta (100% para rifampicina, 97% para isoniazida, 99% para MDR en conjunto), confirmando la fiabilidad del MODS para identificar TB sensible o resistente en un solo paso [13]. Este desempeño sobresaliente, junto con su bajo costo, posiciona al MODS como una herramienta valiosa especialmente en países endémicos con recursos limitados.

A pesar de sus ventajas, la implementación del MODS enfrenta desafíos logísticos. La preparación del suplemento OADC y el medio enriquecido requiere insumos especializados y más de 50 horas de procesamiento, lo que ha restringido su uso principalmente a laboratorios de referencia con capacidad técnica adecuada. En el Perú, por ejemplo, el uso de MODS ha estado históricamente centralizado en pocos laboratorios nacionales debido a estas dificultades en la preparación de medios [14].

Para ampliar el acceso a esta técnica, diversos grupos de investigación han explorado medios de cultivo alternativos que simplifiquen o eliminen la compleja preparación del OADC. Siguiendo estas ideas, Rodríguez et al. desarrollaron y probaron dos presentaciones de medio de cultivo deshidratado para MODS: un medio en polvo mezclado (preparado a partir de insumos liofilizados, pero sin esterilizar) y un medio liofilizado estéril [12]. Los resultados iniciales de ese estudio mostraron que estos

medios “secos” eran más fáciles de producir y de menor costo que el medio estándar OADC, manteniendo además un desempeño diagnóstico equivalente.

En este contexto, la presente tesis evaluó la estabilidad y rendimiento de medios de cultivo alternativos deshidratados para la prueba MODS en el diagnóstico de TB. Específicamente, se comparó el desempeño de un medio mezclado en polvo y de un medio liofilizado (ambos formulados como alternativas al medio 7H9-OADC tradicional) en la detección microscópica de *M. tuberculosis*. Se busca determinar si estas formulaciones estables permiten obtener resultados equivalentes al método MODS convencional, con el fin último de facilitar la descentralización del diagnóstico de TB hacia laboratorios de menor nivel en regiones de bajos recursos.

II. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN Y OBJETIVOS

Pregunta de investigación: ¿Durante cuánto tiempo y a qué temperatura pueden almacenarse los medios de cultivo, en formato de mezcla en polvo y liofilizados, sin que se vea comprometida su capacidad para permitir el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* con fines diagnósticos?

Objetivo general:

- Determinar la estabilidad de los medios suplementados listos para ser usados (medio mezclado en polvo y medio liofilizado) que permite el crecimiento de óptimo de *Mycobacterium tuberculosis* en aplicaciones diagnósticas a determinadas temperaturas y tiempo de almacenamiento.

Objetivos específicos:

- Comparar el porcentaje de crecimiento de *M. tuberculosis* en medios almacenados a diferentes tiempos de almacenamiento y a diferentes temperaturas con el medio control
- Comparar el número de microcolonias de *M. tuberculosis* en medios almacenados a diferentes tiempos de almacenamiento y a diferentes temperaturas con el medio control
- Evaluar la contaminación de los medios en cada condición y tiempo de almacenamiento
- Comparar la turbidez de los medios almacenados en diferentes tiempos de almacenamiento a diferentes temperaturas con el medio control
- Comparar el pH de los medios almacenados en diferentes tiempos de almacenamiento a diferentes temperaturas con el medio control

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Variantes de preparación del medio 7H9-OADC

3.1.1. **Medio mezclado en polvo:** El medio mezclado en polvo fue preparado mezclando los componentes secos del medio 7H9-OADC [17]. Las cantidades para un vial de 25 mL fueron las siguientes: 0.148 g de medio Middlebrook 7H9 (BD), 0.031 g de Bacto™ casitona, (BD), 0.021 g de NaCl (MERCK), 0.125 g de albúmina de suero bovino y 0.05 g de D-Glucosa. El glicerol, componente líquido, fue agregado al momento del cultivo de la cepa. Antes de su uso, el medio fue resuspendido con 24.610 mL de agua esterilizada y 390 uL de glicerol estéril al 20%. El medio convencional contiene catalasa, la cual permite un mayor crecimiento de la bacteria. Sin embargo, cuando se realizó la prueba con muestras de esputo, 31% de las muestras mostraron contaminación [12]. Por lo tanto, el medio mezclado fue

preparado sin catalasa. No requiere ningún proceso de autoclavado. En los ensayos, se transfirió 14 mL de medio a tubos de 15 mL al que se añadió 280 uL de PANTA.

- 3.1.2. **Medio liofilizado:** El medio liofilizado, fue preparado como el medio 7H9-OADC convencional, el cual incluye 10% de OADC. El OADC fue preparado en el laboratorio mezclando 0.3 mL de ácido oleico (Sigma), 25 g de albumina de suero bovino (Becton Dickinson), 10 g de D-glucosa (Becton Dickinson), 0,015 g de catalasa y 4,25 g de cloruro de sodio (Merck), todo resuspendido con agua destilada estéril hasta llegar a un volumen final de 500 mL, todo esterilizado por filtración con membranas primero de 0,45 µm, seguido de una filtración con una membrana de 0,22 µm. El OADC se distribuyó en alícuotas de 50 mL y se incubaron a 37°C durante 24 horas como control de esterilidad y finalmente se almacenaron a 4°C.

La preparación del medio liofilizado para un volumen final de 500 mL fue la siguiente: 2.95g de medio 7H9 Middlebrook (BD), 1.55ml de glicerol (J.T BAKER), 0.625g de Bacto™ casitona (BD); sin embargo, se reconstituyó el medio con 225 mL de agua destilada para minimizar el volumen para la liofilización. El medio fue homogeneizado y autoclavado; 50 ml de OADC fueron agregados al medio frío. El medio, luego, fue liofilizado [18]. Para esto, 13.75 ml del medio fue alícuotado en viales de 25 ml. Luego, los viales fueron congelados a -70°C durante 24 horas. Posteriormente, el medio fue liofilizado en un liofilizador

(Labconco, modelo LYPH.LOCK 12) a una temperatura de -46°C y una presión entre 50 - 70 (10)- 3 MBAR. El medio liofilizado fue resuspendido con 25 mL de agua destilada autoclavada. Previo al ensayo, se transfirió 14 mL de medio a tubos de 15 mL al que se añadió 280 uL de PANTA.

3.1.3. **PANTA:** es un suplemento antimicrobiano utilizado para minimizar la contaminación en cultivos MODS. Según la guía MODS [17], se agrega 20 uL de PANTA por cada mL de medio; por lo tanto, por tubo corresponde a 280 uL de PANTA.

3.2. **Diseño del estudio**

En este estudio, se evaluó la estabilidad de 2 variantes de preparación: medio liofilizado y medio mezclado en polvo (Figura 1). En el presente estudio de estabilidad, se evaluaron dos temperaturas de acuerdo con la “Norma técnica de salud que regula los estudios de estabilidad de las especialidades farmacéuticas” del MINSA/DIGEMID [15]. Para productos almacenados a temperatura ambiente, se utilizó la temperatura de las zonas climáticas de tipo IV, las cuales son las más exigentes y permiten unificar los estudios de estabilidad [16]. Estas zonas climáticas de tipo IV presentan temperaturas mínimas de $30\text{ C}^\circ \pm 2\text{ C}^\circ$ / $65\% \pm 5\%$ humedad relativa (HR), conforme a la clasificación de la OMS. Por lo tanto, estos medios alternativos fueron almacenados a dos temperaturas: refrigerado (4°C) y a temperatura ambiente (30°C) [15], por diferentes periodos de tiempo. Los tiempos de almacenamiento que fueron evaluados fueron el tiempo 0; es decir, los medios recién preparados completamente, 3 días, 7 días, 15 días, 21 días, 30 días. A

partir del primer mes se evalúan los medios cada mes por 4 meses más. Posteriormente, un cóctel de antibióticos llamado PANTA se agrega a los medios luego de ser resuspendidos. La estabilidad fue evaluada a través del porcentaje de crecimiento, conteo de microcolonias, contaminación, el pH y la turbidez. Todos los resultados fueron comparados con el control, el cual es el medio 7H9-OADC usado en la prueba MODS convencional.

Cada medio evaluado según la temperatura y el tiempo de almacenamiento fue evaluado a partir de 3 lotes. Un lote corresponde a 1 vial (25 mL) del medio evaluado almacenado en determinadas condiciones, donde cada vial permitió 2 repeticiones en la placa MODS por dilución de cepa.

Un lote de medio mezclado en polvo es considerado la preparación de la mezcla en una fecha determinada. Un lote de medio liofilizado es considerado un ciclo de liofilización.

3.3. **Muestra biológica**

La cepa H37Rv de *M. tuberculosis* ATCC 27294 del Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular- LID de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH) fue descongelada y sembrada en medio sólido 7H10-OADC . La cepa fue transferida a 10 ml del medio líquido 7H9-OADC y ajustada a concentración de 3×10^8 UFC/mL de acuerdo a la escala 1 de MacFarland. La cepa fue almacenada a 4°C en un tubo sellado para ser usado en un periodo no mayor a 15 días [17].

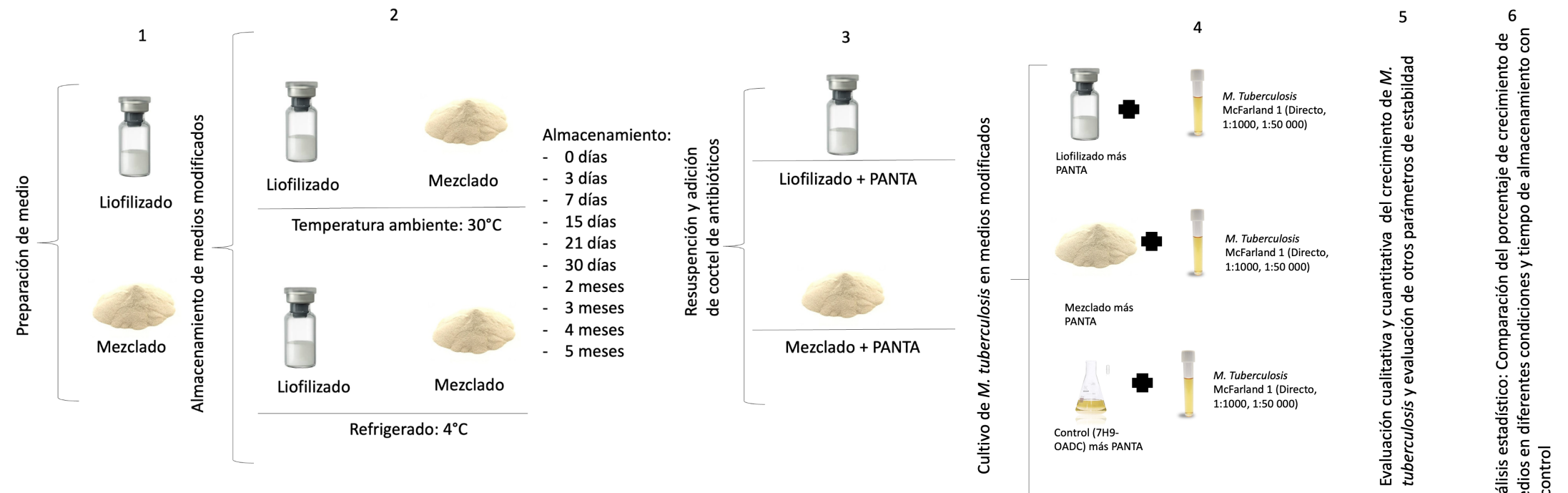


Figura 1. Flujograma de actividades. 1. Preparación de medios de cultivo suplementados listos para ser usados: medio liofilizado y medio mezclado en polvo 2. Condiciones y tiempo de almacenamiento de los medios modificados. Los medios son almacenados a 30°C y 4°C por distintos periodos de tiempo. 3. Resuspensión con agua destilada y adición del coctel de antibióticos PANTA a los medios modificados. 4. Cultivo de *M. tuberculosis* en los medios alternativos 5. Evaluación cualitativa (porcentaje de crecimiento) y cuantitativa (conteo de microcolonias) del crecimiento de *M. tuberculosis* en los medios y evaluación de otros parámetros de estabilidad (pH, turbidez y contaminación) 6. Análisis estadísticos comparativos para el crecimiento de *M. tuberculosis* entre los medios a diferentes temperaturas y tiempo de almacenamiento y el medio 7H9-OADC convencional (control).

3.4. **Determinación del crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* en los dos variantes de preparación**

Para poder determinar el crecimiento de la cepa en los medios alternativos de manera cualitativa y cuantitativa, las muestras fueron distribuidas en la placa MODS según la Figura 2. La cepa de *M. tuberculosis* llevada a una escala de McFarland 1 fue sembrada de manera directa, en una dilución de 1:1000 y en una dilución de 1:50000 (Figura 2). Luego de determinado tiempo de almacenamiento, los 2 viales de un lote de medio almacenado a determinada temperatura fueron resuspendidos por cada periodo de tiempo evaluado. En la primera fila de la placa de 24 pozos (Figura 2), se sembró directamente la cepa en el medio suplementado. En la segunda fila, se sembró la cepa diluida en 1:1000, la cual fue utilizada para determinar el porcentaje de crecimiento. En la tercera fila, se sembró la cepa diluida en 1:50000, la cual sirvió para el conteo de microcolonias. Finalmente, las 2 últimas columnas correspondieron al control; es decir, el medio convencional, en el cual fueron sembradas las cepas según la dilución que indica en la figura 2, también por duplicado. La placa fue cubierta con una tapa de silicona y se incubó a 37 °C (Thermo Scientific™ 3311) durante un máximo de 21 días.

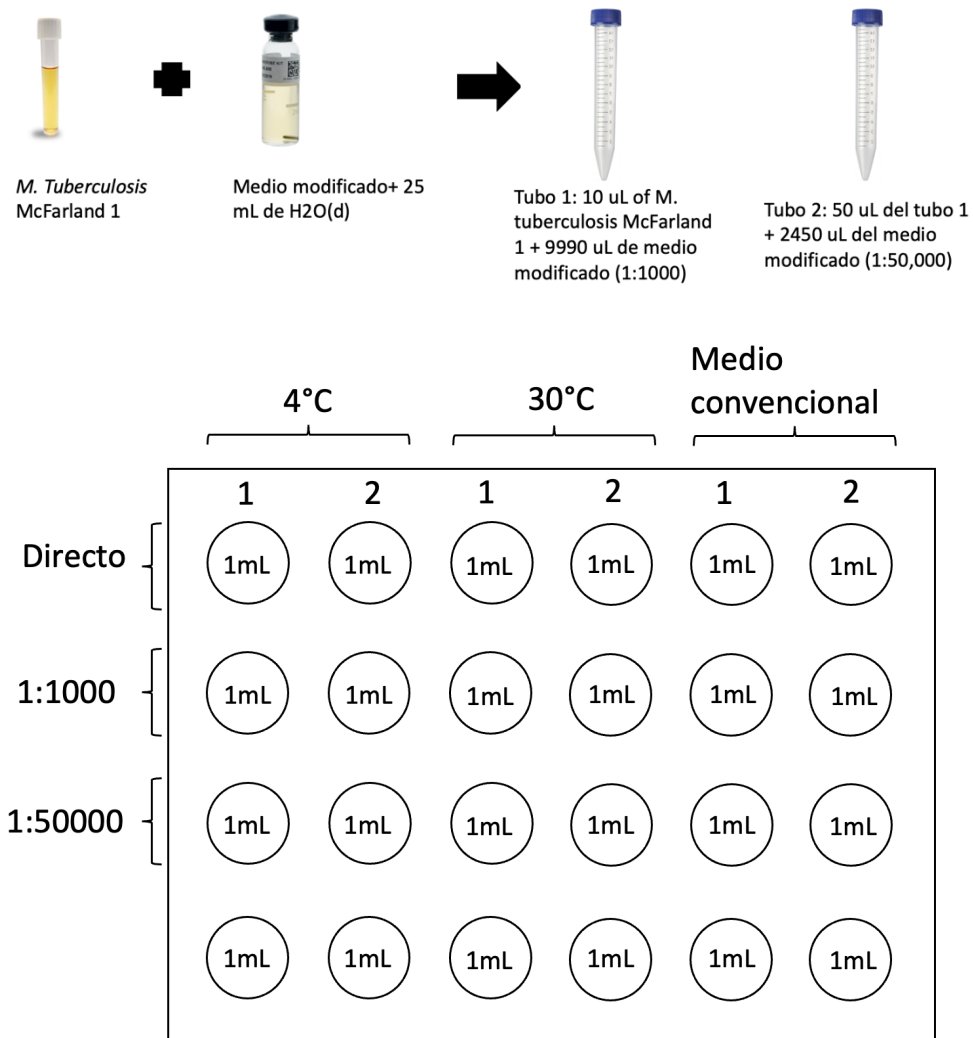


Figura 2. Distribución de siembra de *M. tuberculosis* en diferentes diluciones en medios alternativos almacenados en diferentes temperaturas y tiempo de almacenamiento. Siembra de *M. tuberculosis* en medio alternativo almacenado en dos temperaturas diferentes y por un tiempo determinado. Cada lote corresponde a 1 vial (25mL), el cual permite hacer dos diluciones de la cepa: 1:1000 y 1:50 000 por duplicado.

3.5. Determinación cualitativa del crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* en los medios alternativos:

La determinación cualitativa del crecimiento de la cepa se realizó a través de una serie de escalas que indicaba cuanto porcentaje del pozo abarcaba el crecimiento de la cepa. El porcentaje de crecimiento fue determinado en el día 9 [18] de incubación a través del microscopio invertido con un aumento de 40X. Se realizaron escalas del 1 al 4. En donde 1 representa el crecimiento que abarca el 0 al 25% del pozo; 2 representa el crecimiento que abarca desde el 26 al 50% del pozo; 3 representa el crecimiento que abarca desde el 51 al 75% del pozo. Finalmente, 4 representa el crecimiento que abarca desde el 76 al 100% del pozo [12].

3.6. Determinación cuantitativa del crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* en los medios alternativos:

La determinación cuantitativa del crecimiento de la cepa se realizó a través de un conteo de microcolonias de MTB. Esto fue determinado mediante el conteo de las microcolonias el día 9 en la dilución 1:50000 a través del microscopio invertido con un aumento de 100X.

3.7. Evaluación de contaminación de medios alternativos

La contaminación del medio alternativo por bacterias u hongos fue evaluada utilizando la microscopía de luz invertida. Luego de 24 horas después de la siembra, se observó si había crecimiento de otras bacterias

u hongos en los pozos. Lo mismo se realizó a los 9 días de la siembra, en el día de lectura. El medio fue considerado contaminado cuando hubo un crecimiento rápido de bacterias que no tenían forma de cordones o cuando se observó nubosidad [13].

3.8. **Evaluación de turbidez en medios alternativos**

La turbidez de los medios fue evaluada luego de ser resuspendidos con agua destilada. Se determina la turbidez a través de una medición visual y se utiliza la siguiente escala: 0 (turbidez nula), 1 (turbidez ligera), 2 (turbidez intensa) [19].

3.9. **Evaluación de cambio de pH en medios alternativos**

Los medios alternativos fueron resuspendidos luego del tiempo de almacenamiento determinado y se alicuotó 10 mL aproximadamente para medir el pH utilizando un pHmetro antes de agregar el PANTA. La medición del pH del control se realizó al momento de la preparación del medio control.

3.10. **Análisis estadístico**

Cada medio evaluado según la temperatura y el tiempo de almacenamiento fue evaluado a partir de 3 lotes. Un lote corresponde a 1 vial (25 mL) del medio evaluado almacenado en determinadas condiciones, donde cada vial permitió 2 repeticiones en la placa MODS por dilución de cepa. Primero, se determinó la normalidad de los datos del porcentaje de crecimiento, el número de microcolonias, el valor del pH y la turbidez, esto se hizo a través de la prueba de Shapiro-Wilk

($p > 0.05$) dando como resultado una no normalidad por lo cual los datos fueron tratados con pruebas no paramétricas. El porcentaje de crecimiento (variable cualitativa), el número de microcolonias (variable cuantitativa), el valor del pH (variable cuantitativa) y la mediana de la turbidez (variable cualitativa) de los medios de cultivo fueron comparados con los valores del control con la prueba suma de rangos de Wilcoxon. Los análisis se realizaron utilizando RStudio (4.3.1).

IV. RESULTADOS

4.1. **Determinación cualitativa del crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* en los medios alternativos:**

Primero, se calculó la mediana del porcentaje de crecimiento, debido a que es una variable ordinal. En la Figura 3, se puede observar que el porcentaje de crecimiento del medio control se mantiene a lo largo del tiempo en una escala 3; excepto a los 3 y 14 días de almacenamiento. Esto se debe a que el crecimiento de la cepa utilizada para evaluar el crecimiento luego de dichos periodos de tiempo presentó un crecimiento menor al usual, por lo que la mediana disminuyó.

Respecto al medio liofilizado, se observa que comienza con un porcentaje de crecimiento de 3 cuando fue almacenado a los 4°C al igual que el control; sin embargo, este se mantiene en su mayoría con un porcentaje de crecimiento en la escala 2 hasta los 150 días de almacenamiento. Por otro lado, el medio liofilizado guardado a 30°C, comienza un porcentaje de crecimiento de 2, el cual disminuye a 1 a

partir de los 21 días de almacenamiento y esto se mantiene hasta los 150 días de almacenamiento.

El medio mezclado en polvo almacenado a 4°C mantiene un porcentaje de crecimiento de 3 a lo largo de los 150 días; sin embargo en los días 3 y 14 hay una disminución del porcentaje de crecimiento a 1 y 2 respectivamente. Esto podría deberse a la cepa utilizada en esos días, como se mencionó anteriormente. El medio mezclado en polvo almacenado a 30°C presentó un porcentaje de crecimiento de 3 en la mayoría del tiempo de almacenamiento; sin embargo, a los 5 meses, el porcentaje cae a 2.

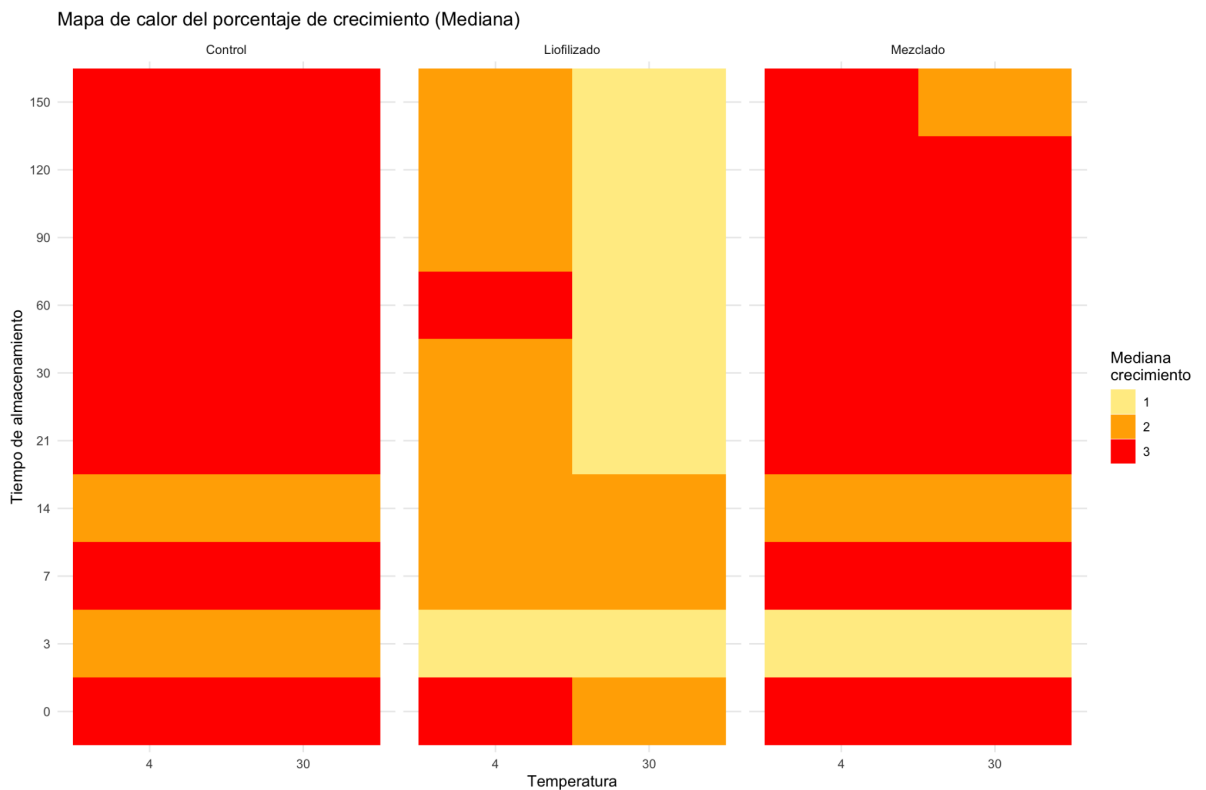


Figura 3. Mediana del porcentaje de crecimiento según el tipo de medio, temperatura y tiempo de almacenamiento. 1: 0-25% de crecimiento de un pozo; 2:

26-50% de crecimiento de un pozo; 3: 51-75% de crecimiento de un pozo; 4: 76-100% de crecimiento de un pozo.

4.2. **Determinación cuantitativa del crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* en los medios modificados:**

El crecimiento de microcolonias fue similar en el medio mezclado y el control en ambas temperaturas de almacenamiento (Tabla 1). Solo el medio mezclado en polvo almacenado a 4°C por 150 días presentó una ligera diferencia de número de microcolonias con el control. Por otro lado, el medio liofilizado presentó una mayor diferencia respecto al crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*. El medio liofilizado almacenado a 4°C durante 30 días y 90 días presentó diferencias significativas respecto al control. Por otro lado, el medio liofilizado almacenado a 30°C presenta un número de microcolonias menor estadísticamente significativo desde los 7 días de almacenamiento en adelante, excepto a los 14 días. Sin embargo, en este tiempo de almacenamiento, el valor de p es cercano a 0.05.

Tabla 1

Comparación del número de microcolonias entre tipo de medio y temperatura con el control por cada tiempo de almacenamiento

Tiempo de almacenamiento	Mezclado		Liofilizado	
	4°C	30°C	4°C	30°C
0	0.808	0.7466	0.1712	0.0887
3	0.645	0.2265	0.9357	0.3751
7	0.330	0.4217	0.1481	0.0049*
14	0.196	0.9143	0.2946	0.0619
21	1	0.3341	0.1714	0.005*
30	0.240	0.132	0.0095*	0.0022*
60	0.179	0.0921	0.1488	0.0043*
90	0.335	0.229	0.045*	0.0049*
120	0.818	0.2615	0.2403	0.005*
150	0.037*	0.1488	0.0776	0.0022*

Los valores que se muestran en la tabla son los *p-value* de la diferencia del medio almacenado a determinada temperatura por determinado tiempo con el control acorde a la prueba de rangos de Wilcoxon. Nota: Los valores **sombreados y con *** comprenden a valores con un $p < 0.05$

En la Figura 4, se puede observar que, a una temperatura de 4°, el número de microcolonias de H37Rv en el medio mezclado en polvo presenta una media ligeramente más baja que la del control. Sin embargo, no presenta una diferencia significativa hasta los 150 días de almacenamiento.

Por otro lado, a una temperatura de almacenamiento de 30°C, se observa que el medio mezclado en polvo presenta un número de microcolonias

ligeramente menor al control a lo largo del tiempo. Sin embargo, estas diferencias no son significativas, por lo que estaría manteniendo las propiedades que permiten el crecimiento a lo largo del tiempo.

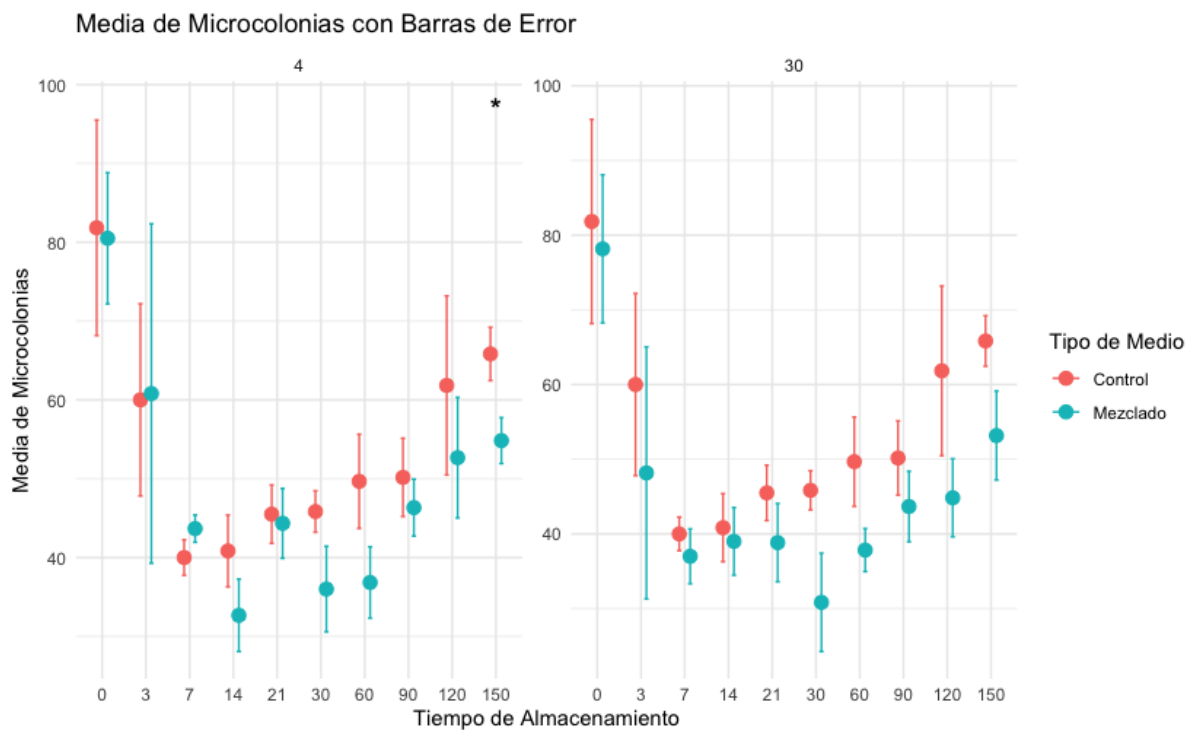


Figura 4. Número medio de microcolonias del medio mezclado y control según temperatura y tiempo de almacenamiento. El recuento de microcolonias se realizó a través de un microscopio de luz invertida. Los puntos representan la media del número de microcolonias y las barras indican la dispersión de los datos alrededor de la media.

* $p < 0.05$

Por otro lado, en la Figura 5, el medio liofilizado presenta una ligera disminución del número de colonias comparado con el control. Esto se

puede observar a lo largo de todo el tiempo de almacenamiento. Sin embargo, a pesar de que el crecimiento es menor, aún se puede observar un buen crecimiento de microcolonias en este tipo de medio listo para ser usado. Solo se observaron diferencias significativas en los valores luego de 30 y 90 días de almacenamiento; sin embargo, a los 150 días no se observaron estas diferencias.

Esta diferencia de medias se ve aún más marcada entre el medio liofilizado almacenado a 30°C y el control. Se observa una marcada disminución significativa del número de microcolonias a partir de 7 días de almacenamiento, además de un cambio de color a un marrón intenso (ver Anexo 1). En el día 14, no se muestran diferencias significativas. Esto se debe a datos perdidos debido a la contaminación.

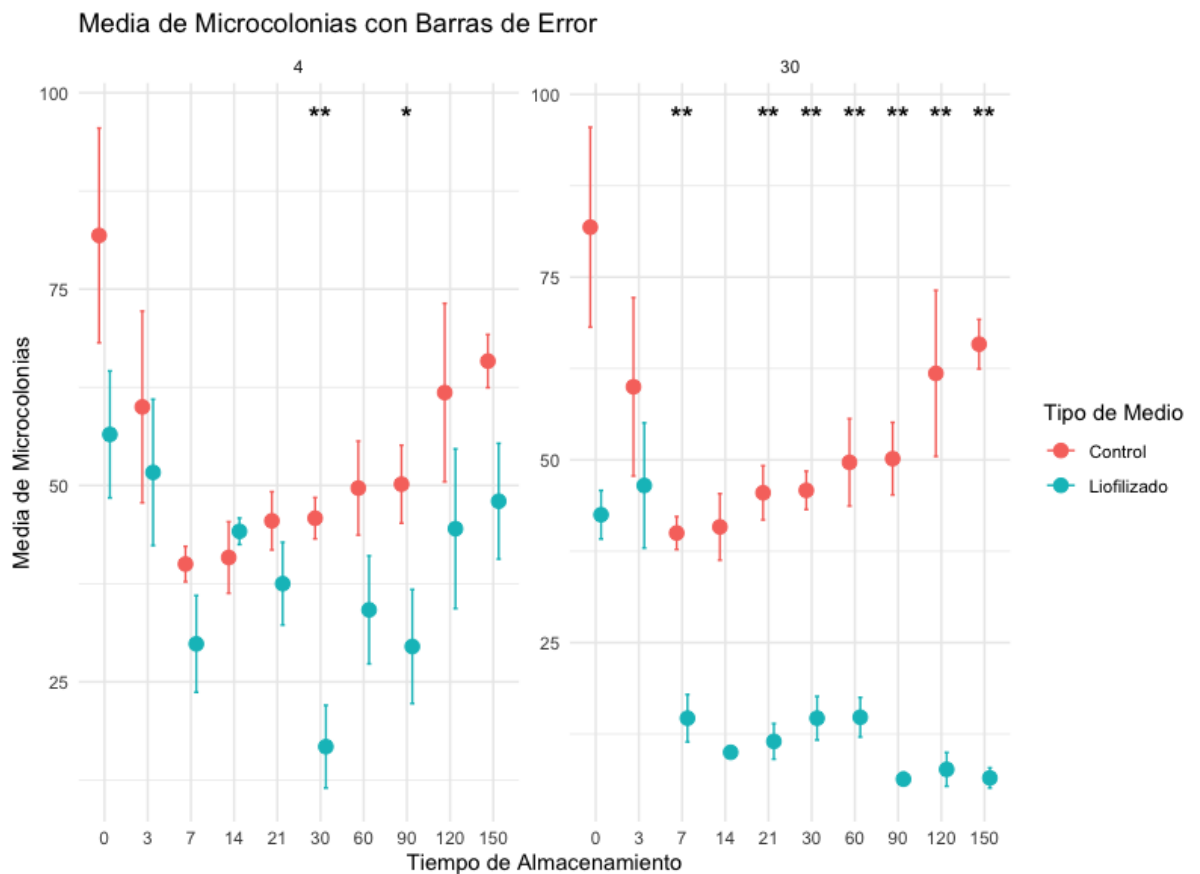


Figura 5. Media de número de microcolonias del medio mezclado y control según temperatura y tiempo de almacenamiento. El recuento de microcolonias se realizó a través de un microscopio de luz invertida. Los puntos representan la media del número de microcolonias y las barras indican la dispersión de los datos alrededor de la media.
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

4.3. Evaluación de contaminación de medios modificados:

Como se mencionó anteriormente, el medio mezclado en polvo se preparó mezclando los componentes secos del medio convencional, sin pasar por procesos de esterilización. Debido a esto, cuando se sembró 80 uL de medio en agar LB y agar papa-dextrosa, se observó que el medio mezclado presentó contaminación bacteriana y fúngica (ver Anexos 2).

A pesar de no haber pasado por ningún proceso de esterilización, luego del uso de PANTA, el medio mezclado en polvo presentó contaminación bacterias y por hongos en los pozos (ver Anexos 4) en 4 de los 60 viales preparados para este medio.

La contaminación se determinó luego de resuspender el medio y añadir PANTA, se observaron los pozos luego de 24 horas de la siembra y en el día de lectura (9 días) (Tabla 2). La contaminación por hongos en el medio mezclado en polvo se dio en dos viales de lotes distintos, ambos guardados a 30°C por 14 días y en un vial almacenado por 120 días. La contaminación por bacterias se dio en un vial almacenado por 3 días a 4°C.

Respecto al medio liofilizado, 3 viales presentaron contaminación por hongos. Uno de ellos pertenecía al primer lote y estuvo almacenado a 4°C por 21 días. Lo más probable es que la contaminación se haya producido por el material utilizado o al momento de la siembra. Los otros dos viales pertenecían al primer y tercer lote y estuvieron almacenados por 14 días a 30°C.

La contaminación por bacterias se dio en un vial almacenado por 30 días a 4°C. La contaminación probablemente ocurrió en el momento de la siembra.

Tabla 2***Contaminación de muestras***

Tiempo de almacenamiento	Mezclado		Liofilizado	
	4°C	30°C	4°C	30°C
0	-	-	-	-
3	CB(1)*	-	-	-
7	-	-	-	-
14	-	CH(2)*	-	CH(2)*
21	-	-	CH(1)*	-
30	-	-	CB(1)*	-
60	-	-	-	-
90	-	-	-	-
120	-	CH(1)*	-	-
150	-	-	-	-

Nota: CH: contaminación por hongos, CB: contaminación por bacterias.

*Entre paréntesis se indica el número de viales que presentaron contaminación de acuerdo a cada condición

4.4. **Evaluación de turbidez en medios modificados**

Ninguno de los medios listos para ser usados presentó algún tipo de turbidez al momento de ser resuspendidos. Sin embargo, el medio liofilizado guardado a 30°C presentó un cambio en su aspecto, presentó un cambio de color a un color marrón; sin embargo, no presenta turbidez (Ver Anexo 1). Esto sucede a partir de los 14 días de almacenamiento a esa temperatura. Además, se observó que, luego de más de un mes de almacenamiento, este mismo medio no se resuspende correctamente, por lo que quedan restos del medio liofilizado en el vial.

4.5. **Evaluación de cambio de pH en medios modificados**

Respecto al pH, a 4°C se observa que no hay un cambio notable en el valor del pH tanto para el medio liofilizado y como el mezclado en polvo (Figura 6). Los valores de pH se mantienen entre 6.45 a 7. No obstante, almacenados a 30°C, se observa un decaimiento del pH del medio liofilizado, el cual incrementa a los 30 días de almacenamiento. A los 150 días, se observa que presenta un pH más ácido menor a 6.

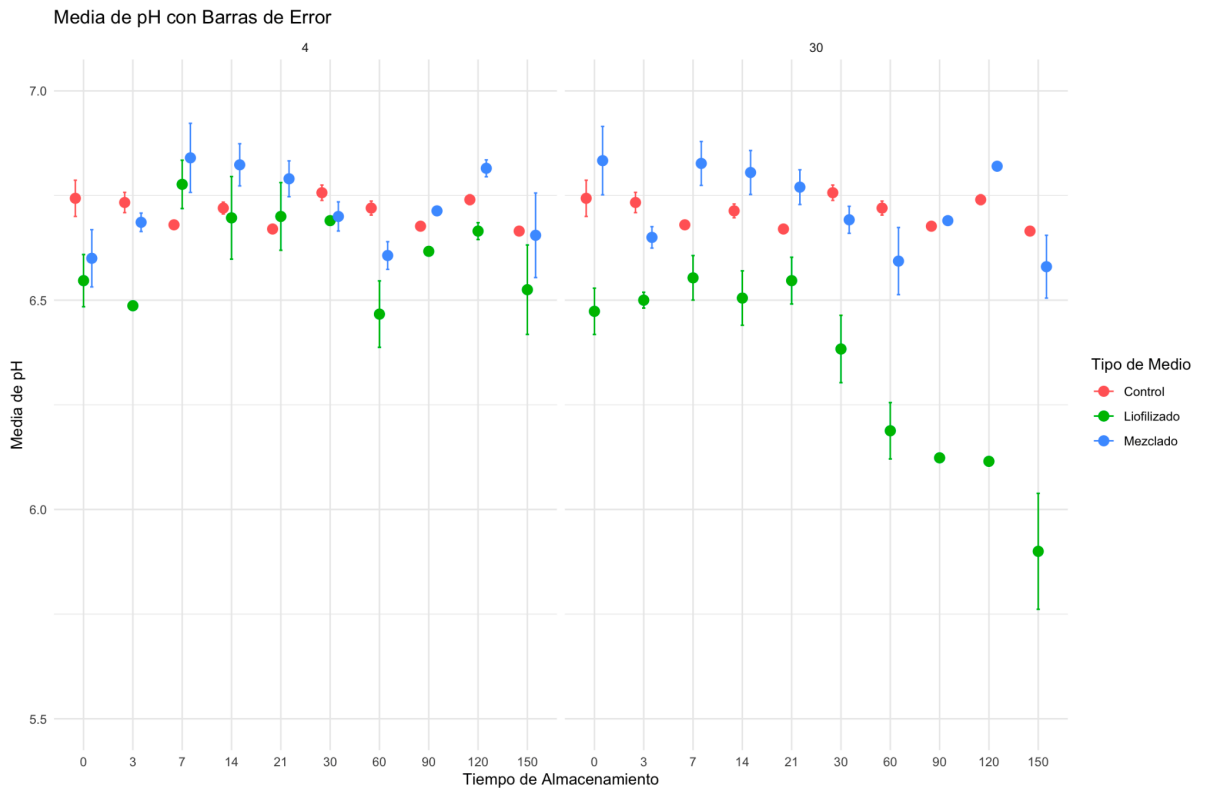


Figura 6. Media de pH según el tipo de medio, temperatura y tiempo de almacenamiento.

4.6. Análisis de costos

Se realizó un análisis de costo unitario para un vial de 25 mL (Ver Tabla 3). El medio mezclado en polvo fue la presentación con menor costo unitario de los 3 medios analizados con un valor de S/. 20.50 por vial. Luego, sigue el medio liofilizado con un costo ligeramente mayor de S/. 21.75. Finalmente, el medio convencional, en el cual se utilizó OADC comercial, presenta un precio de S/. 26.76 por vial.

Tabla 3

Comparación de precios unitarios entre el medio convencional, medio mezclado en polvo y medio liofilizado.

Componentes	Medio con OADC comercial	Precio x 1 unidad	Medio mezclado	Precio x 1 unidad	Medio liofilizado	Precio x 1 unidad
Medio Middlebrook (BD) 500g	219.27	0.07	219.27	0.07	219.27	0.07
Bacto TM casitona 500g	1656.72	0.1	1656.72	0.1	1656.72	0.1
NaCl 500 g			240	0.01	240	0.01
Bovine Serum Albumin heat shock fraction, pH 7, ≥98% X 500G			7331.00	1.83	7331.00	1.83
	652.34	8.15				
D-(+)-Glucose, ≥99.5% X 1KG			250.00	0.01	250.00	0.01
Catalase from bovine liver X 10G			0	0	1552.00	0.12
Oleic acid ≥99% x 25g			0	0	2099.00	1.125
PANTA (18 ml)	783.04	18.43	783.04	18.43	783.04	18.43
Glicerol (al 20%) 1L	154	0.01	154	0.06	154	0.06

Total S/.	3465.37	26.76	10634.03	20.50	14285.03	21.75
-----------	---------	-------	----------	-------	----------	-------

V. DISCUSIÓN

Un aporte trascendental de desarrollar medios MODS estables y listos para usar es la descentralización del diagnóstico de TB en países con recursos limitados. Hasta ahora, la necesidad de contar con personal altamente capacitado y equipamiento para preparar el medio OADC ha confinado el uso rutinario de MODS a laboratorios de referencia centralizados. Esto implica que muchas regiones endémicas deben enviar sus muestras a ciudades principales y aguardar varios días para obtener resultados, con el consiguiente retraso en el inicio del tratamiento y riesgo de pérdidas de seguimiento del paciente. La introducción de medios deshidratados, tanto en polvo como liofilizados, puede cambiar este panorama. Al disponer de un kit de medio MODS pre-formulado que solo requiere adición de agua estéril y suplementos mínimos, incluso laboratorios de nivel intermedio o periférico podrían implementar la prueba sin depender de una infraestructura compleja. Nuestros resultados confirman que los medios de cultivo deshidratados evaluados (mezclado en polvo y liofilizado) pueden reemplazar eficazmente al medio tradicional 7H9-OADC-PANTA en la prueba MODS, sin detrimento en la sensibilidad o rapidez del diagnóstico.

Desde el punto de vista técnico, la evaluación sugiere que las formulaciones de medio mezclado en polvo y liofilizado ofrecen ventajas operativas notables. El medio mezclado en polvo se prepara rápidamente mezclando el sustrato deshidratado con agua destilada y agentes suplementarios, eliminando pasos engorrosos como la preparación individual de cada componente (por ejemplo,

no se requiere elaborar albúmina concentrada ni soluciones de dextrosa por separado, ya que todo viene pre-mezclado). En nuestra experiencia, esto reduce el tiempo de preparación a unos minutos, comparado con las ~53 horas necesarias para producir el suplemento OADC tradicional. Si bien el polvo no está estéril, la adición del cóctel PANTA (Polimixina, Anfotericina B, Nalidíxico, Trimetoprim, Azlocilina) controla eficazmente el sobrecrecimiento de contaminantes, como se evidenció en que las tasas de contaminación bacteriana fueron bajas y comparables al medio convencional en este estudio. Este suplemento antimicrobiano utilizado para disminuir la contaminación en la prueba MODS, también es utilizado en medios Lowenstein-Jensen, en donde la tasa de contaminación utilizando este suplemento pasó de 31 al 5% [20]. Más aún, Rodríguez et al. reportaron que el medio mezclado suplementado con PANTA (denominado PM_P) presentaba un desempeño muy similar al medio estándar en términos de tiempo a la positividad y sensibilidad de detección, con la ventaja de ser el de preparación más sencilla al no requerir ningún proceso de esterilización antes de su uso [12]. Este resultado coincide con nuestra experiencia, ya que el medio mezclado probado puede reconstituirse rápidamente y utilizarse de inmediato en la inoculación, simplificando el flujo de trabajo en el laboratorio.

Asimismo, en trabajos anteriores [12][18], se demostró que el tiempo de detección utilizando ambos medios deshidratados evaluados fue de aproximadamente 6 días (± 5 días de desviación) para muestras de esputo. Este rango de rapidez es similar a lo esperado para MODS con un promedio de 7 a 10 días de detección. Esto sugiere que la capacidad de crecimiento de *M. tuberculosis* no se vio afectada por la reformulación del sustrato. Esto coincide

con nuestro estudio, ya que el medio mezclado en polvo mostró la capacidad de mantener el crecimiento de *M. tuberculosis* a lo largo de 150 días manteniendo un tiempo de detección similar al de Rodríguez et al. [12]. Los medios deshidratados utilizados en este estudio hicieron posible la detección de cordones de TB con facilidad a los 9 días de lectura, lo cual se encuentra en el rango esperado. Esto permite comenzar de manera oportuna el tratamiento a las personas afectadas.

El medio mezclado en polvo demostró que puede ser utilizado por largos periodos de tiempo de almacenamiento tanto en refrigeración como a temperatura ambiente. No hubo diferencias significativas en el número de microcolonias entre el medio mezclado guardado a 4°C y el control a lo largo de 120 días de almacenamiento. A 30°C, el medio mezclado en polvo mantuvo su capacidad de crecimiento por 150 días, por lo que se sugiere estudios bajo periodos de tiempo más largos. Trabajos anteriores también resaltaron la eficiencia del medio mezclado en polvo [18]; sin embargo, esta se determinó con un tiempo de almacenamiento del medio mezclado menor a 24 horas. No obstante, respecto al porcentaje de crecimiento, medio mezclado almacenado a 30°C mostró una tendencia similar al control; sin embargo, este porcentaje disminuye a los 150 días. Esto podría deberse a que los componentes de los medios de cultivo se van deteriorando a medida que el tiempo de almacenamiento es mayor. Además, deben estar almacenados a una temperatura adecuada según el fabricante [21]. Los componentes del medio mezclado como el medio Middlebrook 7H9, la casitona, NaCl y D-glucosa deben ser almacenados a menos de 30°C según sus fabricantes [22][23][24]. Además, la

albúmina debe almacenarse en refrigeración para que no se desnaturalice [25]. Por lo tanto, la temperatura de almacenamiento a 30°C podría haber degradado alguno de estos componentes, lo cual produjo un porcentaje de crecimiento menor de las colonias luego de 150 días.

El medio mezclado presentó contaminación en 6.6% (4/60) de los viales preparados observados en la placa de 24 pozos. Lo más probable es que esta contaminación haya ocurrido al momento de la siembra o por un mal lavado de los tubos de vidrio en donde se realizaron las diluciones. Se podría pensar que la contaminación fue producto del tiempo de almacenamiento; sin embargo, los medios mezclados almacenados por 150 días no mostraron contaminación en los pozos luego de ser resuspendidos y añadir PANTA. En el trabajo de Rodríguez [18], no se observó contaminación de los medios mezclados con PANTA, por lo que concluyó que ninguna fuente de contaminación microbiana estaba presente en estos medios mezclados. Independientemente de cómo se pudo haber dado la contaminación en estos medios, el medio mezclado con PANTA presentó una contaminación dentro del rango de contaminación del MODS convencional (0.4-11.2%), además de otros medios sólidos (1-22%) y estuvo muy cercano al rango otros medios líquidos comúnmente utilizados para detección de tuberculosis (0.9 -6.3%) [11]. Por lo tanto, el medio mezclado con PANTA sigue siendo una buena opción para reemplazar el medio convencional en la prueba MODS. Hace falta observar algún tipo de contaminación según el tiempo de almacenamiento utilizando muestras de esputo, para determinar si los componentes del medio mezclado favorecen la proliferación de otros microorganismos. Rodríguez [12], observó que el 13.5% de los ensayos con muestras de esputo en medio mezclado presentó contaminación, en

comparación con el 8.2% de ensayos contaminados utilizando el medio convencional.

Por su parte, medio liofilizado ofrece la ventaja de venir esterilizado de fábrica y con una estabilidad prolongada. La liofilización (freeze-drying) remueve la humedad del medio bajo vacío y baja temperatura, permitiendo que los componentes se conserven activos por largos periodos a temperatura ambiente. Esto facilita su almacenamiento y distribución: los viales liofilizados pueden transportarse sin requerir cadena de frío, a diferencia del OADC líquido que requiere refrigeración. Además, al estar estéril y sellado herméticamente, el medio liofilizado minimiza el riesgo de contaminación durante el manejo, incrementando la confiabilidad del ensayo en entornos con infraestructura básica. En el caso del medio liofilizado utilizado en el estudio, este pasa por el proceso de autoclavado antes de pasar a la máquina liofilizadora. Al momento de pasar el medio a la máquina, el ambiente es desinfectado y se somete a luz UV-C por 15 minutos. Esto para tratar de asegurar la menor contaminación posible. No obstante, al igual que el mezclado, el medio liofilizado presentó 4 viales contaminados de los 60 viales utilizados (6.6%). En el trabajo de Rodriguez [12], se observó un porcentaje de contaminación del medio liofilizado con PANTA de 8.9% utilizando muestras de esputo. Esta contaminación vista en los pocillos podría haberse dado en el momento de la siembra, ya que en el trabajo de Cauti [26] no se encontró contaminación en el medio liofilizado trabajado en un ambiente descontaminado con radiación UV-C cuando se sembró al momento en placas de agar LB y Sabouraud. De la misma manera, cuando se realizó la siembra de 80 uL de medio liofilizado resuspendido el mismo día de preparación de lote no se encontró contaminación

bacteriana ni contaminación fúngica en ambas temperaturas. Sin embargo, se dejó las placas de agar papa-dextrosa por 5 días más y se evidenció contaminación fúngica para ambas temperaturas (ver Anexo 3). A pesar de esto, el uso de PANTA evitó el crecimiento de hongos en casi la totalidad de viales; excepto 4, los cuales podrían haber sido contaminados en el momento de la siembra. Esto evidencia la importancia de utilizar este conjunto de antibióticos, a pesar de la disminución del crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* en medios liofilizados con PANTA [18].

En el medio liofilizado, hubo un crecimiento de microcolonias menor que el control tanto para los medios almacenados a 4°C como a 30°C. Ambos presentaron diferencias significativas; sin embargo, la diferencia se ve mucho más marcada en 30°C. Se observó que, para 30°C, el porcentaje de crecimiento decae a partir de los 21 días de almacenamiento. Los medios liofilizados se han preparado siguiendo el protocolo del medio de control, pero pasaron por un proceso de liofilización. Este proceso se utiliza ya que no modifica las propiedades fisicoquímicas del medio [27]. No obstante, a pesar de ser deshidratado, aún mantiene una humedad residual, que en alimentos se busca que sea incluso menor al 5% [27]. Este porcentaje de humedad podría ser suficiente para que los componentes del medio comiencen a oxidarse, en especial a los 30°C de almacenamiento. Esta oxidación resultaría en el cambio de color del medio como se observa en el Anexo 1. Por otro lado, una temperatura alta como 30°C puede estar precipitando reacciones de Maillard. Esta reacción no enzimáticas entre azúcares reductores, como la glucosa, y aminoácidos, como la albúmina o la caseína, producen compuestos que generan un oscurecimiento o cambio de color en el medio [28].

Respecto al cambio del pH en los medios luego de determinado tiempo de almacenamiento, *Mycobacterium tuberculosis* crece óptimamente a un pH de 7; sin embargo, también puede crecer en ambientes ácidos como las vacuolas fagocíticas de los macrófagos. En medios ácidos con pH de 6.0-6.5 requiere altos niveles de Mg⁺² para crecer [29]. El medio convencional utilizado para MODS junto al OADC presenta un pH entre el rango de 6.5-7.0, lo cual es un pH óptimo para la micobacteria. Los medios mezclados y liofilizados almacenados a 4°C mantienen un pH dentro de este rango a lo largo de los 150 días. Asimismo, a 30°C el medio mezclado se mantiene en este rango a diferencia del liofilizado a 30°C. Se observó que el pH del medio liofilizado almacenado a 30°C se volvía ligeramente ácido a mayor tiempo de almacenamiento. Esto se debe a la oxidación de los componentes, favorecida por la humedad residual, la cual se encontraría en menor medida en el medio mezclado. Asimismo, la temperatura ayudó a acelerar estas reacciones de oxidación. La oxidación de azúcares puede producir ácidos orgánicos, como el ácido glucónico a partir de la glucosa, lo que contribuye a una reducción del pH [30]. Por otro lado, la oxidación de proteínas puede liberar aminoácidos y otros productos que, al descomponerse, generan compuestos ácidos, afectando el pH del medio [31].

Asimismo, el efecto de algún componente como el ácido oleico podría estar afectado el pH del medio liofilizado cuando es almacenado a 30°C. Debido a que los estudios de cada componente individual del OADC se realizaron antes de los años 50, no se conoce este efecto individual de cada componente. Sin embargo, sí se demostró que el ácido oleico, a pesar de ser un componente muy importante dentro del metabolismo de la micobacteria, tiene un efecto inhibitor

del crecimiento cuando se utiliza en un pH ácido (pH 5.5) en un estudio de susceptibilidad a PZA [32]. Esto explicaría, el menor número de microcolonias cuando el pH del medio liofilizado se acidifica a altas temperaturas. Actualmente, se utilizan medios sin ácido oleico a pH neutro para detectar MTB.

En el caso del medio mezclado, este no fue preparado con ácido oleico ni catalasa. Si bien se ha demostrado que la catalasa favorece el crecimiento de MTB en el medio mezclado en polvo, también favorece la contaminación de la prueba con muestras de esputo en un 13.5% y 31% [12][18]. Debido a que no se utilizó catalasa, el medio mezclado presentó un número de microcolonias menor al control, pero no resultó en una diferencia significativa en el presente estudio. Se esperaría que el medio liofilizado presentara un crecimiento mayor a 4°C a lo largo del tiempo, debido a que este contenía tanto catalasa como ácido oleico. Sin embargo, en el estudio de Rodríguez [18], cuando se utilizó PANTA, tanto el medio mezclado en polvo como el liofilizado presentaron un porcentaje de crecimiento y un número de microcolonias similar. Por lo tanto, a pesar de presentar catalasa, el ácido oleico del medio liofilizado en contacto con PANTA podría estar afectando el crecimiento de *Micobacterium tuberculosis* cuando es almacenado a 30°C.

Tanto el medio en polvo como el liofilizado demostraron ser económicamente accesibles en comparación con el medio tradicional, al emplear insumos más baratos o producidos localmente, y evitar el desperdicio frecuente de lotes de medio preparado que expiran sin usarse. Rodríguez et al. reportaron que estos medios secos son más baratos de producir que el medio OADC estándar [12], concordando con nuestros análisis de costos unitarios. Una adopción a mayor

escala de estas presentaciones podría reducir el costo por prueba MODS, beneficiando a los programas nacionales de TB que operan con presupuestos limitados.

En términos de rapidez diagnóstica, la utilización de medios listos para usar acelera significativamente el proceso pre-analítico. En un laboratorio convencional, la preparación de medios de cultivo puede ser un cuello de botella que retrasa el inicio de las pruebas; con los medios deshidratados, ese obstáculo prácticamente desaparece. Si un paciente sospechoso de TB llega a una clínica periférica, su muestra de esputo podría inocularse en el medio MODS alternativo el mismo día de recolección, sin depender de envíos a la capital ni de esperar que un laboratorio central procese la muestra. Esto, sumado al corto tiempo intrínseco de detección del MODS (menor a una semana), derivará en un diagnóstico y reporte de susceptibilidad mucho más oportuno en el punto de atención. Especialmente, el medio mezclado en polvo, al no necesitar ningún proceso de autoclavado, estaría acelerando el tiempo de diagnóstico para los pacientes con esta enfermedad. De esta manera, las innovaciones aquí discutidas –medios de cultivo mezclados en polvo y liofilizados para MODS– aportan una solución concreta para fortalecer la red diagnóstica descentralizada de la tuberculosis, haciendo viable que la detección rápida de TB y MDR-TB alcance también a las poblaciones de áreas rurales o de difícil acceso.

En conclusión, la evidencia presentada demuestra que es factible optimizar la prueba MODS mediante medios de cultivo alternativos estables, manteniendo su alta eficacia diagnóstica mientras se simplifican los requisitos logísticos. La incorporación de un medio mezclado deshidratado y un medio liofilizado para MODS podría transformar la estrategia diagnóstica de la TB en países

endémicos, al proporcionar una herramienta confiable, rápida y asequible que trascienda las barreras de infraestructura. Estos avances tecnológicos apoyan decididamente los esfuerzos para un diagnóstico temprano universal de la TB, condición indispensable para controlar la epidemia y enfrentar el desafío de la tuberculosis resistente en el siglo XXI.

VI. CONCLUSIONES

- Los resultados de este estudio permiten concluir que el medio MODS mezclado, elaborado en formato seco, representa una alternativa técnicamente viable al medio convencional 7H9-OADC, especialmente en contextos donde el acceso a la cadena de frío es limitado. Este medio mantuvo su estabilidad microbiológica y fisicoquímica por al menos 150 días, tanto a 4°C como a 30°C, sin alteraciones significativas en el número de microcolonias ni en el porcentaje de crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*.
- En contraste, el medio liofilizado, si bien mostró buen desempeño inicial a 4°C, presentó deterioro progresivo cuando se almacenó a 30°C, evidenciado por disminución en el crecimiento bacteriano, acidificación del pH, cambio de color y dificultad en la resuspensión. Estas alteraciones comprometen su uso operativo en condiciones ambientales de alta temperatura sin refrigeración.
- Ambos medios presentaron tasas de contaminación aceptables y esporádicas, sin diferencias relevantes entre formulaciones o temperaturas, lo cual demuestra que las estrategias de esterilización y suplementación con PANTA fueron en general eficaces.

- Este estudio constituye un aporte significativo al desarrollo de herramientas diagnósticas más accesibles para tuberculosis en entornos de bajos recursos. La validación de medios estables a temperatura ambiente allana el camino hacia una implementación descentralizada y eficiente de la prueba MODS, especialmente en regiones rurales o selváticas del Perú, donde los desafíos logísticos impiden el uso sostenido de métodos que dependen de refrigeración constante.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] World Health Organization (2023). Global tuberculosis report 2023. <https://www.who.int/teams/global-programme-on-tuberculosis-and-lung-health/tb-reports/global-tuberculosis-report-2023>
- [2] Del Castillo Hernán, Mendoza-Ticona Alberto, Saravia Juan Carlos, Somocurcio José G.. Multidrug and extensively-drug resistant tuberculosis (TB MDR/XDR) epidemic in Peru: situation and proposals for its control. Rev. perú. med. exp. salud publica [Internet]. 2009 Jul [citado 2023 Oct 30] ; 26(3): 380-386. Recuperado de: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S172646342009000300018&lng=es.
- [3] Somoskovi A, Parsons LM, Salfinger M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide. in Mycobacterium. tuberculosis. Respiratory research 2001;2(3):1–5. 10.1186/ rr54. [PubMed: 11686858]

- [4] Alvarez Calderón D. Detection of rpoB mutations related to rifampicin-resistance in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis through a simple and low-cost assay based on High Resolution Melting Analysis. 2019.
- [5] Santos-Lazaro D, Puyen ZM, Gavilan RG. Genetic structure of drug-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis in Peru based on haplotypes obtained from an online probe assay. Peruvian Journal of Experimental Medicine and Public Health 2022;38:577–86.
- [6] Ministerio de Salud. Technical health standard for the comprehensive care of people affected by tuberculosis. <http://www.tuberculosis.minsa.gob.pe/portaldpctb/recursos/20180308083418.pdf;2013>.
- [7] Whitfield MG, Warren RM, York T, Streicher EM, Van Rie. A global perspective on pyrazinamide resistance: systematic review and meta-analysis. PLoS One 2015;10 (7).
- [8] Pang Y, Zhu D, Zheng H, Shen J, Hu Y, Liu J, Zhao Y. Prevalence and molecular characterization of pyrazinamide resistance among multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from Southern China. BMC Infect Dis 2017;17 (1):711. 10.1186/s12879-017-2761-6. [PubMed: 29110640]
- [9] Piatek, A. S., Van Cleeff, M., Alexander, H., Coggin, W. L., Rehr, M., Van Kampen, S., Shinnick, T. M., & Mukadi, Y. (2013). GeneXpert for TB diagnosis: planned and purposeful implementation. *Global health, science and practice*, 1(1), 18–23. <https://doi.org/10.9745/GHSP-D-12-00004>
- [10] Pareja-Ramos Juan J., Huamán-Orosco Patricia C, Torres-Chang Julio. La prueba rápida MODS: Una necesidad creciente de descentralización en nuestro país. Rev Med

Hered [Internet]. 2013 Abr [citado 2023 Oct 30] ; 24(2): 170-170. Recuperado de: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018130X2013000200012&lng=es.

[11] Leung E, Minion J, Benedetti A, Pai M, Menzies D. Microcolony culture techniques for tuberculosis diagnosis: a systematic review [Review article]. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease [Internet]. 2012 Jan 1 [cited 2023 Oct 30];16(1):16–23. Recuperado de: <https://www.ingentaconnect.com/content/iatld/ijtld/2012/00000016/00000001/art00005>

[12] Rodríguez J, Alcántara R, Rodríguez J, Vargas J, Roncal E, Antiparra R, Gilman RH, Grandjean L, Moore D, Zimic M, Sheen P. Evaluation of three alternatives cost-effective culture media for Mycobacterium tuberculosis detection and drug susceptibility determination using the microscopic observation drug susceptibility (MODS) assay. Tuberculosis (Edinb). 2022 Dec;137:102273. doi: 10.1016/j.tube.2022.102273. Epub 2022 Nov 14. PMID: 36403561; PMCID: PMC10022417.

[13] Moore, D. A., Evans, C. A., Gilman, R. H., Caviedes, L., Coronel, J., Vivar, A., ... & Friedland, J. S. Microscopic-observation drug-susceptibility assay for the diagnosis of TB. New England Journal of Medicine. 2006. 355(15), 1539-1550.

[14] Mendoza A, Castillo E, Gamarra N, et al. Reliability of the MODS assay decentralisation process in three health regions in Peru. Int J Tuberc Lung Dis. 2011; 15: 1–12.

[15] DIGEMID. NTS N° 182-MINSA/DIGEMID-2022. Norma técnica de salud que regula los estudios de estabilidad de las especialidades farmacéuticas. Recuperado de:

https://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/Normatividad/2022/ANEXO_RM_111-2022-MINSA.pdf

[16] Gobierno de Argentina. GUIA PARA LA ELABORACIÓN DE ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DE PRODUCTOS FARMACÉUTICOS VETERINARIOS 1.INTRODUCCIÓN. *ANEXO VI (Artículo 44 Inciso f)*. n.d. Recuperado de: <https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/infoleg/res1642-6.pdf>

[17] Coronel, J., Roper, H., Caviedes, L., & Moore, D. MODS: a user guide (v12.1). Microscopic observation drug susceptibility assay. Lima, Peru: Universidad Peruana Cayetano Heredia, 2008.

[18] Rodriguez, J., Estudio piloto: evaluación de las variantes de preparación del medio de cultivo 7H9-OADC para el crecimiento de Mycobacterium tuberculosis usadas en la prueba MODS []. PE: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2022. <https://hdl.handle.net/20.500.12866/11617>

[19] Pamplona Lotero, J. Validación del tiempo de vigencia de medios de cultivo, a través de la prueba de promoción y crecimiento en superficie. 2022. Recuperado de: <https://hdl.handle.net/10495/29037>

[20] Kennedy Kassaza, Oriquiriza P, Llosa AE, Bazira J, Nychangane D, Page A, et al. Lowenstein-Jensen Selective Medium for Reducing Contamination in Mycobacterium tuberculosis Culture. Journal of Clinical Microbiology [Internet]. 2014 Jul 1 [citado el 30 de Octubre del 2023];52(7):2671–3. Recuperado de: <https://journals.asm.org/doi/epub/10.1128/jcm.00749-14>

[21] Robles JN, Sánchez Y, Tepoz J, Estrada AZ, Rocío I, Cervantes G, Gutiérrez Ramírez J. Manual para la evaluación del desempeño de los medios de cultivo en el laboratorio de microbiología de alimentos. Secretaría de Salud, Comisión Federal para

la Protección contra Riesgos Sanitarios, Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura; 2018. p.2-35.

[22] Fisher scientific [Internet]. Bruselas; 2024. [Citado 12 de noviembre de 2024]. Recuperado a partir de: <https://www.fishersci.be/shop/products/bd-difco-dehydrated-culture-media-middlebrook-7h9-broth/11753473>

[23] BD [Internet]. Estados Unidos: 2013. [Citado 12 de noviembre de 2024]. Recuperado a partir de: https://regdocs.bd.com/regulatory/view/msds/225910_536918FBDBE916F3E1000000A1B1268_sds_pdf

[24] Thermofisher scientific. Reino Unido; 2009. [Citado 12 de noviembre de 2024]. Recuperado a partir de: <https://assets.thermofisher.com/DirectWebViewer/private/document.aspx?prd=ALFAAA16828~PDF~MTR~CLP1~EN~2024-02-04%2002:44:17~D->

[25] Avantor [Internet]. 2024. [Citado 12 de noviembre de 2024]. Recuperado a partir de: <https://us.vwr.com/store/product/13694402/bovine-serum-albumin-bsa>

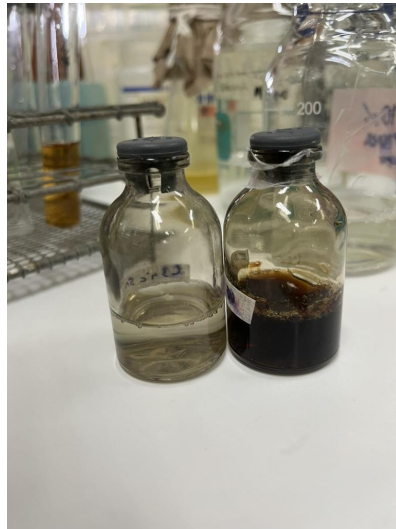
[26] Cauti, M., Evaluación de medios de cultivo modificados para el desarrollo de un kit microbiológico basado en MODS de *Mycobacterium tuberculosis* usando un modelo de crecimiento de *Mycobacterium smegmatis*. Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2021. <https://hdl.handle.net/20.500.12866/9663>

[27] Vera VJ, Centeno E, Sotres F, Manrique EM. Preparación de ingredientes liofilizados para la elaboración de pozole instantáneo. Rev Biol Agropecuaria Tuxpan. 2014;2(1):357-62.

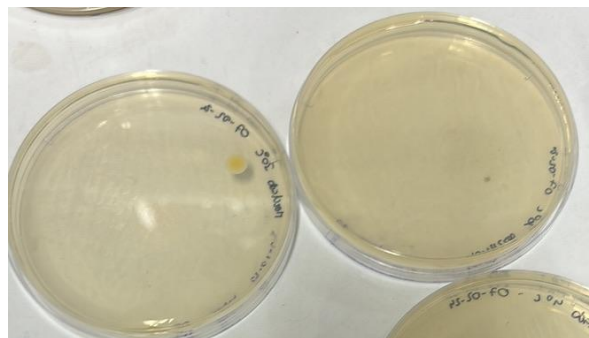
[28] Sobral PA, Wagner J. Estudio de la cristalización térmicamente inducida en suero de soja liofilizado. In: III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CICyTAC); 2009 Apr 15-17; Córdoba, Argentina.

- [29] Piddington, D. L., A. Kashkouli, and N. A. Buchmeier. 2000. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* in a defined medium is very restricted by acid pH and Mg²⁺ levels. *Infect. Immun.*68:4518-4522.
- [30] Galvanoquímica Mexicana. Ácido glucónico para la industria alimentaria [Internet]. 2022 Jul 20 [citado 12 de noviembre 2024]. Disponible en: <https://galvanoquimica.com.mx/blog/2022/07/acido-gluconico-para-la-industria-alimentaria>
- [31] Lupano, Cecilia Elena; Modificaciones de componentes de los alimentos: cambios químicos y bioquímicos por procesamiento y almacenamiento; Universidad Nacional de La Plata; 1; 2013; 217
- [32] Butler W, Kilburn J. Improved Method for Testing Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to Pyrazinamide. *Mycobacteriology Branch, Division of Bacterial Diseases, Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control, Atlanta, Georgia.* 1982. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6819309/>

ANEXOS

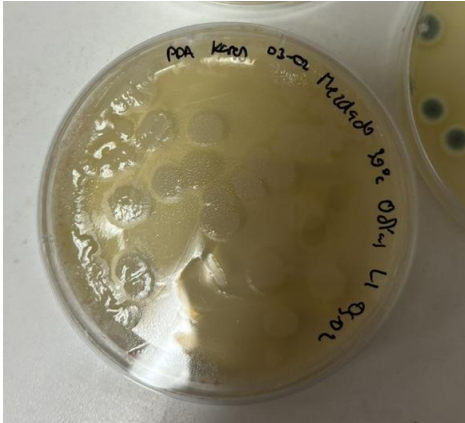


Anexo 1. Medio liofilizado almacenado a 30°C por 7 días (derecha) y medio mezclado almacenado a 30°C por 7 días (izquierda).

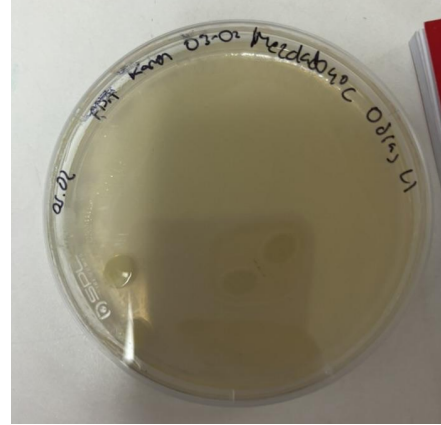


A

B

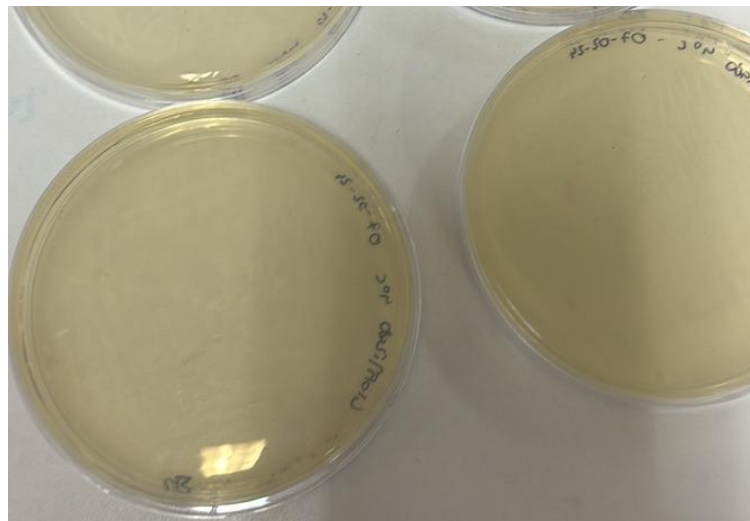


C



D

Anexo 2. Placas de agar LB medio mezclado almacenado a 30°C (A) y a 4°C (B). Placas de agar papa dextrosa medio mezclado almacenado a 30°C (C) y a 4°C (D). Todos sembrados el mismo día de preparación de lote. La lectura se realizó a las 24 horas.



A

B



C

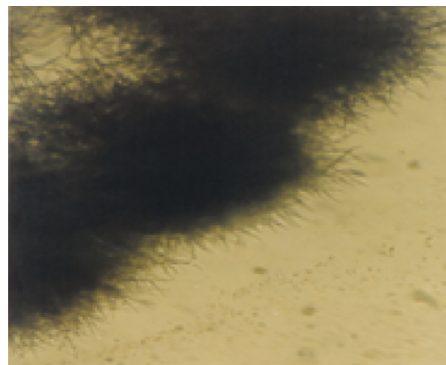


D

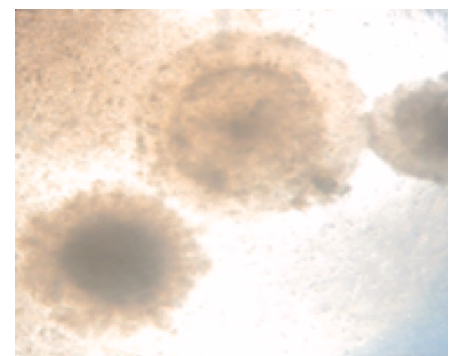
Anexo 3. Placas de agar LB medio liofilizado almacenado a 4°C (A) y a 30°C (B). La lectura se realizó a las 24 horas. Placas de agar papa dextrosa medio liofilizado almacenado a 4°C (C) y a 30°C (D). La lectura se realizó a los 5 días. Todas las placas fueron sembradas el mismo día de preparación de lote.



A



B



C

Anexo 4. Contaminación bacteriana (A) y contaminación fúngica (B-C) con un aumento de 40 X. Figura A de autoría propia. Figuras B y C de Rodriguez et al. (2022).