



“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”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRA EN MICROBIOLOGÍA

JOSELINE RODRIGUEZ PUMA

LIMA – PERÚ

2022

ASESOR (A)

Dra. Patricia Sheen Cortavarría

JURADO DE TESIS

DRA. JASMÍN ELENA HURTADO CUSTODIO

PRESIDENTE

M.SC. DORA JESUS MAURTUA TORRES

VOCAL

DR. ARCADIO IVAN LOZADA REQUENA

SECRETARIO

DEDICATORIA.

A mi mayor tesoro, mis padres Marino Rodriguez y Olga Puma que me brindaron la confianza, amor y apoyo en cada momento de mi vida, son la mayor motivación de todos mis logros y metas cumplidas.

A mis hermanos mayores Donny y Christian que cuidaron de mi cuando mis padres trabajan arduamente para sacarnos adelante.

AGRADECIMIENTOS.

A Dios, por la bendición de permitirme cumplir poco a poco mis objetivos.

A la Dra Paty Sheen por la oportunidad y las enseñanzas brindadas incondicionalmente.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO.

El presente estudio fue llevado a cabo como parte del proyecto “Desarrollo de un kit para el diagnóstico rápido de resistencia a pirazinamida y MDR en tuberculosis usando la prueba MODS” (Contrato N° 157-2018-FONDECYT-BM-IADT-AV)

Este proyecto ha sido financiado por el proyecto Concytec – Banco Mundial A través de su unidad ejecutora Fondecyt.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN

ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	5
3. HIPÓTESIS	14
4. OBJETIVOS.....	14
4.1. Objetivo general	14
4.2. Objetivos específicos	14
5. MATERIALES Y MÉTODOS	15
5.1. Muestras biológicas.....	17
5.2. Preparación del medio de cultivo 7H9-OADC y los medios de cultivo alternativos mezclado y liofilizado.....	17
5.3. Tratamiento con PANTA y radiación gamma de los medios de cultivo alternativos liofilizado y mezclado.....	21
5.4. Evaluación del crecimiento de la cepa DM97 de MTB en el medio 7H9- OADC y los medios de cultivo alternativos	22
5.5. Evaluación del crecimiento de MTB en muestras de esputo en los medios de cultivo alternativos seleccionados.....	24
5.6. Análisis estadístico	26
5.7. Aspectos éticos.....	27
6. RESULTADOS	28
6.1. Primera fase: Evaluación del crecimiento de la cepa DM97 de MTB en el medio 7H9-OADC y los medios de cultivo alternativos.....	28
6.1.1. Medio 7H9-OADC.....	29
6.1.2. Medio mezclado.....	32
6.1.3. Medio liofilizado.....	36
6.2. Segunda fase: Evaluación del crecimiento de MTB en muestras de esputo en los medios de cultivo alternativos seleccionados.	37
6.2.1. Día de positividad.....	39

6.2.2. Crecimiento de muestras de esputo y contaminación de medios de cultivo.....	40
7. DISCUSIONES	41
8. CONCLUSIONES.....	47
9. LIMITACIONES	48
10. RECOMENDACIONES.....	49
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
ANEXO 1	
ANEXO 2	
ANEXO 3	

ABREVIATURAS

TB: Tuberculosis

MTB: *Mycobacterium tuberculosis*

TB-MDR: Tuberculosis multidrogo resistente

LJ: Lowenstein Jensen

INH: Isoniazida

RIF: Rifampicina

PZA: Pirazinamida

MODS: Microscopic Observation Drug Susceptibility Assay o Susceptibilidad de Drogas de Observación Microscópica

OADC: Ácido Oleico, albumina, dextrosa y catalasa

PANTA: Polimixina B, anfotericina B, ácido nalidixico, trimetoprim y azlocilina

ML: Medio liofilizado

MM: Medio mezclado

MM_P: Medio mezclado con PANTA

MM_PC: Medio mezclado con PANTA y catalasa

MM_G: Medio mezclado con radiación gamma

MM_GC: Medio mezclado con radiación gamma y catalasa

MM_GPC: Medio mezclado con radiación gamma, PANTA y catalasa

ML_P: Medio liofilizado con PANTA

ML_G: Medio liofilizado con radiación gamma

ML_CP: Medio liofilizado con radiación gamma y PANTA

OMS: Organización Mundial de la Salud

RESUMEN

La tuberculosis es una enfermedad que se encuentra entre las diez principales causas de muerte en todo el mundo según los últimos informes otorgados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), motivo por el cual se han implementado diversos métodos de diagnóstico, entre ellos encontramos las pruebas moleculares que presentan ventajas como la automatización, un tiempo corto de respuesta, alta sensibilidad y especificidad; sin embargo, son muy costosas. También se cuenta con pruebas económicas como la baciloscopia que se basa en la observación directa del bacilo de Koch en un microscopio, pero con una sensibilidad muy baja (40% - 70%) o cultivos usando el medio Löwenstein-Jensen u Ogawa, siguen siendo una opción de bajo costo, pero con tiempos de respuesta más prolongados (≥ 24 días).

La prueba de Susceptibilidad de Drogas de Observación Microscópica, MODS por las siglas en inglés, que utiliza el medio líquido Middlebrook 7H9 enriquecido con OADC (suplemento compuesto por ácido oleico, albumina, dextrosa y catalasa), casitona y glicerol (7H9-OADC) y el suplemento antimicrobiano PANTA, presenta una alta sensibilidad y especificidad. El MODS se basa en la detección del crecimiento característico de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), que a su vez evalúa la susceptibilidad a isoniacida y rifampicina en un corto tiempo, es de bajo costo e ideal para su implementación en países en desarrollo. Sin embargo, este método requiere insumos variados y personal altamente entrenado que garantice la correcta preparación del medio de cultivo siendo una limitante de su uso de manera extensiva. En la presente propuesta se evaluaron variantes del medio de cultivo 7H9-OADC (medios alternativos) que solo requieren la adición de agua estéril para usarlos. Los medios alternativos fueron: Medios mezclados, preparados mezclando

los componentes del medio en polvo (sin esterilización); y medios liofilizados, preparados mediante liofilización del medio líquido estéril 7H9-OADC. Con el objetivo de tener un medio mínimo que asegure el crecimiento de MTB manteniendo la esterilidad del medio se evaluaron la catalasa (solo en el medio mezclado), el PANTA y la irradiación gamma, generando un total de 10 condiciones (variaciones de los medios mezclados y liofilizados).

Los medios con mejores resultados fueron seleccionados y evaluados con muestras de esputo con baciloscopia positiva. El crecimiento bacteriano se determinó por número de microcolonias y porcentaje de crecimiento del aislado de MTB y por porcentaje de crecimiento en las muestras de esputo. El análisis con el aislado de MTB mostró que la adición de catalasa promueve el crecimiento de MTB independientemente del tipo de medio ($p=0,006$); la radiación gamma no afecta el crecimiento de MTB ($p=1$) y la presencia del PANTA reduce el crecimiento de MTB de forma significativa en los medios liofilizados irradiados ($p<0.05$). 26 muestras de esputo fueron positivas en todos los medios con una mediana de días de positividad de 6 ± 3 días con un rango de 4 a 14 días. No se observaron diferencias significativas ($p=0,47$) en el porcentaje de crecimiento entre el medio 7H9-OADC (100%), medio mezclado (95%) y medio liofilizado (100%). En conclusión, los resultados preliminares muestran que las presentaciones de los medios alternativos tienen un rendimiento similar al medio MODS estándar.

Palabras claves: MODS, tuberculosis, medios alternativos, liofilización, irradiación.

ABSTRACT

Tuberculosis is a disease that is among the ten leading causes of death worldwide according to the latest reports issued by the World Health Organization (WHO), which is why various diagnostic methods have been implemented, among them are molecular tests that have advantages such as automation, short response time, high sensitivity and specificity; however, they are very expensive. There are also inexpensive tests such as bacilloscopy which is based on direct observation of Koch's bacillus under a microscope, but with a very low sensitivity (40% - 70%) or cultures using Löwenstein-Jensen or Ogawa medium, still a low-cost option, but with longer response times (≥ 24 days).

The Microscopic Observation Drug Susceptibility Test (MODS), which uses Middlebrook 7H9 liquid medium enriched with OADC (supplement composed of oleic acid, albumin, dextrose and catalase), casitone and glycerol and the antimicrobial supplement PANTA (7H9-OADC), presents high sensitivity and specificity. MODS is based on the detection of the characteristic growth of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), which in turn evaluates susceptibility to isoniazid and rifampicin in a short time, is low cost and ideal for implementation in developing countries. However, this method requires a variety of inputs and highly trained personnel to ensure the correct preparation of the culture medium, which is a limitation to its extensive use. In the present proposal, two alternative 7H9-OADC-based media that only require the addition of sterile water for use were evaluated. The alternative media were: Mixed media, prepared by mixing the powdered media components (without sterilization); and lyophilized media, prepared by lyophilization of the sterile liquid 7H9-OADC medium. In order to

have a minimum medium that ensures the growth of MTB while maintaining the sterility of the medium, catalase (only in the mixed medium), PANTA and gamma irradiation were evaluated, generating a total of 10 conditions (variations of the mixed and lyophilized media).

The best performing media were selected and evaluated with smear-positive sputum samples. Bacterial growth was determined by number of microcolonies and percentage growth of the MTB isolate and by percentage growth in sputum samples. Analysis with MTB isolate showed that the addition of catalase promotes MTB growth regardless of media type ($p=0.006$); gamma radiation does not affect MTB growth ($p=1$) and the presence of PANTA reduces MTB growth significantly in irradiated lyophilized media ($p<0.05$). 26 sputum samples were positive on all media with a median day of positivity of 6 ± 3 days with a range of 4 to 14 days. No significant differences ($p=0.47$) were observed in the percentage of growth between conventional medium (100%), mixed medium (95%) and lyophilized medium (100%). In conclusion, preliminary results show that the alternative media presentations perform similarly to the standard MODS medium.

Key words: MODS, tuberculosis, alternative media, lyophilization, irradiation.

1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB), es una enfermedad producida por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), considerada dentro de las 10 principales enfermedades causantes de muertes a nivel mundial (OMS, 2021). En el 2020, 9.9 millones de personas enfermaron de TB y 1,5 millones murieron por esta enfermedad. Durante el 2018, las regiones de Asia Sudoriental y el Pacífico Occidental presentaron los registros más elevados en nuevos casos de TB con un 43 % y 18% respectivamente, y África con un 25 % (1). La posibilidad de que una persona con TB activa pueda contagiar entre 10 y 15 personas al año por contacto directo es alarmante y de suma preocupación (1), aunque se ha observado que la incidencia en la población viene decreciendo lentamente debido a las diferentes estrategias para controlar la TB en todas partes del mundo incluyendo al Perú. Sin embargo, en la actualidad la resistencia a los medicamentos es considerada como una crisis a nivel nacional e internacional, abriendo paso al aumento del porcentaje de casos de TB multidrogo resistentes (TB-MDR), donde según las estimaciones otorgadas por la OMS en el 2018, hubo 558 mil nuevos casos de resistencia a la rifampicina, de los cuales el 82% padecían TB-MDR.

Durante los años del 2011 al 2015 en el Perú, la incidencia de TB ha disminuido de 105.2 a 101.3 casos por cada 100 mil habitantes. No obstante, un análisis llevado a cabo por la Organización Panamericana de la Salud (OPS), Perú es el segundo país de América con el mayor número de casos estimados de TB en las Américas 2020 con 39 mil casos que equivalen al 13.4% de los casos reportados; y los primeros con mayor número de casos de TB resistente a rifampicina y MDR. El Perú tiene 3

100 casos MDR que equivalen el 28% de porcentaje de casos de TB-MDR sobre el total de casos (1)(2)(3). La pobreza presente en el país, en especial en los barrios marginados, establecen una estrecha relación con esta enfermedad (4).

La identificación apropiada de los casos de TB requiere de métodos económicos y con un diagnóstico confiable; en la actualidad, el diagnóstico de TB en los centros de salud periféricos en nuestro país se basa en la baciloscopia, cuya sensibilidad está en un rango de 40-70% en muestras respiratorias (5). Ante la falta de un diagnóstico eficiente, se incrementa el daño pulmonar y la transmisión en la comunidad. Esta situación se agrava en los casos TB-MDR debido a que el tratamiento es más complicado si la enfermedad no se diagnostica a tiempo.

Los casos de TB sensibles son tratados con las drogas de primera línea (isoniacida, rifampicina, etambutol y pirazinamida); mientras que las personas con casos de TB-MDR son tratados con ciprofloxacina, capreomicina, etionamida, kanamicina y pirazinamida (6). El alto porcentaje de MDR en nuevos casos amerita que todas las muestras en poblaciones de mediano y alto riesgo a MDR sean analizadas con pruebas rápidas de bajo costo, sencillas y aplicadas en laboratorios periféricos. La falta de detección temprana de TB, el abandono del tratamiento y la aparición de resistencia a los medicamentos antituberculosos tradicionales dificultan la eliminación de esta enfermedad (7)(8).

Hoy en día las medidas implementadas para controlar la TB incluyen nuevas pruebas de detección temprana de la enfermedad y nuevos tratamientos antituberculosos (9). Estas pruebas incluyen a las pruebas moleculares (Xpert MTB/RIF y MTBDR- Plus) que permiten la detección de TB y MDR en forma

rápida. Sin embargo, estas pruebas presentan limitaciones debido a que determinan resistencia a isoniacida y rifampicina relacionados a mutaciones específicas dejando de identificar mutaciones que se encuentren fuera del área evaluada, y dependen de equipos e insumos altamente costosos (10)(11). Las pruebas rápidas que determinan la susceptibilidad microbiológica directa como la prueba de Susceptibilidad de Drogas de Observación Microscópica (MODS), una prueba elaborada en la Universidad Peruana Cayetano Heredia es de bajo costo y determina la resistencia de todas las drogas incluyendo aquellas de segunda línea (12)(13); sin embargo, requiere de laboratorio con personal altamente entrenado e insumos y la correcta preparación de los medios de cultivo que garanticen la calidad de la prueba (14).

En el año 2014, Hardy Diagnostics inició la comercialización del kit basado en la prueba MODS con los reactivos listos para su uso. Sin embargo, la presentación líquida de todos los componentes requería un transporte de sumo cuidado y una cadena de frío constante (4°C), lo cual incrementaba el costo y limitaba la demanda y su uso extensivo en entornos de bajos recursos (15)(16).

A nivel mundial, el uso del MODS, a pesar de sus beneficios, se ha reducido, lo cual se ve reflejado en el número de publicaciones basadas en esta prueba. En el Perú, la prueba de MODS es usada en forma limitada; 3 sedes de la red de los laboratorios de TB realizan esta prueba (DIRESA Callao, Arequipa y DIRESA Ica). El uso de esta prueba podría ser más extensa si su preparación fuera sencilla y los reactivos tuvieran un precio accesible. La preparación se simplifica con los medios listos para usar como el que fue desarrollado por Hardy Diagnostics; sin embargo, la reducción de los precios podría conseguirse si los reactivos tuvieran una

presentación deshidratada (polvo). Una presentación deshidratada significaría la reducción del peso y el no requerimiento de bajas temperaturas.

Con el objetivo de facilitar el transporte y conservación de los insumos, facilitar la preparación del medio y reducir los costos de las pruebas para que pueda ser accesible a más laboratorios, en este trabajo se evaluó variantes de dos presentaciones deshidratadas del medio 7H9-OADC: Medio mezclado y medio liofilizado. Las variantes de medios fueron tratados con PANTA y radiación gamma para controlar la contaminación microbiana y fueron evaluados usando cultivos puros de MTB y muestras de esputo de pacientes con TB.

2. ANTECEDENTES

2.1. Tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una enfermedad prevenible y curable, causada por MTB o bacilo de Koch, transmisible básicamente de persona a persona por vía aérea, al toser o estornudar que luego se localiza principalmente en el pulmón, aunque puede afectar otros órganos del cuerpo. Según la OMS esta enfermedad estaría presente, de forma latente, en la cuarta parte de la población mundial, de las cuales el 5-15% de personas tiene el riesgo de desarrollar TB en el transcurso de sus vidas. Esta enfermedad ha sido catalogada como una de las 10 principales causas de mortalidad en el mundo y en el Perú entre las 15 (MINSA, 2018), por tal motivo su control y erradicación es de carácter urgente.

2.2. Tuberculosis en el Perú

En el Perú a raíz de la implementación de diferentes programas de control y prevención frente a la TB, en el año 2016 se reportó 31 079 casos de TB, indicando una reducción en la tasa de incidencia de esta enfermedad con 86,4 casos nuevos de TB por cada 100 000 habitantes e indicando que en los últimos 10 años se muestra una tendencia sostenida en la disminución entre 1 a 3% (17). Pero entre los años 2008- 2015 se ha podido encontrar un incremento considerable de pacientes con TB-MDR y TB extremadamente resistente (TB-XDR), reportando en el año 2016 1,299 casos de TB-MDR y 109 casos de TB-XDR y en el cierre del año 2017, 1 335 casos de TB-MDR y 83 casos de TB-XDR, de los cuales el 83% (1018) de TB-MDR y 88% (73) de TB-XDR fueron notificados en las regiones de Lima y callao (2)(18), esto ratificando la premisa que en nuestro país la TB es una enfermedad endémica,

con altas tasas de incidencia y de transmisión. Esto debido a la implementación de nuevas técnicas, como el MODS, el método Genotype MTBDR plus y nitrato reductasa (Griess) (18).

2.3. Diagnóstico de la tuberculosis

En el año 2012, se evaluó el ensayo GenoType® MTBDRplus para la detección rápida de MDR-TB con 237 cepas de MTB, MTBDRplus mostró una sensibilidad del 75% para cepas resistentes a isoniacida, 93.5% para cepas resistentes a rifampicina y una especificidad del 100%; sin embargo, concluyen que Genotype MTBDRplus a pesar de ser una prueba molecular rápida y confiable para detectar MDR-TB, se observó un porcentaje considerable de cepas resistentes a isoniacida omitidas por ser de detección de mutaciones dirigidas, por lo que la integración de pruebas de rutina como los medios de cultivo convencionales (por ejemplo cultivo líquido) sería una excelente estrategia de diagnóstico para detectar MDR-TB (19).

2.4. La prueba de Susceptibilidad de Drogas de Observación Microscópica (MODS)

La prueba MODS , desarrollada en el 2000 (13) y aprobada por la OMS en el 2010 (20), está conformada por un caldo de cultivo compuesto por 5,9 g de caldo base Middlebrook 7H9, 0,31% de glicerol, 1,25 g de Bacto Casitone (cantidades calculadas para 1 litro), suplementada con 10% de OADC y antimicrobiano PANTA (20 µL/mL), donde se utiliza una placa de 24 pocillos para la visualización microscópica (13)(43)(Anexo2); comparándola con cultivos y pruebas de susceptibilidad a medicamentos mediante medios de cultivo sólidos convencionales de Lowenstein Jensen (LJ), cultivo automatizado de tubo indicador líquido de

crecimiento de micobacterias (por sus siglas en inglés MGIT) y Middlebrook agar 7H11, mostraron una sensibilidad del 92%, 76%, 93% y 78% respectivamente, con un tiempo medio en días de detección (rango) de 9 (4-31), 24 (6-59), 10 (4-39) y 14.5 (4-28) respectivamente, a lo cual este estudio demostró que MODS es un método eficiente dada su simplicidad, bajo costo (\$1.7), velocidad y precisión, MODS sería una prueba ideal para el diagnóstico de TB en países con dificultades económicas y en pleno desarrollo como Perú (13).

Medio base Middlebrook 7H9, suplemento OADC y antimicrobiano PANTA.

Este medio debe de ser suplementado con glicerol, casitona y OADC que es una mezcla de ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa. Asimismo, el medio contiene el antimicrobiano PANTA para ser usado en los cultivos de las muestras de esputo descontaminadas.

Medio base. El medio Middlebrook está compuesto por sales (fosfato monopotásico, citrato férrico de amonio, fosfato disódico, glutamato monosódico, citrato de sodio, sulfato de amonio y cloruro de calcio) que le confieren el buffer necesario, minerales (sulfato de magnesio, sulfato de zinc y sulfato de cobre); aminoácidos (biotina y piridoxina). Las sales inorgánicas proporcionan sustancias esenciales para el crecimiento de micobacterias. El citrato sódico, convertido en ácido cítrico, retiene determinados cationes inorgánicos en la solución. El glicerol es una fuente abundante de carbono y energía (25).

OADC. Suplemento de enriquecimiento, compuesto por ácido oleico, albumina, dextrosa y catalasa (OADC, por las siglas en ingles). El ácido oleico, ácido graso monoinsaturado, desempeña un rol importante dentro del metabolismo de las

micobacterias y es utilizado por MTB. La albúmina ayuda a MTB a una pronta recuperación después de un aislamiento primario y tiene como función principal la protección de los bacilos uniéndose a los ácidos grasos libres (agentes tóxicos). La dextrosa se emplea como fuente de energía. La catalasa destruye los peróxidos tóxicos que pudieran estar presentes en el medio. (21)

El OADC, debido a la presencia de sus componentes termolábiles, es esterilizado mediante filtración y agregados al medio de cultivo base luego que es esterilizado y enfriado. El OADC es preparado con 5 g de albúmina bovina, 20 g de dextrosa, 0.03 g de catalasa, 8.5 g de Cloruro de Sodio y 0.6 mL de ácido oleico para 1 litro, para luego ser mezclado en una proporción del 10% del medio base obteniéndose la concentraciones finales de 0.5 g de albúmina, 2 g de dextrosa, 3 µg/mL de catalasa, 0.85 g de Cloruro de Sodio y 60 µL de ácido oleico (21).

La efectividad para detectar el crecimiento (colonias) de MTB de los medios base sólido: Middlebrook Agar 7H10-OADC vs LJ a la semana 3 de crecimiento con 264 y 199 número de colonias respectivamente; 7H9-OADC vs LJ a la semana 6 de crecimiento, con 247 y 229 número de colonias respectivamente; se observa que tanto el agar 7H10 y 7H9 con uso de OADC es mayor que el medio LJ (22). Sin embargo; el efecto de cada componente fue evaluado antes de los años cincuenta por lo que el efecto individual de cada uno de ellos es desconocido. Cabe resaltar que el efecto del ácido oleico si fue estudiado debido a que se demostró que inhibió el crecimiento (en 25%) de las micobacterias cuando fue usado a pH ácido (pH 5.5) en la determinación de la susceptibilidad a pirazinamida (PZA) (Tummon, 1975 y Buttler 1982) (23), se realizaron estudios del uso de ácido oleico que inhibe o retrasa

el crecimiento de MTB, pero esta toxicidad puede ser contrarrestada con la adición de albúmina sérica (24). Hoy en día los medios sin ácido oleico se usan en pHs neutros para detectar a MTB como a pHs ácidos para determinar la susceptibilidad a PZA (23)(25).

PANTA. Es la mezcla de polimixina B, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprima y azlocilina, componente comercializado, usado en el MODS para reducir la contaminación de los cultivos de muestras clínicas que pueden ser causadas por la flora oral de microorganismos no eliminados durante el proceso de descontaminación (15)(16). La contaminación reportada del MODS a nivel mundial varía entre 2 al 5% (16)(44); porcentaje de contaminación aceptada y comparable al porcentaje de contaminación reportado en otros métodos que no usan PANTA como LJ. PANTA fue evaluado en muestras para el diagnóstico en MGIT, el cual mostró una reducción del 7% de contaminación (26). En otro estudio, cada componente antimicrobiano del PANTA fue evaluado en agar Middlebrook 7H10 y tubos MGIT, los resultados mostraron que polimixina B, anfotericina B y ácido nalidíxico reducen el crecimiento de MTB, mientras que trimetoprima y azilocilina no afecta el crecimiento de MTB (27). Debido a la falta de estudios del efecto del PANTA en el crecimiento de MTB, en este estudio PANTA fue evaluado. PANTA fue usado a la concentración indicada en el protocolo de la Guía de usuario de la prueba MODS (28) (Anexo 3).

Kit basado en MODS. El 16 de septiembre de 2014 se publicó un estudio llevado a cabo en Lima – Perú en el año 2012, en el cual se evaluó e implementó un kit para el diagnóstico fenotípico rápido de la TB, donde se cultivaron 2446 muestras de

esputo en paralelo en LJ, MODS convencionales y kit MODS donde comparando a la prueba MODS convencionales, los valores de sensibilidad, especificidad, y valores predictivos positivos y negativos (intervalos de confianza del 95%) del kit MODS fueron 99.3%, 98.3%, 95.8% y 99.7% respectivamente, en donde concluyen que el Kit MODS implementado era una alternativa asequible y segura puesto que adicionalmente incorporaba un prototipo de tapa de silicón para las placas de 24 pocillos, haciendo más seguro el trabajo para el personal encargado (15). Fue retirado del mercado en el año 2019, sin conocerse el motivo exacto.

2.5. Medios de cultivo alternativos, tratamientos de deshidratación y esterilización de los medios.

El medio de cultivo empleado para la prueba MODS (Medio base Middlebrook 7H9 y suplemento OADC) pasan por un proceso de esterilidad antes de su uso, a diferencia de los medios alternativos que se proponen en este trabajo, que son:

-Medio mezclado (MM). Consiste en el pesaje de los componentes necesarios de acuerdo con la composición del medio empleado para la prueba MODS para un volumen final de 25 mL al ser resuspendido con agua destilada. Cabe resaltar que los componentes pesados no son estériles (Tabla 1).

-Medio liofilizado (ML). Se preparó como el medio empleado para la prueba MODS. Después de agregar el suplemento OADC estéril al medio base Middlebrook 7H9 con glicerol y casitona autoclavado, se dispensaron alícuotas de 25 ml en viales de vidrio, se congelaron a -70 °C durante 24 horas para luego ser liofilizados (Tabla 1).

Liofilización. La liofilización consiste en la remoción del hielo de una materia congelada en un sistema al vacío para obtener como producto un material deshidratado (29), este proceso ha obtenido buenos resultados tomando en cuenta la estabilidad de los componentes, ya que no altera significativamente la estructura fisicoquímica del producto; se ha visto incluso que en algunos casos ha incrementado la eficacia de estos, adicionando una vida útil más prolongada, el cual permite su conservación sin la necesidad estricta de un circuito de cadena de frío (30).

Radiación gamma. La radiación gamma como método de esterilización, fue observada en el año 1896, del cual años después, María Curie, basándose en las evaluaciones hechas por F. Holwek y A. Lacassagne en el año de 1929, publicó un artículo acerca de la inactivación de bacterias por radiación (28). La radiación gamma proporciona un medio físico de esterilización (31), el cual se basa en la eliminación de microorganismos de la materia expuesta debido a la capacidad de la radiación ionizante dada por longitudes de ondas cortas que la atraviesan (32), de esta forma, actuando a nivel molecular, rompe el ADN microbiano e inhibe la propagación de estos (33). Este método de esterilización es adecuado para compuestos que no pueden ser expuestos a temperaturas elevadas ya que no dependen de presión, temperatura ni humedad (34). Sin embargo, el factor más importante en la radiación gamma es la potencia, expresada en KiloGrays (KGy), y el tiempo que se emplea para la exposición del material a esterilizar (35). Bogokowsky realizó un trabajo utilizando la radiación gamma como método de esterilización para agar MacConkey y agar Cistina-Lactoda -Electrolito Deficiente (CLED) a los cuales le añadieron tioglicolato de sodio como radioprotector y les

aplicaron una dosis de 1.5 Mrad que equivale a 15 KGy, dando como resultados medios de cultivos estériles, fueron probados con enterobacterias y otros microorganismos, y mostraron un buen crecimiento al igual que los medios esterilizados por autoclave (46). En base al sistema de Dosimetría Estándar de Referencia ASTM 1026 (Fricke) la dosis de 5 (KGy) es usada por el Instituto de Energía Nuclear (IPEN) para la esterilización de alimentos (36), dosis que será aplicada y evaluada para los medios alternativos.

Planteamiento del problema

Mundialmente la lucha contra la TB, una enfermedad que requiere un procedimiento de diagnóstico rápido, viene siendo un gran problema en el ámbito de la salud. El desarrollo de un medio de cultivo que simplifique el proceso de la prueba MODS, una prueba de diagnóstico rápido, confiable y económico, sería de gran ayuda para que esta prueba pueda ser usada extensamente en muchos laboratorios, y además podría incorporarse perfectamente como prueba de rutina que acompañe a métodos de diagnóstico molecular para la acertada detección de MDR-TB.

En este estudio se evaluó la eficiencia de los cultivos alternativos con el objetivo de facilitar su transporte, reducir costos y propiciar su uso de manera extensiva. Las variantes se evaluaron a partir de 2 presentaciones deshidratadas listas para usar por el usuario. Las presentaciones fueron: El medio mezclado y el medio liofilizado. El medio mezclado se preparó mediante la mezcla de insumos del medio 7H9-ADC (medio Middlebrook 7H9, ADC, casitona y glicerol). El medio liofilizado se

preparó usando el medio convencional líquido estéril 7H9-OADC seguido de una liofilización.

En los cultivos MODS, el medio 7H9-OADC líquido y estéril es usado conjuntamente con el PANTA para evitar la contaminación que proviene de la misma carga microbiana de las muestras de esputo descontaminadas. El PANTA es un buen inhibidor de la contaminación, siendo el promedio del porcentaje de contaminación del MODS de 3%; sin embargo, poco se sabe de su efecto en el crecimiento de MTB. En este estudio se evaluó el efecto del PANTA en el crecimiento de MTB.

Con el objetivo de tener un medio mínimo, se preparó el medio mezclado sin ácido oleico similar a la preparación de los medios comerciales los cuales usan ADC. Asimismo, el efecto de la catalasa fue evaluado debido a que es el único componente que debe de ser mantenido a -20°C y a que no hay estudios que muestren un efecto en el crecimiento de MTB en cultivos líquidos.

Asimismo, se evaluó la radiación gamma, como método de esterilización principalmente de los medios mezclados debido a que son medios que no son esterilizados mediante autoclavado ni filtración. El efecto del PANTA y radiación gamma, en forma conjunta, en el crecimiento de MTB también fue evaluado.

La certera selección del método de tratamiento fue una de las piezas fundamentales en este estudio para obtener una adecuada estabilidad y eficiencia del medio de cultivo final.

3. HIPÓTESIS

El crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* en los medios mezclados y liofilizados es similar al crecimiento en el medio convencional en la prueba MODS.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar las variantes de preparación del medio de cultivo 7H9-OADC para el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* usada en la prueba MODS.

4.2. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto del PANTA en el medio convencional usando una cepa de MTB.
- Evaluar el efecto del PANTA, radiación gamma y catalasa en los medios de cultivo mezclados usando una cepa de MTB.
- Evaluar el efecto del PANTA y radiación gamma en los medios de cultivo liofilizados usando una cepa de MTB.
- Evaluar los medios de cultivo alternativos usando muestras de esputo.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

En este estudio se evaluaron medios de cultivos alternativos basados en el medio 7H9-OADC-PANTA: Mezclados y liofilizados y sus variantes (Figuras 1 y 2). Este estudio corresponde a un estudio exploratorio que se llevó a cabo como parte preliminar de un trabajo de investigación de mayor alcance.

Los medios fueron evaluados en dos fases; en la primera fase se usó la cepa DM97 de MTB y en la segunda fase se evaluaron los medios usando 26 muestras de esputo obtenidas de la DIRESA Callao. Los medios seleccionados para la segunda fase contenían PANTA (MM_P, MM_PC, MM_GP, MM_GPC y ML_P) excepto la variante ML_GP, debido que los porcentajes de crecimiento de microcolonias de MTB fueron muy bajos (10%-30%). Todos los resultados fueron comparados con los resultados obtenidos en la prueba MODS usando el medio 7H9-OADC como estándar.

Primera fase. En esta fase los medios fueron evaluados mediante el crecimiento de la cepa DM97 de MTB. El efecto del PANTA en el MODS fue evaluado en el medio 7H9-OADC, así como el efecto del PANTA e irradiación gamma en los medios alternativos. La catalasa fue evaluada en el medio mezclado en forma líquida. La catalasa fue incluida en todas las variantes de los medios liofilizados debido a que es agregada junto a los otros componentes del medio.

En total se evaluaron 10 tipos de medios de cultivo: 06 medios basados en los medios mezclados y 04 medios basados en los medios liofilizados (Figura 1 y 2).

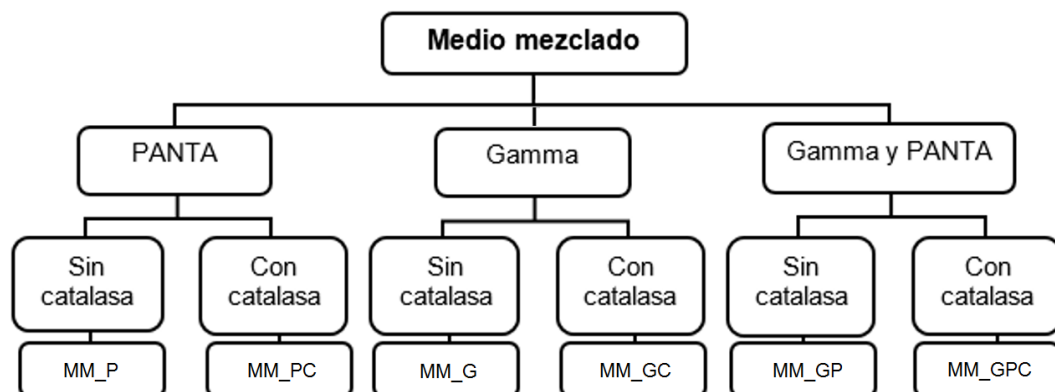


Figura 1. Flujograma de las evaluaciones del medio mezclado con la catalasa, PANTA y radiación gamma con los aislados de MTB. Gamma=Radiación gamma.

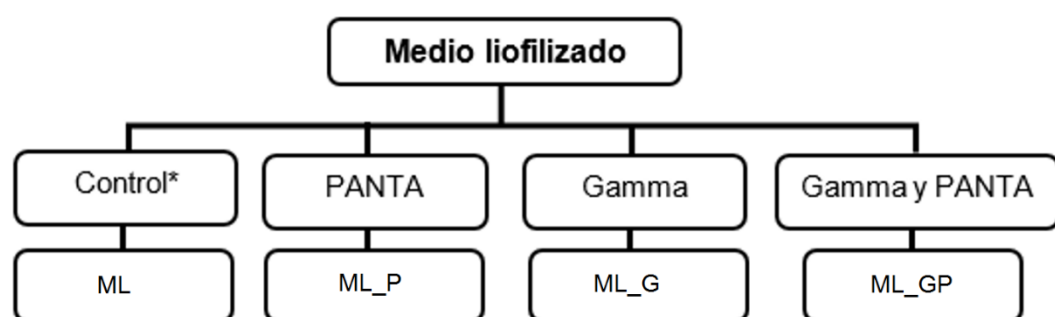


Figura 2. Flujograma de las evaluaciones del medio liofilizado con PANTA y radiación gamma con los aislados de MTB. Gamma =Radiación gamma. Control*=evaluación del medio liofilizado sin PANTA ni radiación gamma.

Segunda fase. En esta fase se evaluaron los medios que contenían PANTA con o sin catalasa debido a que el MODS requiere PANTA, mientras que la catalasa promueve el crecimiento de MTB.

Los medios seleccionados fueron: El medio mezclado con PANTA (MM_P), el medio mezclado con PANTA y catalasa (MM_PC), el medio mezclado con radiación gamma (MM_GC), el medio mezclado con radiación gamma y PANTA (MM_GPC) y el medio liofilizado con PANTA (ML_P), a excepción del medio liofilizado con radiación gamma y PANTA (ML_GP) por mostrar porcentajes de crecimiento de microcolonias de MTB muy bajos (10%-30%). Los medios de

cultivo fueron evaluados con muestras de esputo con baciloscopia positiva obtenidos de la DIRESA Callao. En la segunda fase la catalasa fue agregada en polvo con el fin de evitar el uso de reactivos líquidos.

5.1. Muestras biológicas

- **Cepa:** En la primera fase se usó la cepa multidrogo-resistente de MTB DM97. La cepa DM97 es usada como control en los ensayos del Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular-LID de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.
- **Espuito:** En la segunda fase se utilizó 26 remanentes de esputo con resultados de baciloscopia positiva. Los datos de los pacientes no fueron registrados.

Cálculo del tamaño de muestra en Stata. El cálculo del tamaño de muestra se realizó asumiendo que el porcentaje de crecimiento es una variable continua. Con un número de muestra de 26, permite detectar un incremento en la media del porcentaje de crecimiento del 20%, con respecto al grupo control (100%) el cual utiliza el medio 7H9-OADC. La detección de este incremento en el porcentaje de crecimiento se podrá realizar con un nivel de significancia del 5% y un poder estadístico del 80%.

5.2. Preparación del medio de cultivo 7H9-OADC y los medios de cultivo alternativos mezclado y liofilizado

Los medios de cultivo 7H9-OADC, mezclado y liofilizado fueron preparados en base al medio Middlebrook 7H9 enriquecido con casitona, glicerol y 10% de OADC. El OADC casero (preparado en el laboratorio) fue incluido en el medio

7H9-OADC y los medios liofilizados. El OADC sin ácido oleico (ADC) fue incluido en los medios mezclados.

Los reactivos fueron pesados de acuerdo a la cantidad utilizada para la prueba MODS convencional mencionado en la Guía del Usuario-MODS (37) (Tabla 1). La presentación de los medios de cultivo alternativos fue en viales de vidrio de 30 mL con una mezcla de reactivos preparados para un volumen final de 25 mL.

- **Medio 7H9-OADC (Conv.).** El medio de cultivo líquido 7H9-OADC fue preparado como indica la guía de usuario de la prueba MODS (37) (Anexo 3). Los reactivos fueron pesados para un volumen de 1 L. 5.9 g de caldo base Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson) fue disuelto en 900 mL de agua destilada retirándole previamente 3.1 mL y se repuso el volumen con 3.1 mL de Glicerol (Merck), y 1.25 g de Bacto™ Casitone (Becton Dickinson) en constante agitación. La mezcla fue esterilizada en una autoclave por 15 min a 121°C, luego se dejó enfriar. Se alicuotó 5 mL en 2 tubos estériles e incubó a 37°C durante 24 horas para verificar su esterilidad. Los medios fueron almacenados de 2-8°C por el periodo de hasta un mes. Antes de su uso fue enriquecido con 10% de OADC casero.
- **Medio mezclado (MM).** fue preparado pesando y combinando los reactivos en polvo usados para el medio 7H9-OADC (Conv.) para un volumen de 25 mL (Tabla 1).

En la primera fase, el medio fue reconstituido con 25 mL de agua destilada, al cual se le retiró el volumen correspondiente a la cantidad agregada de glicerol (387,5 µL de glicerol estéril al 20%) y 10 µL de catalasa (SIGMA)

al 0.75 mg/mL. La catalasa fue diluida en agua destilada y esterilizada utilizando filtro de jeringa de 0.22 μm . El preparado se dispensó en alícuotas de 50 μl y se mantuvieron en congelación (-20°C). En la segunda fase el medio deshidratado contenía lo mismo que en la primera fase con la excepción que la catalasa fue agregada en forma de polvo (100 μg) (para facilitar su manejo) por lo que el medio fue reconstituido con agua destilada estéril y glicerol.

Los medios mezclados se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su uso (no mayor a 24 horas). Los medios mezclados con radiación gamma fueron expuestos a temperatura ambiente por un periodo de 15 días aproximadamente debido al tiempo total de traslado de ida, vuelta y el proceso de irradiación por el IPEN, seguidamente fueron almacenados $2-8^{\circ}\text{C}$ hasta su uso y por el periodo no mayor de 1 mes.

Cabe resaltar que el medio MM_P no es esterilizado.

Medio liofilizado (ML). El medio de cultivo liofilizado fue preparado de manera 7H9-OADC con total esterilidad, el cual incluye la preparación del medio líquido 7H9-OADC estéril, liofilizado posteriormente.

Se realizó la preparación del medio 7H9-OADC pesando los componentes para un volumen final de 900 mL, pero se reconstituyó con 450 mL, la mezcla fue esterilizada en una autoclave por 15 min a 121°C , luego se incubó a 37°C durante 24 horas, se realizaron alícuotas de 11.25mL de medio y se agregó 2.5 mL de OADC casero en cada vial. Los viales fueron congelados a -70°C en una ultra congeladora durante 24 horas y luego fueron liofilizadas de acuerdo al proveedor de la liofilizadora

(LYPH.LOCK 12) con capacidad de 12 viales de 30 mL, a una temperatura de -46°C y una presión entre 50-70 (10)-3 MBAR para la sublimación del hielo a presión reducida.

Los medios liofilizados fueron almacenados de 2-8°C hasta su uso y por el periodo de hasta un mes. Los medios liofilizados con radiación gamma fueron expuestos a temperatura ambiente por un periodo de 15 días aproximadamente por el servicio de irradiación del IPEN, seguidamente fueron almacenados 2-8°C hasta su uso y por el periodo no mayor de 1 mes.

- **OADC casero.** 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 en 500 mL de agua destilada estéril, todo esterilizado por filtración con membranas primero de 0,44 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.

Reactivo	7H9-OADC	Mezclado	Liofilizado
Caldo Middelbrook 7H9	5.9 g/L	5.9 g/L	5.9 g/L
Bacto™ Casitone	1.25 g/L	1.25 g/L	1.25 g/L
Glicerol	0.31%	0.31%	0.31%
-Cloruro de Sodio*	0.85 g/L	0.85 g/L	0.85 g/L
-Albumina de suero bovino*	5 g/L	5 g/L	5 g/L
-D-glucosa*	2 g/L	2 g/L	2 g/L
-Catalasa *	0.003g/L	0.003g/L	0.003g/L
-Ácido oléico*	0.006%	-	0.006%
Volumen final	1 L	0.025 L	0.025 L

*Tabla 1. Concentración final por tipo de medio de cultivo, para un volumen final de 1L para el medio 7H9-OADC y de 0.025L para los medios mezclados y liofilizados. * Forman parte del OADC.*

5.3. Tratamiento con PANTA y radiación gamma de los medios de cultivo alternativos liofilizado y mezclado

El volumen de los medios mezclados y liofilizados de cada vial fueron divididos en cantidades iguales para ser evaluados en:

Medios con PANTA. El PANTA fue evaluado con la concentración indicada en el protocolo de la Guía de Usuario MODS (37). Al medio 7H9-OADC se agregó 20 µL de PANTA por cada 1 mL de medio de cultivo y a los medios reconstituidos con 25 mL de agua destilada estéril se les agregó 0.5 mL de PANTA.

Medios con radiación gamma. Los viales con los medios de cultivo alternativos fueron irradiados con radiación gamma en el Instituto de Peruano de Energía Nuclear (IPEN) con 5 KGy, dosis establecida por el sistema de Dosimetría Estándar de Referencia ASTM 1026 (Fricke) para la esterilización de alimentos, con el fin de no comprometer la composición, textura, apariencia y calidad (36). La irradiación fue realizada usando un Irradiador tipo 1, marca Gammacell 220 Excel, modelo: C-198, serie: GS-401, radiación gamma de Co-60 y condiciones ambientales: 19°C; 968hPa dentro de un cilindro cerrado de 20,47 cm de altura y 15,49 cm de diámetro, por un tiempo de 220 min. Para la medición de la dosis utilizaron el sistema dosimétrico de espectrometría por resonancia paramagnética electrónica (EPR por sus siglas en inglés) – Alanina, en la actualidad es el sistema más exacto y preciso las dosis que reportan son trazables a Laboratorios primarios mundiales como el Laboratorio Nacional de Física (NPL por sus siglas en inglés)

que es el Instituto Nacional de Metrología del Reino Unido e Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos.

EPR – Alanina sirve para la medición de la dosis absorbida. (NORMA TÉCNICA PERUANA NTP-ISO/ASTM 51607 2017 “Práctica para el uso del sistema dosimétrico alanina – EPR”). Realizaron la curva de calibración irradiando los dosímetros de Alanina en el punto central del cilindro o cámara de irradiación dentro del rango de dosis establecidos para el dosímetro. (dosis en kiloGray = kGy y las tasas de dosis kGy/h). la data fue incorporada al software del equipo de medición EPR.

Los medios irradiados fueron reconstituidos, se dispensó 5 ml de cada medio en tubos de vidrio de 15 ml, se incubaron a 37°C. Todos mostraron esterilidad al término de 7 días.

5.4. Evaluación del crecimiento de la cepa DM97 de MTB en el medio 7H9-OADC y los medios de cultivo alternativos

Cultivo de la cepa de MTB. La concentración de la cepa de MTB DM97 fue ajustada a 6×10^8 ufc/ml correspondiente a la escala de McFarland 1 de acuerdo a la Guía del Usuario MODS. Luego la cepa fue diluida en 1:1000, 1:5000, 1:10000 y 1:50000 en los medios correspondientes mezclados y liofilizados (Figura 1 y 2). La cepa con concentración 6×10^8 ufc/ml se mantuvo sellada, protegida con aluminio y refrigerada entre 2 y 8°C para ser empleada por un plazo no mayor de 15 días.

Dos alícuotas de 1 mL de cada dilución se sembraron en placas de 24 pozos y se incubaron a 37°C. El crecimiento de MTB fue observado diariamente a través de un

microscopio de luz invertida AE2000 TRI -Motic con aumentos de 40X o de 100X según sea el tipo de determinación de crecimiento. La presencia de contaminación fue verificada a las 24 horas y la detección del crecimiento fue verificado en forma interdiaria desde el día 4.

Determinación del crecimiento. La determinación del crecimiento de MTB se realizó en forma semi-cuantitativa y cuantitativa de acuerdo a lo siguiente:

- **Número de microcolonias de MTB (cuantitativo)** 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.
- **Porcentaje de crecimiento (semi-cuantitativo)** fue determinado con respecto al crecimiento en el medio 7H9-OADC usado como medio control. El medio 7H9-OADC representó el 100% de crecimiento. Los resultados fueron registrados los días 9 (diluciones: 1:1000, 1:5000 y 1:10000 (no se considera la dilución 1:50000, ya que cuenta con registro cuantitativo)) y 14 (diluciones: 1:1000, 1:5000, 1:10000 y 1:50000) a través del microscopio invertido con un aumento de 40X (Figura 3).

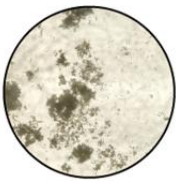
Medio de cultivo convencional		Medio de cultivo alternativo		
100%	90%	50%	25%	10%
				

Figure 3. Comparación del crecimiento de MTB en medios de cultivo líquidos mediante evaluación microscópica. El medio de cultivo convencional (7H9-OADC) se consideró como referencia de crecimiento para la evaluación de los diferentes medios de cultivo alternativos. El crecimiento bacteriano se informa como porcentaje de crecimiento. El cultivo microbiológico se realizó mediante una dilución final de 1:1000 de un stock de $3,8 \times 10^8$ UFC/mL de la cepa DM97. Las imágenes corresponden al día 9 de incubación a 37°C.

5.5. Evaluación del crecimiento de MTB en muestras de esputo en los medios de cultivo alternativos seleccionados.

Los medios mezclados con PANTA (MM_P, MM_PC), mezclados con PANTA y radiación gamma (MM_GP, MM_GPC) y el medio liofilizado con PANTA (ML_P) fueron seleccionados para ser evaluados en la segunda fase por ser las variantes de medios alternativos que contenía PANTA con o sin catalasa, a excepción del medio liofilizado con radiación gamma y PANTA (ML_GP) por mostrar porcentajes de crecimiento de microcolonias de MTB muy bajos (10%-30%).

Preparación de medios de cultivo

- **Medio 7H9-OADC:** 2 mL de medio 7H9-OADC fue transferido a un tubo al cual se le agregó 40 µL de PANTA.
- **Medios de cultivo alternativos:** Los medios fueron reconstituidos de acuerdo a las tablas 1 y 2 y con alícuotas de 2 mL con 40 µL de PANTA.

Descontaminación y cultivo de las muestras de esputo. Las muestras de esputo son descontaminadas empleando el método estándar N-acetil-L-cisteína-NaOH-citrato de sodio (45). Se usó 2 mL de muestra y 2 mL de solución DECO (NaOH-citrato de sodio, NALC, 0.15g NALC/30mL), fueron homogenizados e incubados

a temperatura ambiente por 15 minutos como se indica en la Guía de Usuario MODS. Luego, se agregó 10 mL de buffer fosfato salino (PBS) y centrifugó a 3000 rpm por 15 min a 17°C. El sobrenadante fue eliminado y el sedimento fue resuspendido con 3 mL de PBS. 1 mL de la muestra resuspendida fue almacenada (backup) para usarla en caso de contaminación o re-proceso directamente. De los 2 mL de muestra decontaminada se transfirió 0.3 mL a 2 mL de cada medio de cultivo mezclado o liofilizado. Finalmente, los 2 mL de cada medio conteniendo a las muestras fueron distribuidas en 2 pozos (1 mL por pozo) de una placa de 24 pozos. Las placas fueron guardadas en bolsas ziploc e incubadas a 37°C. La presencia de contaminación fue verificada a las 24 horas bajo el microscopio de luz invertida.

A partir del tercer día se realizó la observación de los pozos para registrar el crecimiento de MTB a través determinación de microcolonias de MTB bajo el microscopio invertido con un aumento de 100X. Los pozos fueron registrados en forma diaria hasta determinar la presencia y la cantidad del crecimiento de las microcolonias de MTB.

Siembra de controles: En un tubo con 5 mL de medio 7H9-OADC o medio de cultivo alternativo (liofilizado o mezclado) se añadió 5 µL de cepa control DM97 y cepa sensible comercial de TB H37Rv, de la escala 1 de McFarland y se agregó 1 mL de la mezcla a un pozo de una placa de 24 pozos (por duplicado).

Determinación del crecimiento. La determinación del crecimiento de MTB en todos los medios fue a través de la determinación del porcentaje de crecimiento y del día de positividad de acuerdo a lo siguiente:

- **Día de positividad.** Primer día que se observó las microcolonias de MTB en forma de cordones bajo el microscopio de luz invertido a través del microscopio invertido con un aumento de 100X.
- **Porcentaje de crecimiento (semi-cuantitativo).** El porcentaje de crecimiento en los medios fue determinado con respecto al crecimiento en el medio 7H9-OADC con PANTA (Conv+Pan) el cual representó el 100% de crecimiento. El porcentaje de crecimiento se registró el día de positividad y el día 14 después de su siembra a través del microscopio invertido con un aumento de 40X (Figura 3).

Porcentaje de positividad de los medios. La positividad de los medios de cultivo alternativos seleccionados (MM_P, MM_PC, MM_GP, MM_GPC y ML_P) fue determinada dividiendo el número de positivos en cada medio analizado entre el número total de muestras examinadas multiplicado por cien.

5.6. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando STATA v.16.0 (StataCorp, College Station, TX) considerando un nivel de significancia del 5%. Se evaluó la distribución normal para el número de microcolonias. La diferencia en el número de microcolonias entre variantes de medios de cultivo, se evaluó mediante la prueba ANOVA con corrección de Bonferroni. El porcentaje de crecimiento mediante la prueba de Suma de Rangos de Wilcoxon. Se informó la sensibilidad con IC95% para cada variación de medio de cultivo en comparación con el medio de cultivo estándar MODS.

5.7. Aspectos éticos

El presente estudio fue llevado a cabo como parte del proyecto “Desarrollo de un kit para el diagnóstico rápido de resistencia a pirazinamida y MDR en TB usando la prueba MODS” financiado por el Concytec – Banco Mundial a través de su unidad ejecutora Fondecyt (Contrato N° 157-2018-FONDECYT-BM-IADT-AV).

Las muestras de esputo fueron colectadas de la Dirección Regional de Salud (DIRESA) Callao después de la aprobación del estudio por el Comité de Ética, a través de la “Acta de reunión del Comité de Ética 22-8-19” (Anexo 1). Asimismo, este estudio fue aprobado bajo la categoría exento por el Comité Institucional de Ética en Investigación (CIEI) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia con SIDISI 206111 y constancia de aprobación del Comité de Ética 226 - 01 – 21 (Anexo 2).

6. RESULTADOS

6.1. Primera fase: Evaluación del crecimiento de la cepa DM97 de MTB en el medio 7H9-OADC y los medios de cultivo alternativos.

Los porcentajes de crecimientos obtenidos en las diluciones al día 9 (1:1000, 1:5000 y 1:10000) y al día 14 (1:1000, 1:5000, 1:10000 y 1:50000) fueron similares, por lo que se presentan solamente los resultados de la dilución 1:1000 por ser la dilución realizada en la prueba MODS.

Medio de cultivo		Porcentaje crecimiento [#]	Número de microcolonias [†]
Medio 7H9-OADC	Conv.	~*	78 ± 15
	Conv.+Pan	80 (60 – 90)	64.5 ± 11
Medio mezclado	MM_P	80 (70 -100)	65 ± 19
	MM_PC	100 (90 – 100)	84 ± 12
	MM_G	80 (60 – 90)	69 ± 8
	MM_GC	100 (70 – 100)	94 ± 20
	MM_GP	60 (40 – 70)	49 ± 21
	MM_GPC	80 (60 – 80)	68 ± 16
Medio liofilizado	ML	100 (90 – 110)	84 ± 14
	ML_P	80 (60 – 90)	61.5 ± 9
	ML_G	90 (80 – 100)	71 ± 11
	ML_GP	10 (10 – 30)	14 ± 4

Tabla 2. Crecimiento bacteriano reportado en los medios de cultivo alternativos. El porcentaje de crecimiento y el número de microcolonias se estimaron mediante la comparación de cada variante de los medios alternativos y el medio 7H9-OADC (Conv.)

*Medio MODS convencional 7H9-OADC (Conv.) considerado como referencia. # Se informa la mediana (p50) y el rango mínimo y máximo. †Se informa la mediana (p50) y el rango intercuartílico.

6.1.1. Medio 7H9-OADC

6.1.1.1. Efecto del PANTA

- **Número de microcolonias de MTB.** El PANTA reduce, de 82 microcolonias en el medio 7H9-OADC (Conv.) a 63 microcolonias en el medio 7H9-OADC con PANTA (Conv.+Pan) ($p < 0.05$) (Figura 4A).
- **Porcentaje de crecimiento.**

Día 9 y 14: El PANTA reduce, de 100% el porcentaje de crecimiento en el medio 7H9-OADC a 80% en el medio 7H9-OADC con PANTA (Figura 4B).

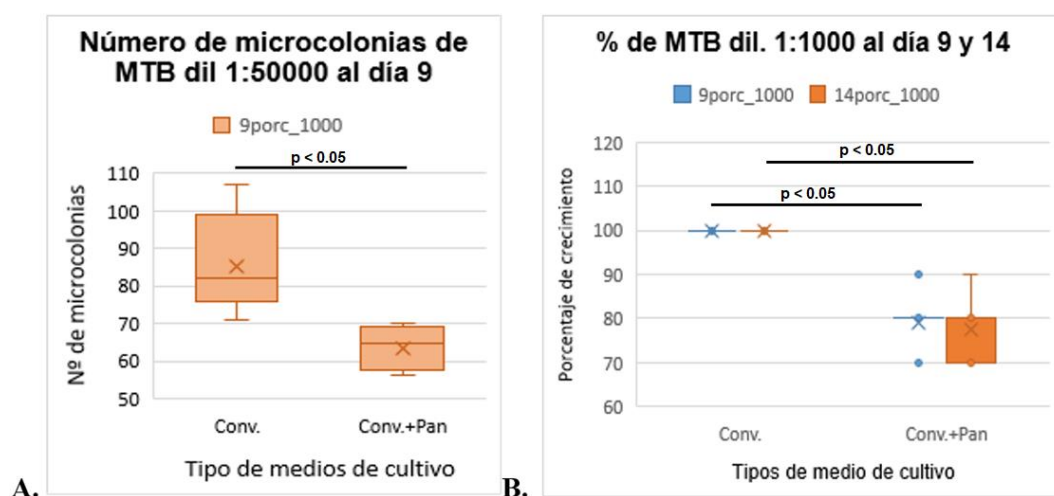


Figura 4. Efecto del PANTA en el crecimiento de la cepa DM97 en el medio 7H9-OADC. **A.** Número de microcolonias en la dilución 1:50000 al día 9. **B.** Porcentaje de crecimiento de microcolonias al día 9 y 14 en la dilución 1:1000. Conv.=Medio 7H9-OADC, Pan=PANTA.

Comparación del medio 7H9-OADC con PANTA (Conv.+Pan) con los medios variantes sin PANTA (MM_G, MM_GC, ML y ML_G).

- **Número de microcolonias de MTB.** El número de microcolonias en el medio 7H9-OADC con PANTA es similar al número de microcolonias en MM_G ($p=1$) pero menor que en MM_GC, ML y ML_G ($p<0.05$) (Figura 5A)

- **Porcentaje de crecimiento.**

Día 9: El porcentaje de crecimiento en el medio 7H9-OADC con PANTA es similar al porcentaje de crecimiento en MM_G ($p=0.15$) pero menor que en MM_GC, ML y ML_G ($p<0.05$) (Figura 5B).

Día 14: El porcentaje de crecimiento en el medio 7H9-OADC con PANTA es menor que el porcentaje de crecimiento en MM_G, MM_GC, ML y ML_G ($p<0.05$) (Figura 5B).

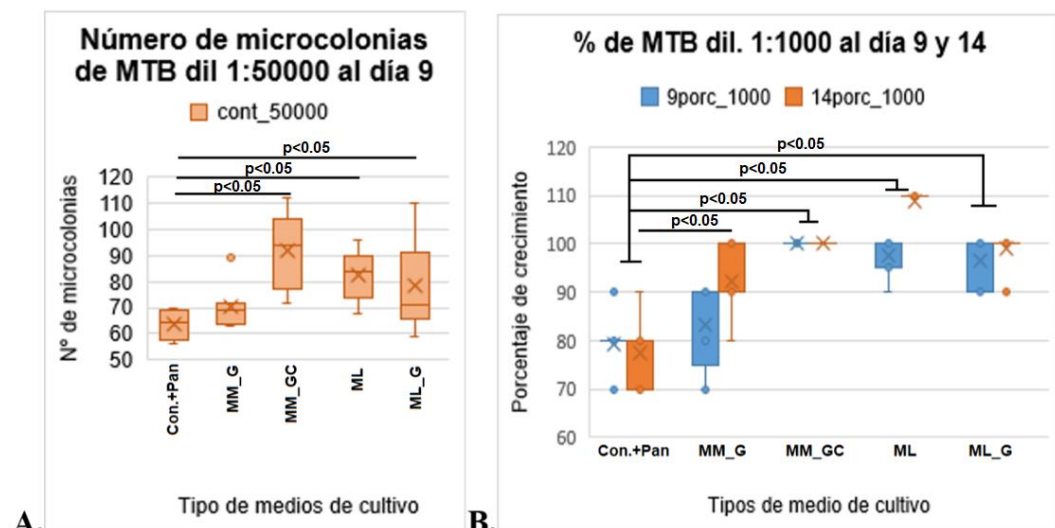


Figura 5. Comparación del crecimiento de la cepa de MTB DM97 entre los medios Conv.+Pan, MM_G, MM_GC, ML y ML_G. **A.** Número de microcolonias al día 9. **B.** Porcentaje de crecimiento de microcolonias al día 9 y 14 en la dilución 1:1000. Conv.=Medio 7H9-OADC I, Pan=PANTA.

Comparación del medio 7H9-OADC con PANTA con los medios variantes con PANTA (MM_P, MM_PC, MM_GP, MM_GPC, ML_P y ML_GP)

- **Número de microcolonias de MTB.** El número de microcolonias en el medio 7H9-OADC con PANTA (Conv.+Pan) es similar al número de microcolonias en MM_P, MM_GP, MM_GPC y ML_P ($p>0.05$), menor que en MM_PC ($p=0.03$) y mayor que en ML_GP ($p<0.05$) (Figura 6A)
- **Porcentaje de crecimiento.**

Día 9: El porcentaje de crecimiento en el medio 7H9-OADC con PANTA es similar al porcentaje de crecimiento en MM_GPC y ML_P ($p>0.05$); menor que en MM_P y MM_PC ($p<0.05$) y mayor que en MM_GP y ML_GP (Figura 6B).

Día 14: El porcentaje de crecimiento en el medio 7H9-OADC con PANTA es similar al porcentaje de crecimiento en MM_GPC ($p>0.05$); menor que en MM_P, MM_PC y ML_P ($p<0.05$) y mayor que en MM_GP y ML_GP (Figura 6B).

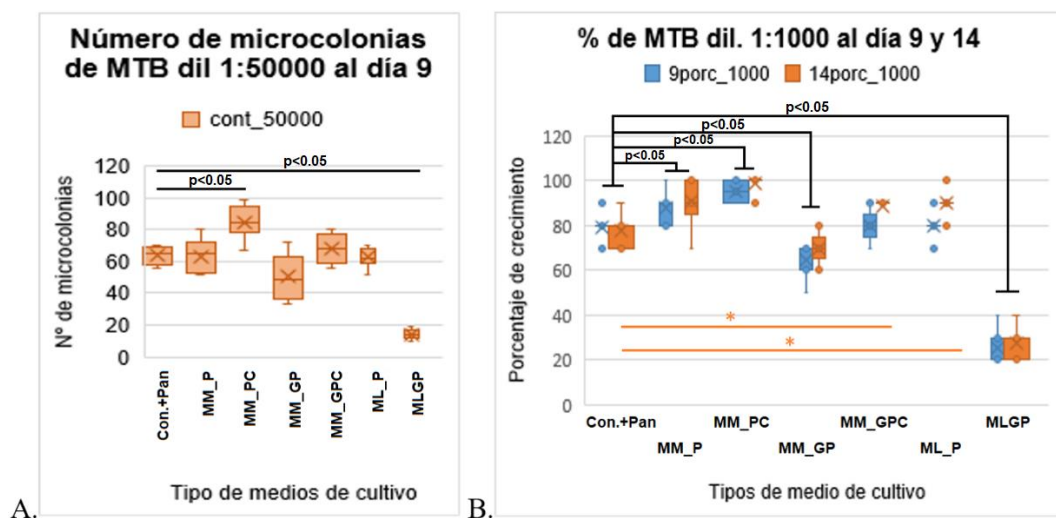


Figura 6. Comparación del crecimiento de la cepa de MTB DM97 entre los medios Conv.+Pan, MM_P, MM_PC, MM_GP, MM_GPC, ML_P y ML_GP **A.** Número de microcolonias (dilución 1:50000) al día 9. **B.** Porcentaje de crecimiento de microcolonias al día 9 y 14 en la dilución 1:1000. Conv.=Medio 7H9-OADC, Pan=PANTA.

6.1.2. Medio mezclado

6.1.2.1. Efecto de la catalasa

Medios con PANTA: Sin catalasa (MM_P) vs. con catalasa (MM_PC)

- **Número de microcolonias de MTB.** La catalasa incrementa el número de microcolonias de 64 colonias en MM_P vs. 84 colonias en MM_PC ($p=0.005$) (Figura 7A)

- **Porcentaje de crecimiento**

Día 9 y 14: La catalasa incrementa el porcentaje de crecimiento de 90% a 95% el día 9 y de 90 a 100% el día 14 (MM_P vs. MM_PC) ($p<0.05$). (Figura 7B).

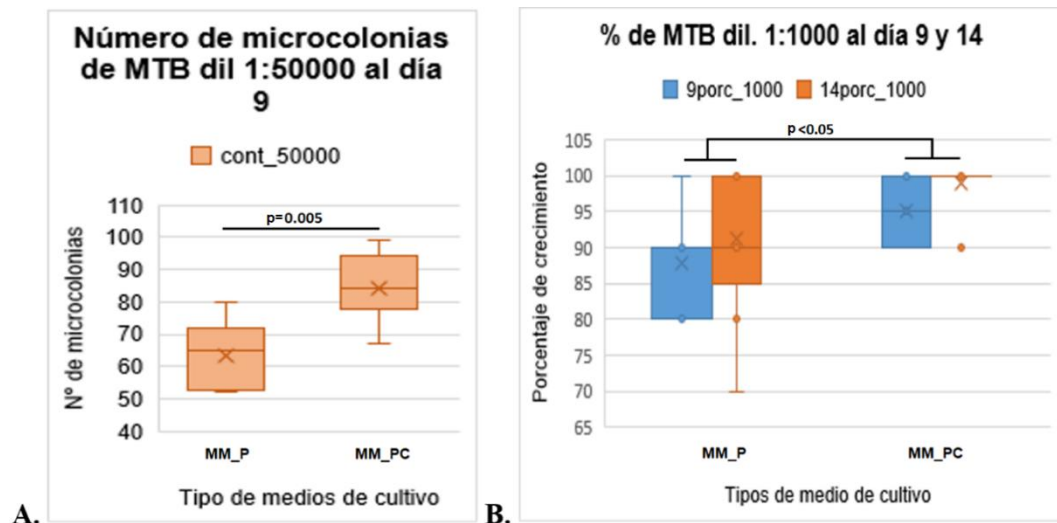


Figura 7. Efecto del PANTA en el crecimiento de la cepa de MTB DM97 en los medios mezclados: MM_P y MM_PC. **A.** Número de microcolonias (dilución 1:50000) al día 9. **B.** Porcentaje de crecimiento de microcolonias al día 9 y 14 en la dilución 1:1000.

Medios con radiación gamma: Sin catalasa (MM_G) vs con catalasa (MM_GC)

- **Número de microcolonias.** La presencia de catalasa incrementa el número de microcolonias de 70 microcolonias en MM_G vs. 92 microcolonias en MM_GC ($p=0.003$) (Figura 8A).
- **Porcentaje de crecimiento.**
Día 9 y 14: La presencia de catalasa incrementa el porcentaje de crecimiento de 80% al 100% el día 9 y de 90% al 100% el día 14 (MM_G vs. MM_GC) ($p<0.05$) (Figura 8B).

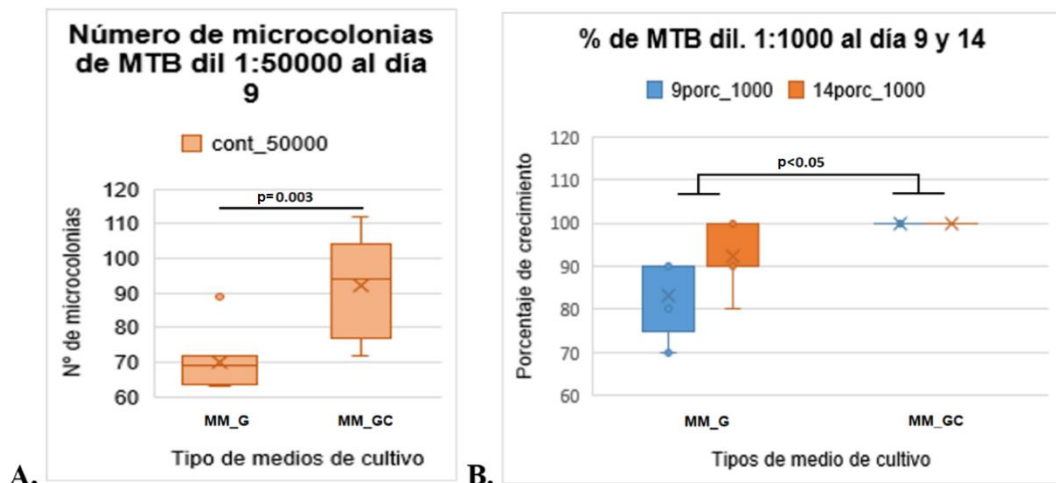


Figura 8. Efecto de la catalasa en el crecimiento de la cepa de MTB DM97 entre los medios mezclados con radiación gamma: MM_G y MM_GC. **A.** Número de microcolonias (dilución 1:50000) al día 9. **B.** Porcentaje de crecimiento de microcolonias al día 9 y 14 en la dilución 1:1000.

Medios con radiación gamma y PANTA: Sin catalasa (MM_GP) vs. con catalasa (MM_GPC)

- **Número de microcolonias de MTB.** La presencia de catalasa incrementa el número de microcolonias. La media de 51 colonias en MM_GP vs. 68 colonias en MM_GPC ($p=0.046$) (Figura 9A)
- **Porcentaje de crecimiento.**

Día 9 y 14: La presencia de catalasa incrementa el porcentaje de crecimiento de 60% a 70% el día 9 y de 70% a 80% el día 14 (MM_GP vs. MM_GPC) ($p<0.05$) (Figura 9B)

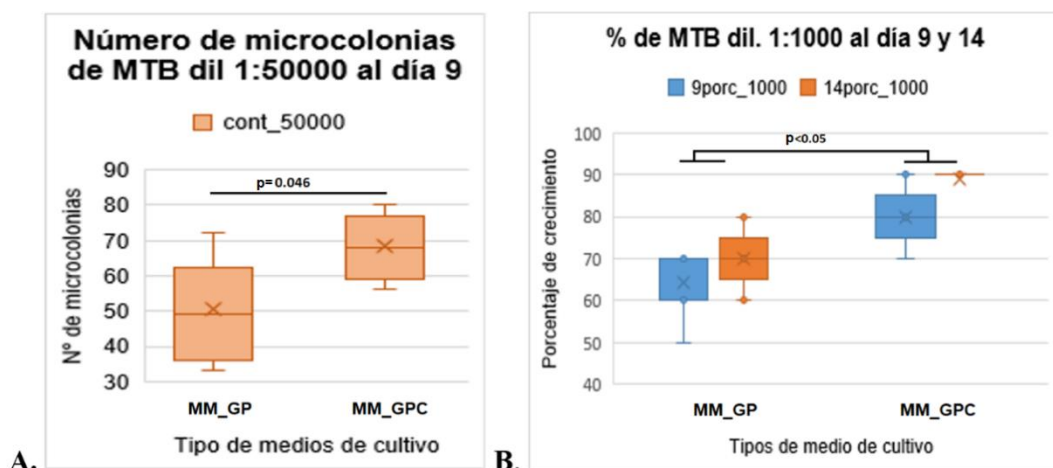


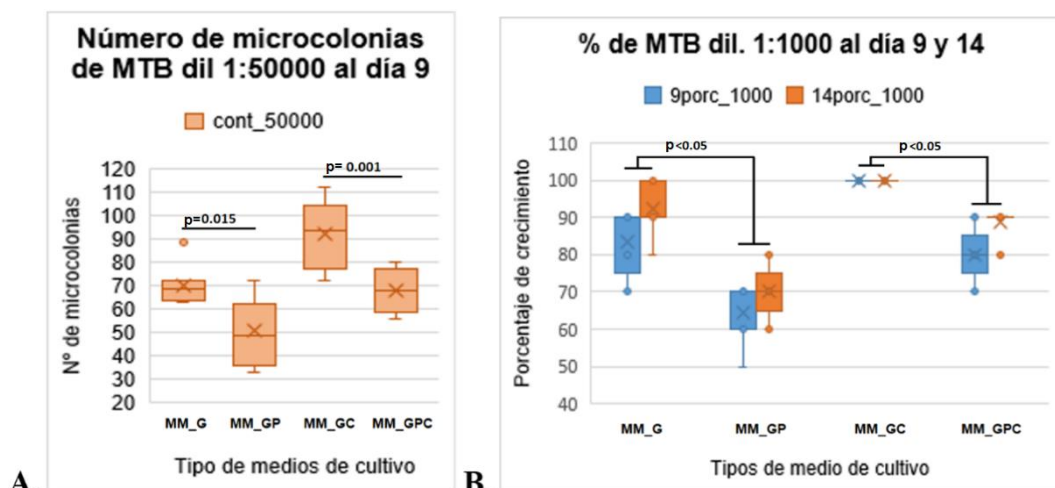
Figura 9. Efecto del PANTA en el crecimiento de la cepa de MTB DM97 entre los medios mezclados con PANTA y radiación gamma: MM_GP y MM_GPC. **A.** Número de microcolonias (dilución 1:50000) al día 9. **B.** Porcentaje de crecimiento de microcolonias al día 9 y 14 en la dilución 1:1000.

6.1.2.2. Efecto del PANTA

- **Número de microcolonias de MTB.** El PANTA reduce el número de microcolonias en presencia de radiación gamma (MM_G vs. MM_GP, $p=0.015$) y en presencia de radiación gamma y catalasa (MM_GC vs. MM_GPC, $p=0.001$) (Figura 10A)

- **Porcentaje de crecimiento.**

Día 9 y 14: El PANTA reduce el porcentaje de crecimiento en presencia de radiación gamma (MM_G vs. MM_GP, $p<0.05$), y en presencia de radiación gamma y catalasa en un promedio de 20% en todas las comparaciones (MM_GC vs. MM_GPC, $p<0.05$) (Figura 10B).



A. *Figura 10. Crecimiento de la cepa de MTB DM97 en los medios mezclados MM_G vs MM_GP, MM_GC vs MM_GPC. A. Número de microcolonias (dilución 1:50000) al día 9. B. Porcentaje de crecimiento de microcolonias al día 9 y 14 en la dilución 1:1000.*

6.1.2.3. Efecto de la radiación gamma

- **Número de microcolonias de MTB.** La radiación gamma no afecta el número de microcolonias en presencia de PANTA (MM_P vs. MM_GP, $p=0.615$) y en presencia de PANTA con catalasa (MM_PC vs. MM_GPC, $p=0.097$) (Figura 11A).
- **Porcentaje de crecimiento**
Día 9 y 14: La radiación gamma reduce el porcentaje de crecimiento en presencia de PANTA (MM_P vs. MM_GP, $p<0.05$) y en presencia de PANTA y catalasa MM_PC vs. MM_GPC ($p<0.05$) al día 9 y 14 (Figura 11B).

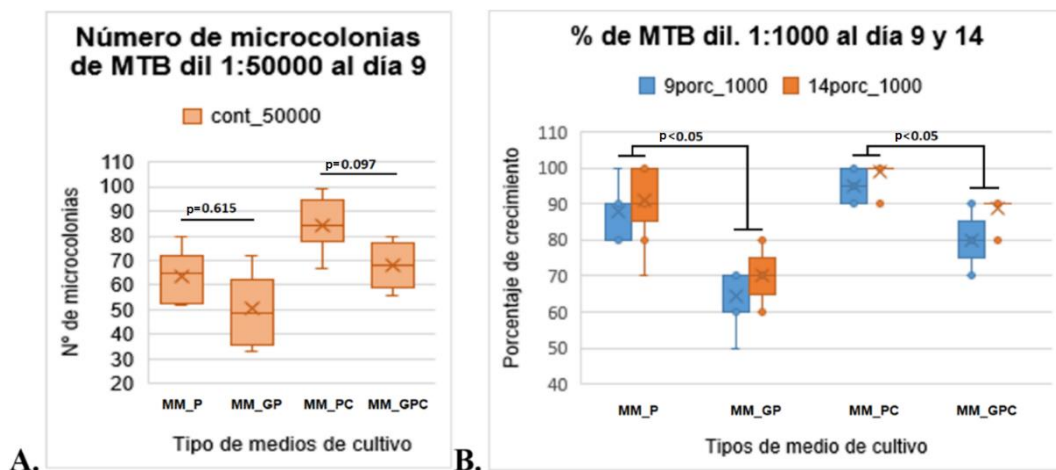


Figura 11. Crecimiento de la cepa de MTB DM97 entre los medios mezclados: MM_P, MM_GP, MM_PC y MM_GPC. **A.** Número de microcolonias (dilución 1:50000) al día 9. **B.** Porcentaje de crecimiento de microcolonias al día 9 y 14 en la dilución 1:1000.

6.1.3. Medio liofilizado

6.1.3.1. Efecto del PANTA y de la radiación gamma

- **Número de microcolonias de MTB.** El PANTA reduce el número de microcolonias en el medio liofilizado (ML vs. ML_P, $p=0.006$) y en el medio liofilizado con radiación gamma (ML_G vs. ML_GP, $p<0.05$) (Figura 12A).
La radiación gamma no afecta el número de microcolonias (ML vs. ML_G, $p=1$); sin embargo, en presencia de PANTA reduce el número de colonias (ML_P vs. ML_GP, $p<0.05$) (Figura 12A).

▪ Porcentaje de crecimiento

Día 9 y 14: El PANTA reduce el porcentaje de crecimiento en el medio liofilizado (ML vs. ML_P, $p<0.05$) y en con radiación gamma (ML_G vs. ML_GP, $p<0.05$) (Figura 12B).

Día 9 y 14: En el día 9, la radiación gamma no afecta el porcentaje de microcolonias (ML vs. ML_G, $p>0.05$); sin embargo, en presencia de PANTA

reduce el porcentaje de microcolonias (ML_P vs. ML_GP, $p<0.05$). En el día 14, la radiación gamma reduce el porcentaje de crecimiento en ausencia de PANTA (ML vs. ML_G, $p=0.001$) y en presencia de PANTA (ML_P vs. ML_GP, $p<0.05$) (Figura 12B).

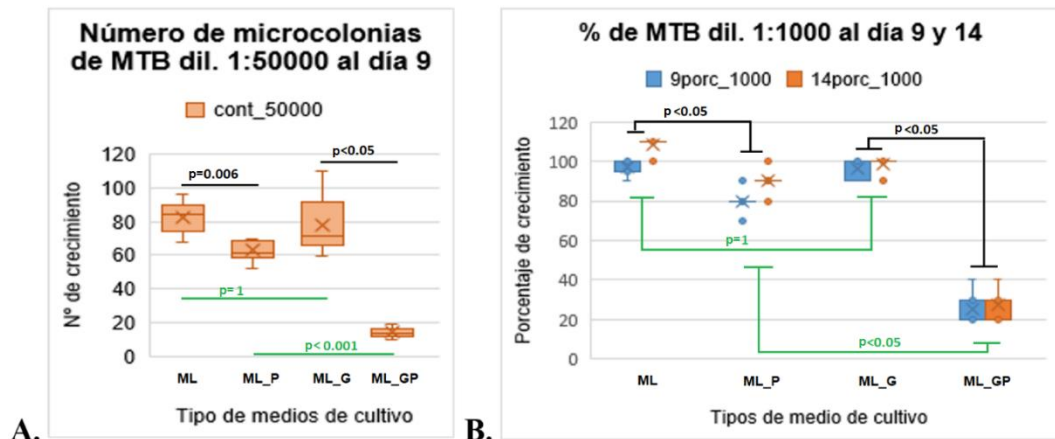


Figura 12. Efecto del PANTA en el crecimiento de la cepa de MTB DM97 en los medios liofilizados: ML, ML_P, ML_G y ML_GP. **A.** Número de microcolonias (dilución 1:50000) al día 9. **B.** Porcentaje de crecimiento de microcolonias al día 9 y 14 en la dilución 1:1000.

6.2. Segunda fase: Evaluación del crecimiento de MTB en muestras de esputo en los medios de cultivo alternativos seleccionados.

Los medios seleccionados para la segunda fase fueron aquellos que contenían PANTA y sus resultados fueron similares o mejores al medio 7H9-OADC con PANTA. Los medios seleccionados fueron: Mezclados (MM_P, MM_PC, MM_GP, MM_GPC) y liofilizados (ML_P).

El medio liofilizado con PANTA y radiación gamma (ML_GP) no fue usado debido a que su crecimiento fue menor con respecto al medio 7H9-OADC (16.5%) y al

medio 7H9-OADC con PANTA (22.2%). **Muestras de esputo.** En el medio MM_PC se observó un total de 8 muestras contaminadas mostrando una contaminación de 30.7%. En los demás medios las 26 muestras mostraron crecimiento.

Porcentaje de crecimiento

Día que fueron positivos (día de crecimiento): El porcentaje de crecimiento en el medio 7H9-OADC con PANTA fue similar al porcentaje de crecimiento en todos los medios ($p > 0.05$); sin embargo, fue mayor que en MM_GP ($p = 0.0424$) (Figura 13).

Día 14. El porcentaje de crecimiento en el medio 7H9-OADC con PANTA fue similar al porcentaje de crecimiento en MM_PC, MM_GPC y ML_P ($p = 1$); sin embargo, fue mayor que en MM_P y MM_GP ($p < 0.05$) (Figura 13).

En la tabla 3 se muestran los valores de p (p -value) de todas las comparaciones del porcentaje de crecimiento mediante el método de Suma de Rangos de Wilcoxon.

Control	Variante del medio	Día de positividad Día 1 p -value	Día 14 p -value
Conv.+Pan	MM_P	0.1553	0.0121
Conv.+Pan	MM_PC	1	1
Conv.+Pan	MM_GP	0.0424	< 0.05
Conv.+Pan	MM_GPC	1	1
Conv.+Pan	ML_P	1	1

Tabla 3. Comparación de los porcentajes de crecimiento entre las variantes de los medios y el medio 7H9-OADC con PANTA (Conv.+Pan) mediante el método de Suma de Rangos de Wilcoxon en el día de positividad y el día 14.

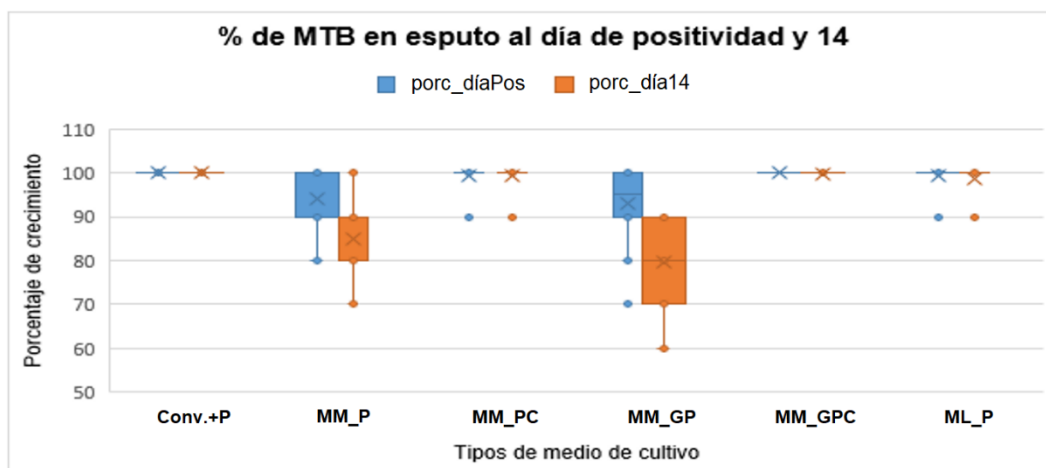


Figura 13. Comparación de porcentajes de crecimiento de MTB en muestras de esputo entre tipos de medios: Conv.+Pan, MM_P, MM_PC, MM_GP, MM_GPC y ML_P al día de positividad y al 14.

6.2.1. Día de positividad

Los días de positividad fueron similares en todos los medios ($p>0.05$) (Figura 14).

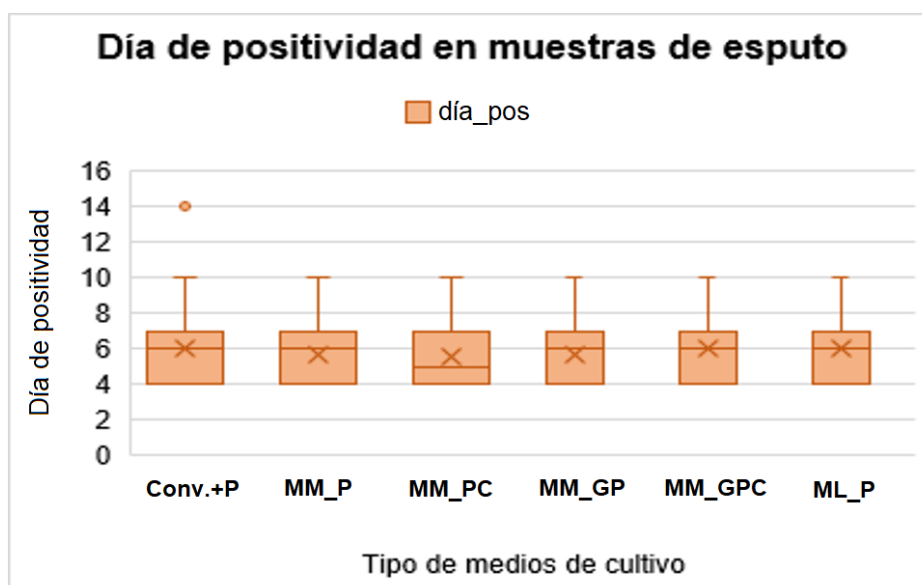


Figura 14. Box plot del día de crecimiento de MTB en muestras de esputo en los medios de cultivo Conv.+Pan, MM_P, MM_PC, MM_GP, MM_GPC y ML_P. Conv.= 7H9-OADC, Pan=PANTA.

6.2.2. Crecimiento de muestras de esputo y contaminación de medios de cultivo

No se observó contaminación en los medios de cultivo mezclados excepto en MM_PC donde 8 muestras mostraron contaminación representando el 31% de las muestras (8/26).

Medio	n/N	Positividad (%)	p-value*
ML_P	26/26	100	1.00
MM_P	26/26	100	1.00
MM_PC	18/18	100	1.00
MM_GP	26/26	100	1.00
MM_GPC	26/26	100	1.00

Tabla 4. Comparación estadística de positividad de MTB

* Los valores de p (p -value) corresponden a la suma de rangos de Wilcoxon en comparación con el medio 7H9-OADC con PANTA (Conv. + Pan).

7. DISCUSIONES

En este trabajo se evaluaron dos alternativas de medios de cultivo para la prueba MODS. Uno es el medio mezclado (MM) y el otro es el medio liofilizado (ML), donde demostramos que en general ambas presentaciones eran similares al medio 7H9-OADC empleado en la prueba MODS (Conv.+Pan). Sin embargo, también fueron evaluadas algunas variaciones en su composición además del efecto de la esterilización por radiación gamma, que influyen tanto en el número de microcolonias y porcentaje de crecimiento de MTB.

Primera fase: Evaluación del crecimiento de la cepa DM97 de MTB en el medio 7H9-OADC y los medios de cultivo alternativos

PANTA. El suplemento antimicrobiano PANTA, cuando es usado en el medio convencional 7H9-OADC en la prueba del MODS reduce el número de microcolonias y el porcentaje de crecimiento de la cepa DM97 de MTB. El PANTA es usado en la prueba MODS para reducir el crecimiento de los microorganismos contaminantes presentes en las muestras de esputo luego de ser descontaminadas. La adición de PANTA se asoció con una reducción de la tasa de crecimiento de aproximadamente un 20%, excepto cuando se le adicionó al medio liofilizado irradiado (ML_GP), donde se redujo un 40% el número de microcolonias y un 60% en el porcentaje de crecimiento de MTB. Por lo tanto, aunque PANTA es importante para descontaminar las muestras de esputo (es decir, inactivar bacterias no tuberculosas), también tiene un efecto directo sobre MTB, afectando parcialmente su crecimiento.

En un estudio realizado por Conville se demostró que el ácido nalidixico, que es uno de los componentes de PANTA, tiene un cierto efecto inhibitorio frente a *Mycobacterium kansasii* (MK) (38). El cual sugiere no usar altas concentraciones de PANTA para evitar la contaminación del medio producidas por las muestras clínicas, ya que compromete directamente la recuperación de MK (38).

Los resultados obtenidos en este trabajo confirman que, aunque PANTA reduce la tasa de crecimiento, la tasa de positividad no cambia significativamente. Se demostró que al duplicar la concentración de PANTA no afectó la positividad del cultivo de MGIT (26). Se demostró que PANTA reduce los porcentajes de contaminación en cultivo MODS (2,2%) en comparación con cultivo LJ (6%) (16), así como en MGIT (26). Estos resultados sugieren que el PANTA debería ser evaluado o estandarizado en cuanto a la concentración ideal que debería usarse en los respectivos medios junto con nuevas mezclas de antimicrobianos y un mayor número de muestras en estudios futuros, en particular en muestras de esputo paucibacilar.

Medio 7H9-OADC con PANTA vs medios de cultivo alternativos con PANTA.

El crecimiento de la cepa DM97 de MTB en el medio 7H9-OADC con PANTA es comparable con el crecimiento en las variantes con PANTA excepto en el medio mezclado con catalasa (MM_PC) donde el crecimiento fue mayor. A pesar que no se ve una diferencia del número de colonias entre el medio 7H9-OADC con PANTA y el medio mezclado con PANTA sin catalasa (MM_P) si se pudo observar mayor porcentaje de crecimiento en MM_P. Estas diferencias podrían deberse a que MM_P y MM_PC son medios utilizados dentro de las 24 horas después de su

preparación, factor que puede influir en la conservación de cada componente del medio y no fueron esterilizados por autoclave ni por radiación gamma.

En cuanto a las variantes MM_GP y MM_GPC, tienen la misma composición que las variantes MM_P y MM_PC respectivamente, pero expuestos a radiación gamma; además de estar expuestos a temperatura ambiente después de su pesaje y almacenamiento en cada vial, por un periodo de aproximadamente 15 días, debido al servicio de irradiación, factor que pudo influir en el rendimiento del medio, ya que algunos componentes requieren de refrigeración (albúmina de suero bovino, medio Middlebrook 7H9 y Bacto™ Casitone). Así mismo es posible que se hayan generado moléculas que impidan el crecimiento de la cepa de MTB por la combinación entre la liofilización, radiación gamma y PANTA.

Con respecto a los medios liofilizados ML_P y ML_GP; se observó que ML_P presenta similar crecimiento que en medio control mientras que ML_GP presenta un crecimiento menor que en el medio control. La diferencia puede deberse a que ML_P se mantuvo en refrigeración (2-8°C) hasta su uso; mientras que la variante ML_GP se mantuvo a temperatura ambiente al menos 4 días debido a que el servicio de irradiación no permitía el aseguramiento de refrigeración en todo momento. Sin embargo, la variante liofilizada sin PANTA e irradiada (ML_G) muestra crecimiento de la cepa similar al control por lo que el efecto de la disminución del crecimiento en ML_GP no sería la irradiación sino probablemente la interacción entre los productos generados por la liofilización, la irradiación y el PANTA.

Medios mezclados: Efecto de la catalasa. En los medios mezclados, la ausencia de catalasa en las variantes de medios disminuye el número de microcolonias y el

porcentaje de crecimiento de la cepa DM97 de MTB en los medios con PANTA, radiación gamma y con ambos. Esto podría deberse a que la catalasa, una enzima oxidorreductasa, actúa como catalizador de algunas especies reactivas de oxígeno (39) que son producidas continuamente por los seres vivos, como es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) producida por organismos aerobios frente a un estrés natural ocasionando daño e inactivación de proteínas, hasta mutaciones a nivel del ADN (40). A pesar de que MTB tiene mecanismos de defensa frente a producción de H_2O_2 como un mecanismo de defensa (41), el uso de la catalasa en el medio de cultivo ayuda a la transformación del H_2O_2 en agua (H_2O) y oxígeno (O_2) (39) ayudando a MTB tener un mejor desarrollo en el medio. Una concentración de 7 mM y no de 2 mM de H_2O_2 provocó la muerte de *M. smegmatis* (42).

Cabe mencionar, que a pesar que las variantes del medio mezclado con PANTA y sin catalasa (MM_P) y con radiación gamma (MM_GP), el crecimiento de la cepa es similar al crecimiento en el medio 7H9-OADC con PANTA ($p>0.05$). Esta observación es importante debido a que el medio usado para el MODS 7H9-OADC contiene PANTA. Estos resultados mostrarían que la catalasa no sería requerida en la variante de medio mezclado con PANTA.

El ácido oleico no se incluyó porque no es esencial para el crecimiento de MTB (23) (24) (Becton Dickinson and Company, 2015). Confirmamos que, en PM la ausencia de catalasa en las variantes de los medios disminuye el número de microcolonias y el porcentaje de crecimiento de la cepa de MTB ya sea en medios con PANTA, radiación gamma y con ambos; por lo tanto, la catalasa es un componente muy importante que favorece el crecimiento de MTB.

Medios mezclados y liofilizados: Efecto de la radiación gamma. La exposición a radiación gamma podría considerarse una alternativa ideal como medio físico de esterilización (28)(34), ya que este método es adecuado para materiales que no pueden ser expuestos a altos niveles de estrés como son las altas temperaturas y son independientes de factores como la presión y la humedad que podrían alterar los componentes de nuestro medio (36). La esterilización del agar Mac Conkey rehidratado con radiación gamma de 1,5 Mrad que contenía tioglicolato de sodio como radioprotector redujo la contaminación del medio y no interfirió con el crecimiento de microorganismos, por lo que se recomendó su uso en kits para la detección de bacteriuria (46). A pesar de las ventajas que este método de esterilización nos ofrece, pudimos observar que la radiación gamma no afecta en forma significativa el crecimiento de la cepa de MTB en los medios mezclados y liofilizados al día 9 en la mayor dilución (1:50000) a excepción de la variante ML_GP; Además, se observa una reducción significativa en el crecimiento de la cepa de MTB al día 14 en los medios alternativos. Su efecto podría atribuirse a una interacción entre los productos generados por liofilización, irradiación y mezcla de PANTA con los medios, principalmente observado en ML_GP. Algunos estudios sugieren el uso de un radioprotector para minimizar los efectos de la radiación gamma en los componentes de los medios, como en el caso del estudio de Bogokowsky, donde se empleó tioglicolato de sodio como radioprotector de los agares MacConkey y CLED con resultados favorables.

Segunda fase: Evaluación del crecimiento de MTB en muestras de esputo en los medios de cultivo alternativos seleccionados.

Para esta segunda fase se emplearon las variantes de medio de cultivo MM y ML que contenían PANTA (excepto ML_GP) se compararon con el medio 7H9-OADC para la prueba MODS (Conv.+Pan). En todos los medios probados, los días de tiempo de respuesta y positividad para detectar MTB en muestras de esputo fueron similares al medio Conv.+Pan (100%). Sin embargo, aquellos medios sin catalasa (MM_P y MM_GP) tuvieron una positividad ligeramente menor en comparación con el medio Conv.+Pan. Estos resultados van de acuerdo con el porcentaje de crecimiento significativamente más bajo encontrado en MM_P y MM_GM en comparación con Conv.+Pan. Este trabajo muestra que la catalasa tiene un ligero efecto sobre la positividad del cultivo de las muestras de esputo, pero un efecto más importante sobre el porcentaje de crecimiento. La prueba MODS es un método de cultivo cualitativo donde se informa un resultado dicotómico (positivo o negativo). Por tanto, sería necesario realizar más estudios con una población mayor, para confirmar la importancia de la catalasa en el crecimiento de MTB en el medio mezclado.

8. CONCLUSIONES

- El PANTA afecta negativamente y la catalasa afecta positivamente al crecimiento de la cepa de MTB; sin embargo, cuando son usados en los medios mezclados y liofilizados en forma conjunta, los resultados son comparables al medio convencional con PANTA ($p>0.05$), excepto en el medio liofilizado irradiado con PANTA (ML_GP).
- Los medios mezclados con PANTA y catalasa (MM_PC), mezclados irradiados con catalasa y PANTA (MM_GPC) y los medios liofilizados con PANTA (ML_P) presentan un similar porcentaje de crecimiento de MTB en muestras de esputo con respecto al medio convencional con PANTA (Conv.+Pan) ($p=1$).
- El medio mezclado con PANTA (MM_P) presentó un porcentaje de positividad similar al medio convencional con PANTA (100%) y un porcentaje de crecimiento de MTB menor al medio convencional al día 14 ($p=0.01$); sin embargo, es el medio alternativo con la mayor sencillez en su preparación, ya que no requiere ningún proceso de esterilización previo.

9. LIMITACIONES

- En la primera parte del estudio, no fue posible estudiar el efecto negativo de la sinergia entre la liofilización y la radiación gamma en presencia del PANTA y catalasa en el crecimiento de la cepa de MTB.
- El reducido número de muestras de esputo (26) no fue suficiente para encontrar menores diferencias (<20%) en el porcentaje de crecimiento de MTB entre grupos. Probablemente este reducido número de muestras de esputo tampoco haya permitido encontrar diferencias entre el porcentaje de positividad de MTB entre grupos. Se sugiere en próximos estudios calcular primero el tamaño de muestra para evitar su sesgo en el análisis de resultados.

10. RECOMENDACIONES

- Se recomienda evaluar los medios mezclados sin catalasa (MM_P), mezclados e irradiado con gamma y catalasa (MM_GPC) y liofilizado (ML_P) con un mayor número de muestras.
- Se recomienda evaluar la estabilidad en el tiempo y a diferentes temperaturas de los medios mezclados sin catalasa (MM_P), mezclados e irradiado con gamma y catalasa (MM_GPC) y liofilizado (ML_P).
- Se recomienda evaluar el efecto de la sinergia entre la liofilización, radiación gamma y PANTA, a través del análisis metabolómico del medio, debido a que se estarían generando moléculas que impiden el crecimiento de la cepa de MTB.
- Se sugiere en próximos estudios calcular primero el tamaño de muestra para evitar su sesgo en el análisis de resultados y aumentar el poder estadístico para aceptar un 10% de errores como máximo en las mediciones.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO | Global tuberculosis report 2021. WHO. 2021
2. Alarcón V, Alarcón E, Figueroa C, Mendoza-Ticona A. Tuberculosis en el Perú: situación epidemiológica, avances y desafíos para su control. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2017.
3. Tuberculosis en las Américas 2020. Washington, D.C: OPS, 2021.
4. Wingfield T, Tovar M, Huff D, Boccia D, Saunders M, Datta S, et al. Beyond pills and tests: addressing the social determinants of tuberculosis. Clin Med Lond Engl. diciembre de 2016.
5. Dorronsoro I, Torroba L. Microbiología de la tuberculosis. An Sist Sanit Navar. 2007.
6. Norma técnica de salud para el control de la tuberculosis / Ministerio de Salud. Dirección General de Salud de las Personas. Estrategia Sanitaria Nacional de Prevención y Control de la Tuberculosis. Ministerio de Salud Lima, 2006.
7. Soto M, Munayco C, Escalante O, Valencia E, Arica J, Yagui M. Perfil epidemiológico de la tuberculosis extensivamente resistente en el Perú, 2013-2015. Rev Panam Salud Publica, 2020.
8. Jave O, Contreras M, Hernández A. Situación de la tuberculosis multirresistente en Perú. Acta méd. Perú, 2017.
9. Aplicación de la estrategia fin de la TB: aspectos esenciales [Implementing the end TB strategy: the essentials]. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2016.

10. Asencios L, Galarza M, Quispe N, Vásquez L, Leo E, Valencia E, et al. Prueba molecular genotype® MTBDRplus, una alternativa para la detección rápida de tuberculosis multidrogorresistente. 2014.
11. Preguntas frecuentes sobre el método Xpert MTB/RIF. Pan American Health Organization. 2010.
12. Moore D, Evans C, Gilman R, Caviades L, Coronel J, Vivar A, et al. Microscopic-observation drug-susceptibility assay for the diagnosis of TB. N Engl J Med. 2006.
13. Caviades L, Lee T, Gilman R, Sheen P, Spellman E, Lee E, Berg E, Montenegro S. Rapid, Efficient Detection and Drug Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis in Sputum by Microscopic Observation of Broth Cultures The Tuberculosis Working Group in Peru. 2000.
14. Agarwal A, Katoch C, Kumar M, Dhole T, Sharma Y. Evaluation of Microscopic observation drug susceptibility (MODS) assay as a rapid, sensitive and inexpensive test for detection of tuberculosis and multidrug resistant tuberculosis. Med J Armed Forces. India, 2019.
15. Hardy TB MODS (Microscopic Observation Drug Susceptibility Assay) Kit™ Microscopic Observation Drug Susceptibility Assay A standardized and accelerated liquid culture and direct susceptibility testing method for Mycobacterium tuberculosis. Hardy Diagnostics. Germany, 2012.
16. Martin L, Coronel J, Faulx D, Valdez M, Metzler M, Crudder C, et al. A Field Evaluation of the Hardy TB MODS Kit™ for the Rapid Phenotypic Diagnosis of Tuberculosis and Multi-Drug Resistant Tuberculosis. Delogu G, editor. PLoS One. 2014.

17. Compendio normativo sobre prevención y control de la tuberculosis en el Perú. Ministerio de Salud. Dirección General de Intervenciones Estratégicas en Salud Pública. Dirección de Prevención y Control de Tuberculosis. MINSA. Lima, 2017.
18. Ríos J. Situación de Tuberculosis en el Perú y la respuesta del Estado (Plan de Intervención, Plan de Acción). Directora de Prevención y Control de TB-DPCTB DGIESP-MINSA.2017.
19. Jin J, Zhang Y, Fan X, Diao N, Shao L, Wang F, Hu P, Wang S, Weng X, Zhang W. Evaluation of the GenoType® MTBDRplus assay and identification of a rare mutation for improving MDR-TB detection. The international journal of tuberculosis and lung disease. 2012.
20. Noncommercial Culture and Drug-Susceptibility Testing Methods for Screening Patients at Risk for Multidrug-Resistant Tuberculosis: Policy Statement. Geneva: World Health Organization. 2011.
21. BBL™ MGIT™ Mycobacteria Growth Indicator Tube, OADC Enrichment, PANTA™ Antibiotic Mixture. Becton, Dickinson and Company. 2016.
22. Middlebrook G, Cohn M. Bacteriology of tuberculosis: Laboratory methods. Vol 48, No. 7. 1958.
23. 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.
24. Dubos R. Effect of long chain fatty acids on bacterial growth. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1946.

25. BBL™ Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol. Becton, Dickinson and Company. L007467. Rev. 12. 2015.
26. Peres R, Palaci M, Loureiro R, Dietze R, Johnson J, Maciel E. Reduction of contamination of mycobacterial growth indicator tubes using increased PANTA concentration. 2011.
27. Srivastava S, Chapagain M, Gumbo T. Effect of specimen processing, growth supplement, and different metabolic population on Mycobacterium tuberculosis laboratory diagnosis. PLoS One 2020.
28. Singh R, Singh D, Singh A. Radiation sterilization of tissue allografts: A review. Mundo J Radiol. 2016.
29. Spring S. 15 Preservation of Thermophilic Microorganisms. Methods Microbiol. 2006.
30. Chan M, Dutill T, Kramer R. Lyophilization of adjuvanted vaccines: Methods for formulation of a thermostable freeze-dried product. In: Methods in Molecular Biology. 2017.
31. Farkas J. Irradiation as a method for decontaminating food. A review. Int J Food Microbiol. 1998.
32. Gaughran ERL, Morrissey RF. Sterilization of Medical Products, Volume 2. Montréal, 1981.
33. Booth A. Sterilization Of Medical Devices, Buffalo Grove: Interpharm Press, 1998.
34. Snadle T, Raju S. Aplicación de la esterilización mediante radiación gamma para tecnologías desechables de un solo uso en el sector biofarmacéutico. 2012.

35. Vértés A, Nagy S, Klencsár Z. Handbook of Nuclear Chemistry, Volume 3. Kluwer Academic Publishers. Amsterdam, 2003.
36. Vargas J, Vivanco M, Castro E. Sistemas dosimétricos de altas dosis, tasa de dosis y uniformidad de dosis en alimentos y producto médico. Instituto Peruano de Energía Nuclear. Lima, Perú , 2014.
37. Coronel J, Roper M, Caviedes L, Moore D. MODS: A User Guide. Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Peru, 2008.
38. Conville P, Andrews J, Witebsky F. Effect of PANTA on growth of *Mycobacterium kansasii* in BACTEC 12B medium. J Clin Microbiol. 1995
39. Céspedes E, Hernández I, Llópiz N. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: II. Catalasa. Rev Cubana Invest Bioméd.1996.
40. Imlay J. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. Nat Rev Microbiol. 2013.
41. Bhat S, Singh N, Trivedi A, Kansal P, Gupta P, Kumar A. The mechanism of redox sensing in *Mycobacterium tuberculosis*. 2012.
42. Li X, W, J, Jiao H, Hu Y, Mi K. Distinct responses of *mycobacterium smegmatis* to exposure to low and high levels of hydrogen peroxide. 2015.
43. Arnez R, Ayllón LA, Castro R, Lozano D. The MODS Method, an alternative for the diagnostic of tuberculosis and Detection of Multidrug-Resistance Strains. México, 2010.
44. Singh B, Sharma S, Sharma R, Sreenivas, V, Myneedu, V, Kohli M, Sarin S. Diagnostic utility of a line probe assay for multidrug resistant-TB in smear-negative pulmonary tuberculosis. 2017.

45. Moore AD, Mendoza D, Gilman R, Evan CA. Microscopic Observation Drug Susceptibility Assay, a Rapid, Reliable Diagnostic Test for Multidrug-Resistance Tuberculosis Suitable for Use in Resource-Poor Settings.
46. Bogokowsky B, Eisenberg E, Altmann G. Sterilization of MacConkey agar and CLED medium by gamma-radiation. Int J Appl Radiat Isot. 1983

ANEXO 1

ACTA DE REUNION DEL COMITÉ DE ETICA

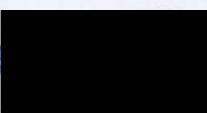
22 -8 - 19

Siendo las tres de la tarde del jueves 22 de agosto del 2019, en la sala de reuniones de la Oficina de Epidemiología de la DIRESA Callao, se reunieron: Edith Castillo Acevedo, César Mori Suarez, Ruth Guillén de Tupia, María Salazar Changanaqui y Humberto Alarcón Decheco, miembros del Comité de Ética para la Investigación de la DIRESA Callao, bajo la Presidencia del Dr. Eduardo Nicoletti Alborno; en calidad de invitado participó Janet Picoy Salgado.

Se procede a evaluar la solicitud de aprobación de los trabajos de investigación “Desarrollo de un Kit para el diagnóstico rápido de resistencia a Pirazinamida y MDR en Tuberculosis usando la prueba MODS” a cargo de Patricia Sheen Cortavarria y “Factores Asociados a la presencia de anemia ferropénica en niños de 6 meses a 1 año en la jurisdicción del Centro de Salud Manuel Bonilla, Callao 2019” a cargo de Estefany Collantes, Raquel Medianero y Geraldine Rivas.

Luego de la exposición y las preguntas respectivas, se resuelve aprobar por unanimidad la aprobación de los trabajos presentados.

Siendo las cuatro y treinta de la tarde se levanta la sesión.

 
Dr. EDUARDO J. NICOLETTI ALBORNOZ
C.M.P. 22518 - RNE 14378
Presidente
Comité de Ética para la Investigación
Dirección Regional de Salud del Callao

 GOBIERNO REGIONAL DEL CALLAO
DIRECCIÓN REGIONAL DE SALUD DEL CALLAO

HUMBERTO OSWALDO ALARCÓN DECHECO
Jefe de la Unidad de Investigación
Oficina Ejecutiva de Gestión de Desarrollo de Recursos Humanos

 GOBIERNO REGIONAL DEL CALLAO
DIRECCIÓN REGIONAL DE SALUD DEL CALLAO
Lc. EDITH CASTILLO ACEVEDO
Responsable Laboratorio Referencial
Regional de Tuberculosis
C.B.P. 6003

 GOBIERNO REGIONAL DEL CALLAO
DIRECCIÓN REGIONAL DE SALUD DEL CALLAO
Unidad Técnica Regional

Dra. RUTH GUILLÉN DE TUPÍA
COORDINADORA
Estrategia Sanitaria Salud Bucal
C.O.P. 4723

ANEXO 2



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

Dirección Universitaria de
**INVESTIGACIÓN, CIENCIA Y
TECNOLOGÍA (DUICT)**

CONSTANCIA 226 - 01 - 21

El Presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación (CIEI) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia hace constar que el proyecto de investigación señalado a continuación fue **APROBADO** por el Comité Institucional de Ética en Investigación, bajo la categoría de revisión **EXENTO**. La aprobación será informada en la sesión más próxima del comité.

Título del Proyecto : "Evaluación de la sensibilidad de variantes del medio de cultivo 7H9-OADC deshidratados listos para usar para el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* como base en la prueba MODS".

Código de inscripción : 206111

Investigador principal : Rodríguez Puma, Joseline.

La aprobación incluyó los documentos finales descritos a continuación:

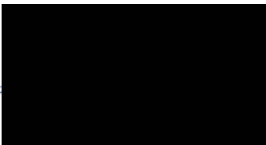
1. **Protocolo de investigación**, versión recibida en fecha 05 de julio del 2021.

La **APROBACIÓN** considera el cumplimiento de los estándares de la Universidad, los lineamientos Científicos y éticos, el balance riesgo/beneficio, la calificación del equipo investigador y la Confidencialidad de los datos, entre otros.

Cualquier enmienda, desviaciones, eventualidad deberá ser reportada de acuerdo a los plazos y normas establecidas. La categoría de **EXENTO** es otorgado al proyecto por un periodo de cinco años en tanto la categoría se mantenga y no existan cambios o desviaciones al protocolo original. El investigador esta exonerado de presentar un reporte del progreso del estudio por el periodo arriba descrito y solo alcanzará un informe final al término de éste. La aprobación tiene vigencia desde la emisión del presente documento hasta el **12 de julio del 2026**.

Si aplica, los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento.

Lima, 13 de julio del 2021.


Dra. Frine Samalvides Cuba
Presidenta
Comité Institucional de Ética en Investigación



ANEXO 3

6.3. Medio líquido Middlebrook 7H9 con casitona y glicerol

(900ml - suficiente para 200 muestras)

- **Componentes**

Caldo base Middlebrook 7H9	5.9 g
Glicerol	3.1ml
Casitona	1.25 g
Agua destilada estéril	900ml

- **Procedimiento**

1. Disolver 5.9g del medio 7H9 en polvo en 900ml de agua destilada estéril conteniendo 3.1ml de glicerol y 1.25g de casitona.
2. Mezclar en constante agitación hasta que esté completamente disuelto (usar pastillas magnéticas en el mezclador si tuviera uno).
3. Esterilizar en la autoclave a 121-124°C por 15 minutos.
4. Enfriar y alicuotar 4.5ml del medio en tubos de vidrio estériles de 16x 100 mm para las muestras y alícuotas de 10.8ml para la preparación de las soluciones de antibióticos y para los controles internos
5. Incubar a 37°C por 48 horas para verificar la esterilidad (que se traduce como ausencia de turbidez)
6. Almacenar el frasco y los tubos con las alícuotas de medio 7H9 con las tapas bien cerradas a 2-8°C por el periodo de un mes.

- **Notas**

Cada muestra de esputo y los controles internos requieren tubos que contengan 4.5ml de medio 7H9.

Cada tubo con 10.8ml de medio 7H9 es suficiente para preparar las soluciones de antibióticos y para los controles internos de 15 muestras de esputo. La cantidad a prepararse (ml) dependerá de las necesidades de cada laboratorio.

Si se almacena en frascos de mayor volumen, se puede repartir el medio de forma estéril el mismo día de proceso de las muestras.

6.4. OADC

Suplemento de enriquecimiento del medio (con ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa): la preparación comercial viene lista para su uso.

6.5. PANTA

Suplemento antimicrobiano usado para minimizar la contaminación de los cultivos de MODS que puede ser causado por la flora oral de microorganismos no eliminados durante el proceso de decontaminación. El frasco de PANTA BBL MGIT contiene una mezcla liofilizada de agentes antimicrobianos.

Reconstituir el contenido liofilizado del frasco PANTA BBL MGIT con 3 ml de agua destilada estéril.

Método MODS – Preparación de las placas

Resumen de los pasos a seguir en el día del procesamiento de las muestras clínicas

En un área limpia (o en la cabina de bioseguridad antes de colocar las muestras), empleando procedimientos estériles:

1. Añadir OADC al medio 7H9 (7H9-OADC).
2. Reconstituir el PANTA y añadirlo a los tubos con 7H9-OADC (7H9-OADC-PANTA).
3. Preparar la solución de trabajo de los antibióticos en la placa de 24 pozos.
4. Dispensar los volúmenes requeridos del stock de NaOH-citrato de Na y buffer fosfato (si se ha almacenado frascos con grandes volúmenes)
5. Pesar la cantidad necesaria de NALC que se va a añadir a la solución NaOH- citrato de Na.

En la cabina de bioseguridad empleada para el proceso de las muestras de TB:

1. Preparar las muestras para la decontaminación y seguir el protocolo de decontaminación.
2. Resuspender el concentrado (sedimento) de las muestras con 7H9-OADC-PANTA.
3. Añadir la solución de trabajo de los antibióticos a los pocillos de la placa de 24 pozos.
4. Seguir el procedimiento para dispensar las muestras en la placa y guardar los alícuotas stocks.
5. Cerrar la placa con su tapa y colocarla en una bolsa tipo ziplock, luego ubicarlo en la incubadora.
6. Dispensar los controles positivos en los pocillos no utilizados de la placa donde se preparó la solución de trabajo de antibióticos. Cerrar la placa y colocarla en una bolsa tipo ziplock, luego ubicarlo en la incubadora a 37°C.
7. Empezar con la lectura de las placas desde el día 5 de su incubación.

Figura 1. Flujograma del ensayo de MODS:

