

# **Evaluación de la Suplementación de en Filtrados de cultivo en medios líquidos muestras de esputo de pacientes con TB con cultivo negativo en Lima Perú.**

**MSc. Nadia Barrera Ponce**

**Mayo 2025**

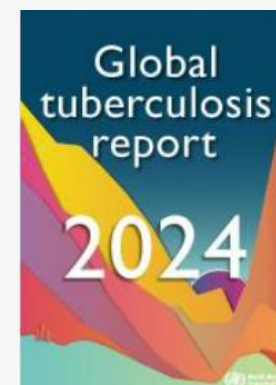
# Introducción



Tuberculosis → *Mycobacterium tuberculosis*  
(Importante en salud pública)



OMS → muerte de 1.25 millones de personas  
alrededor del mundo (2023)



## DPCTB

- alta tasa de incidencia y morbilidad de 89.1 y 96.9 por 100 000 habitantes
- adultos y adultos mayores (90%)
- **Ucayali, Madre de Dios, Loreto, Ica, Lima, Callao.**

# Problemática



## The response of *Mycobacterium tuberculosis* to reactive oxygen and nitrogen species

Martin I. Voskuil<sup>1,2,3\*</sup>, Iona L. Bartek<sup>1</sup>, Kevin Visconti<sup>2,3</sup> and Gary K. Schoolnik<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Department of Microbiology, School of Medicine, University of Colorado Denver, Aurora, CO, USA

<sup>2</sup> Division of Infectious Diseases and Geographic Medicine, Department of Medicine, Stanford Medical School, Stanford, CA, USA

<sup>3</sup> Department of Microbiology and Immunology, Stanford Medical School, Stanford, CA, USA

Mtb → patógeno intracelular exitoso para sobrevivir en medio de diversas tensiones (hipoxia, especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS) y la falta de nutrientes que prevalece en el huésped infectado).



NIH Public Access

Author Manuscript

*FEMS Microbiol Rev.* Author manuscript; available in PMC 2013 May 1.

Published in final edited form as:

*FEMS Microbiol Rev.* 2012 May ; 36(3): 514–532. doi:10.1111/j.1574-6976.2012.00331.x.

## *Mycobacterium tuberculosis*: Success through dormancy

Martin Gengenbacher<sup>1,\*</sup> and Stefan H. E. Kaufmann<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Max Planck Institute for Infection Biology, Department of Immunology C  
Berlin, Germany

Mtb puede establecer un estado de dormancia no replicante y persistir en los tejidos del huésped durante períodos prolongados sin causar enfermedad sintomática.

frontiers  
in Microbiology

ORIGINAL RESEARCH  
published: 23 October 2019  
doi: 10.3389/fmicb.2019.02388

Check for updates

OPEN ACCESS

**Differential Culturability of *Mycobacterium tuberculosis* in Culture-Negative Sputum of Patients With Pulmonary Tuberculosis and in a Simulated Model of Dormancy**

**Edited by:**  
Aleksandra Barac,  
University of Belgrade, Serbia

**Reviewed by:**  
Jann-Yuan Wang,  
National Taiwan University Hospital,  
Taiwan  
Willy Sseengooba,  
Makerere University, Uganda  
Margarita Shleeva,  
A N Bach Institute of Biochemistry  
(RAS), Russia

**Azger Dusthacker<sup>1\*</sup>, Magizhaveni Balasubramanian<sup>1</sup>, Govindarajan Shanmugam<sup>1</sup>, Shanmuga Priya<sup>2</sup>, Christy Rosaline Nirmal<sup>1</sup>, Rajadas Sam Ebenezer<sup>1</sup>, Angayarkanni Balasubramanian<sup>1</sup>, Rajesh Kumar Mondal<sup>1</sup>, Kannan Thiruvankadam<sup>1</sup>, A. K. Hemanth Kumar<sup>1</sup>, Geetha Ramachandran<sup>1</sup> and Selvakumar Subbian<sup>3\*</sup>**

<sup>1</sup> National Institute for Research in Tuberculosis, Chennai, India, <sup>2</sup> National Institute of Epidemiology, Chennai, India, <sup>3</sup> Public Health Research Institute, New Jersey Medical School, Rutgers University, Newark, NJ, United States

Se ha detectado la presencia de una variedad de fenotipos de MTB coexistiendo en una muestra de paciente que determinan la eficiencia del régimen estándar de antibióticos

Mientras que los bacilos que se replican activamente son eliminados rápida y efectivamente mientras que la forma de dormancia de Mtb rara vez es eliminada por el régimen antibiótico actual. La presencia de estos bacilos que son resistentes a la eliminación por antibióticos es una de las razones de la duración prolongada (mínimo de 6 meses) del tratamiento actual.

## Resuscitation-promoting Factors Reveal an Occult Population of Tubercle Bacilli in Sputum

Galina V. Mukamolova<sup>1</sup>, Obolbek Turapov<sup>1</sup>, Joanne Malkin<sup>1,2</sup>, Gerrit Woltmann<sup>3</sup>, and Michael R. Barer<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Infection, Immunity, and Inflammation, University of Leicester; and <sup>2</sup>Department of Microbiology and <sup>3</sup>Department of Respiratory Medicine, University Hospitals of Leicester, Leicester, United Kingdom

El método de diagnóstico común solo detectan poblaciones micobacterianas replicantes.

#SES

[www.sociosensalud.org.pe](http://www.sociosensalud.org.pe)



Necesitamos métodos que nos permitan detectar las poblaciones micobacterianas en estado de dormancia.

Indian J Microbiol (Apr–June 2012) 52(2):114–121  
DOI 10.1007/s12088-011-0202-6

REVIEW ARTICLE

## Resuscitation Promoting Factors: a Family of Microbial Proteins in Survival and Resuscitation of Dormant Mycobacteria

Ravi Kr. Gupta · Ranjana Srivastava

Los factores promotores de resucitación (FPR), un grupo de cinco proteínas (Rpf A–E) secretadas por Mtb virulento en replicación activa en los medios de cultivo, han demostrado reactivar el crecimiento de bacterias dormantes in vitro y en el esputo de pacientes con TB.

Estudios han identificado poblaciones bacterianas en el esputo que no pueden formar colonias en cultivo sólido, pero que pueden crecer en medios líquidos suplementados con FPR.



AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY  
Antimicrobial Agents and Chemotherapy®

CLINICAL THERAPEUTICS



## Characterization of Differentially Detectable *Mycobacterium tuberculosis* in the Sputum of Subjects with Drug-Sensitive or Drug-Resistant Tuberculosis before and after Two Months of Therapy

© Kayvan Zainabadi,<sup>a,b</sup> © Kathleen Frances Walsh,<sup>a,c</sup> Stalz Charles Vilbrun,<sup>d</sup> Laurent Daniel Mathurin,<sup>d</sup> Myung Hee Lee,<sup>a</sup> Kohta Saito,<sup>b</sup> Saurabh Mishra,<sup>b</sup> Oksana Ocheretina,<sup>a</sup> Jean William Pape,<sup>a,d</sup> © Carl Nathan,<sup>b</sup> Daniel W. Fitzgerald<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Center for Global Health, Weill Cornell Medicine, New York, New York, USA

<sup>b</sup>Department of Microbiology & Immunology, Weill Cornell Medicine, New York, New York, USA

<sup>c</sup>Division of General Internal Medicine, Department of Medicine, Weill Cornell Medicine, New York, New York, USA

<sup>d</sup>Les Centres GHESKIO, Port-au-Prince, Haiti

Carl Nathan and Daniel W. Fitzgerald are co-senior authors of this study.




Journal of  
*Clinical Medicine*



Article

## Characterization of Drug-Resistant Lipid-Dependent Differentially Detectable *Mycobacterium tuberculosis*

Su recuperación puede mejorarse con medios ricos en lípidos

Annelies W. Mesman<sup>1</sup>, Seung-Hun Baek<sup>2</sup>, Chuan-Chin Huang<sup>3</sup>, Young-Mi Kim<sup>2</sup>, Sang-Nae Cho<sup>2</sup> , Thomas R. Ioerger<sup>4</sup>, Nadia N. Barreda<sup>5</sup>, Roger Calderon<sup>5</sup>, Christopher M. Sasseti<sup>6</sup> and Megan B. Murray<sup>7,8,\*</sup>

# Objetivos

---

1. Evaluar si los medios suplementados con diferentes fuentes de carbono (+/- CF) pueden mejorar el rendimiento del cultivo estándar de MTB .

## Material Biológico

---

126 muestras de esputos de pacientes dx con tuberculosis con cultivos negativos que tengan resultados de baciloscopia y xpert MTB/RIF Ultra



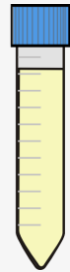
# Metodología

## Producción de Filtrado de cultivos

1. Inoculación de cepa H37Rv en medios "M"



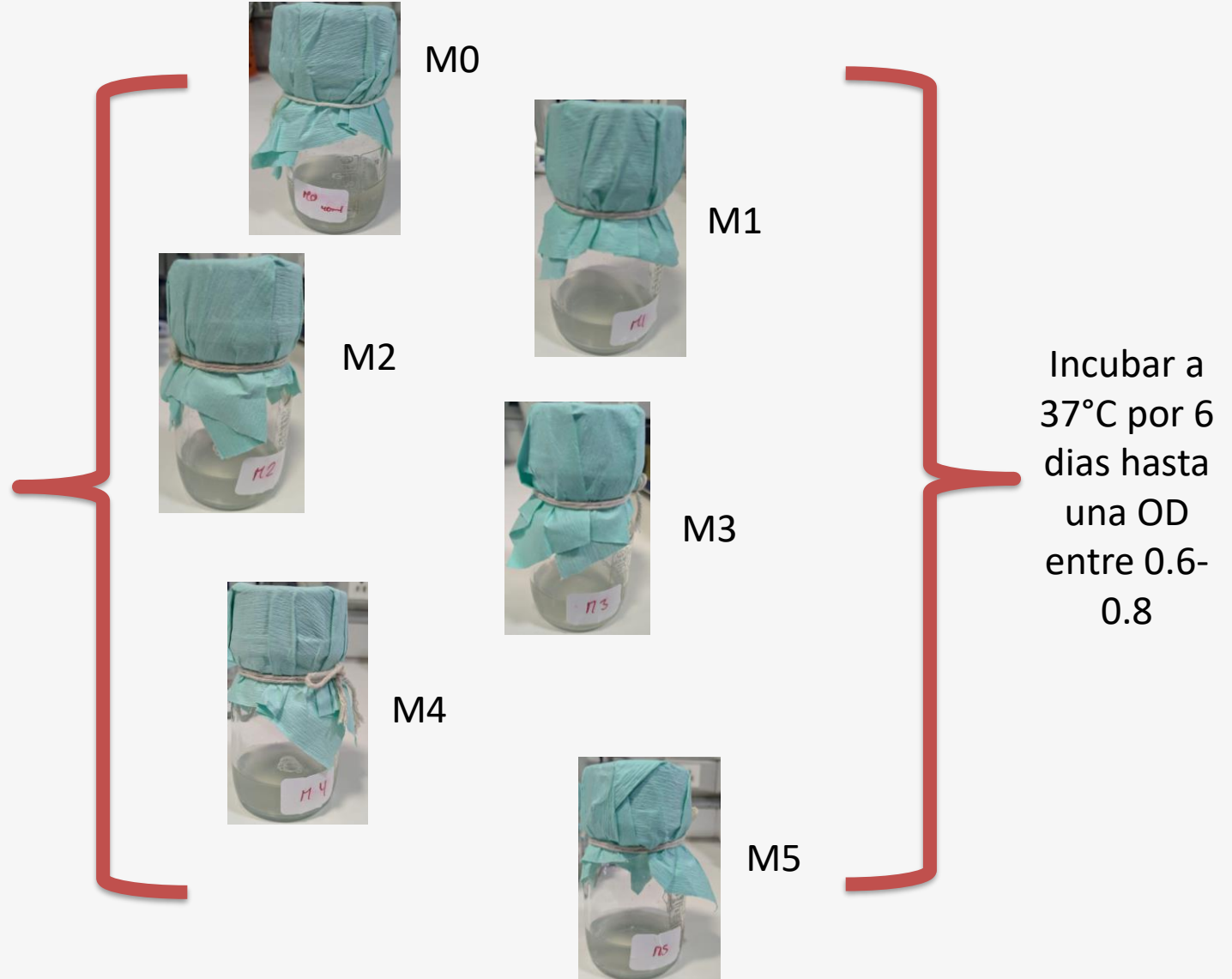
H37Rv



OD 0.63



Inocular  
1.5 mL a  
cada frasco  
con medio  
"M"



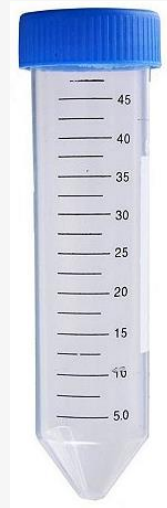
# Metodología

## Producción de Filtrado de cultivos

### 2. Obtención de filtrado de Cultivos



Medios "M"  
con una OD  
entre 0.6-0.8



Trasvasar cada  
medio "M" a  
un tubo falcon



Centrifugar  
5000 rpm/10  
min



Obtener  
sobrenadante

# Metodología

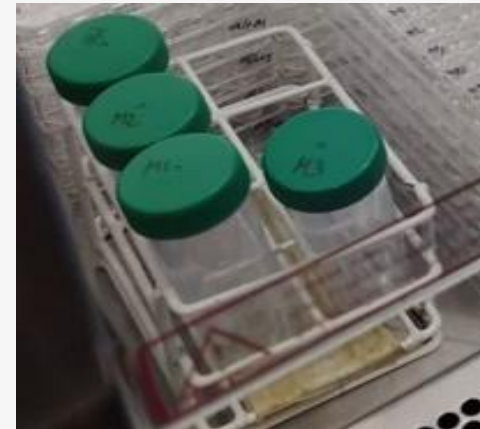
## Producción de Filtrado de cultivos

### 2. Obtención de filtrado de Cultivos

Obtener  
sobrenadante  
por cada  
medio "M"



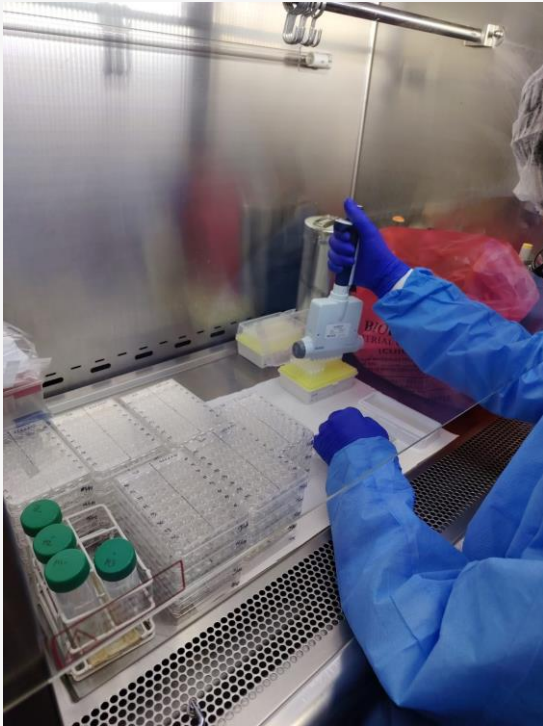
Filtración del  
sobrenadante  
para obtener  
FILTRADO DE  
CULTIVO



FILTRADO DE  
CULTIVO  
M0,M1,M2,M3,  
M4,M5

# Metodología

## Preparación de placas



**M0** 7H9 + Glycerol

**M1** Modified 7H9 + Glycerol

**CC** 7H9 media (Contamination control)

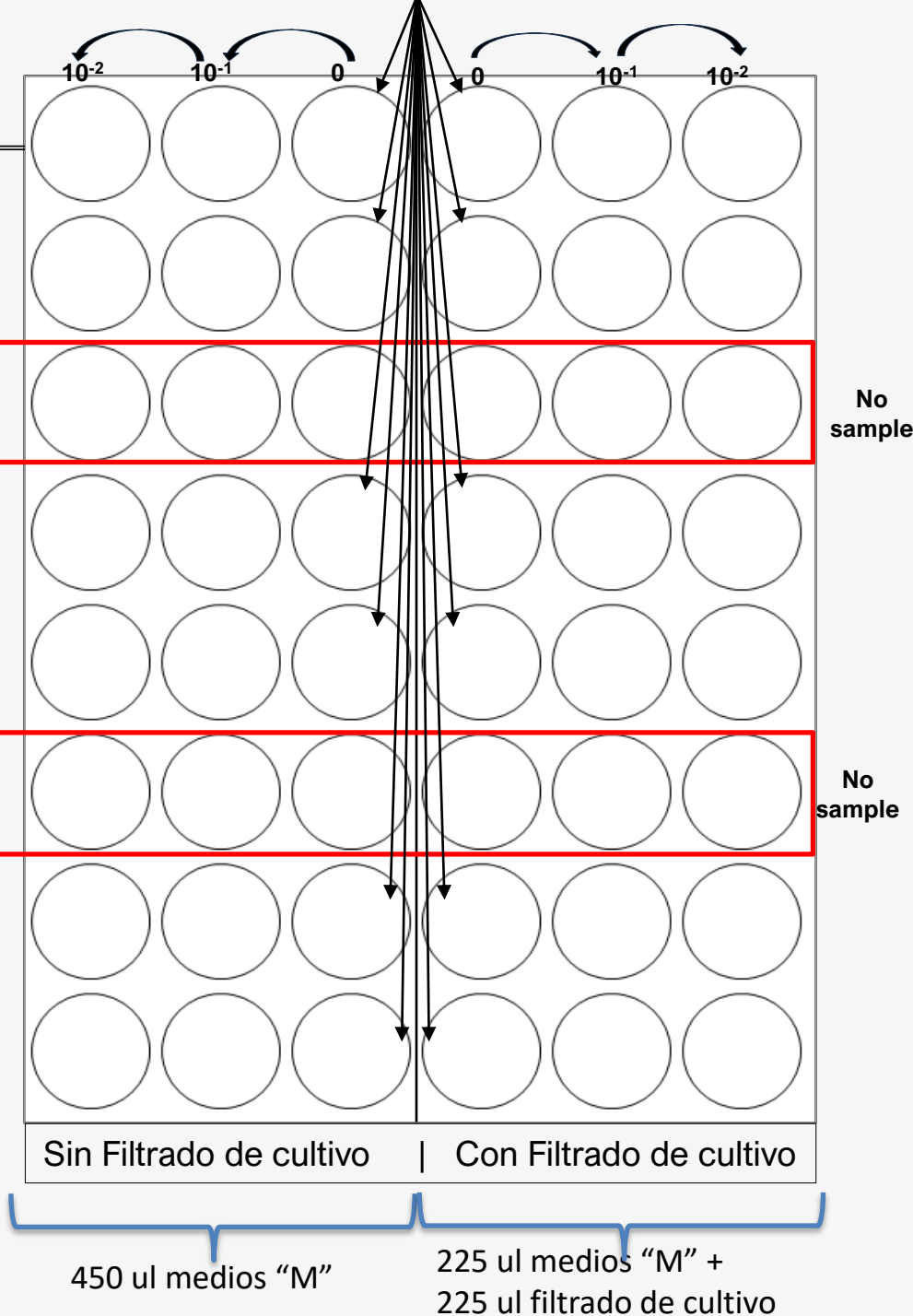
**M2** Modified 7H9 + pyruvate

**M3** Modified 7H9 + coconut oil

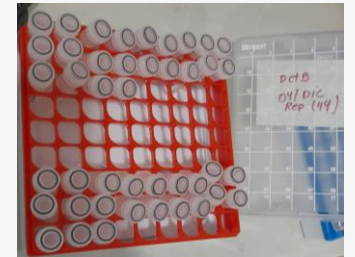
**CC** 7H9 media (Contamination control)

**M4** Modified 7H9 + coconut oil + low glycerol

**M5** Mod 7H9 + coconut oil + low glyc + low pyr



## Proceso de descontaminación de muestras de esputo cultivo negativo



Espustos



Agregar sol.  
descontaminante  
1:1 x 20 min y  
agregar PBS hasta  
50 mL



Centrifugar 3000g  
x 20 min a 4°C

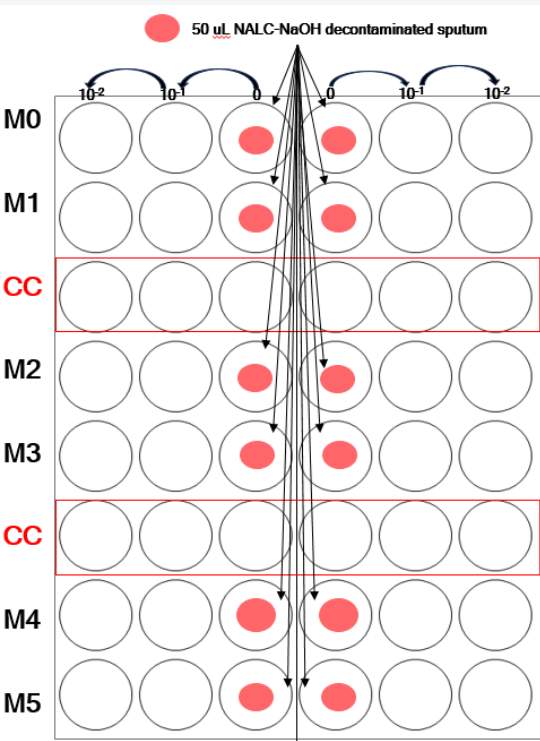


Quitar  
sobrenadante

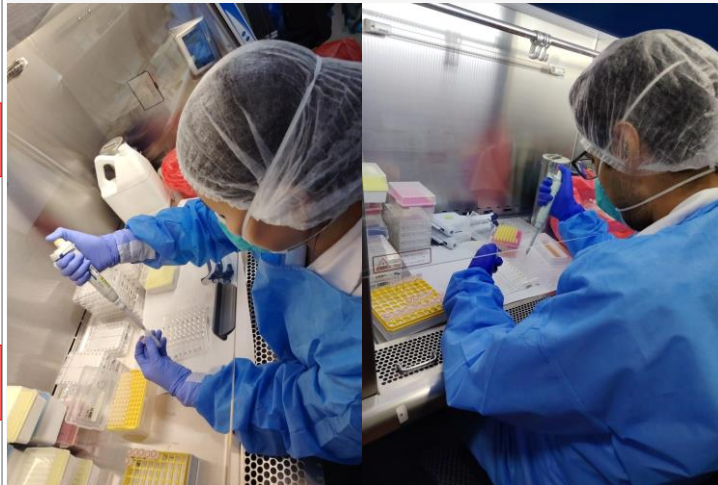


Resuspender  
pellet con 1mL de  
PBS

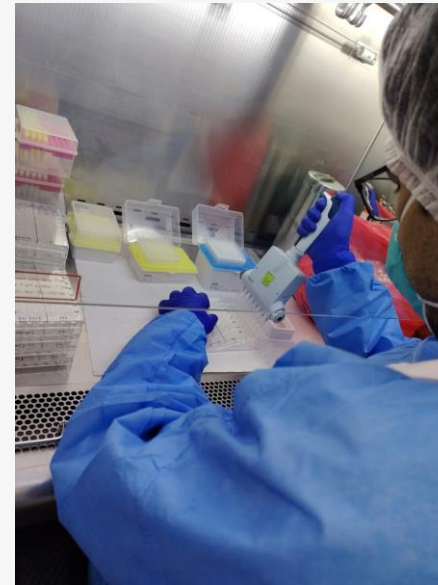
## Inoculación de muestras en placas



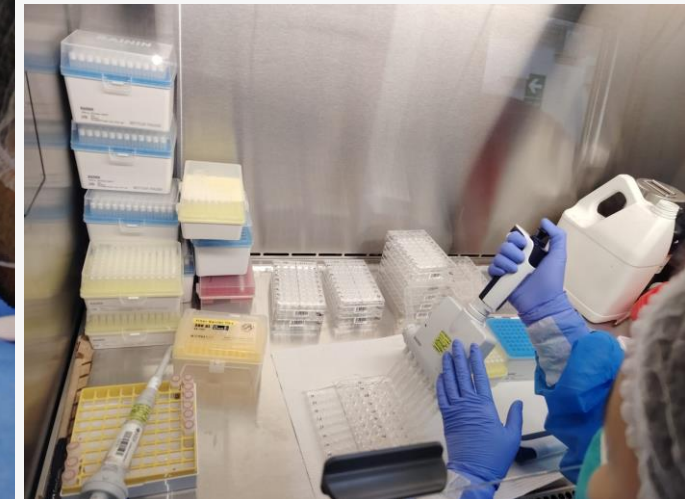
Pellet



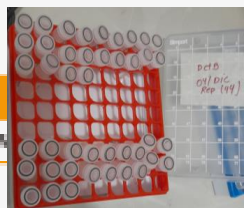
Inocular 50 ul de pellet en columnas "0" de cada medio "M"



Homogenizar y traspasar 50ul a las columnas "-1" y de ahí 50 ul a las columnas "-2"



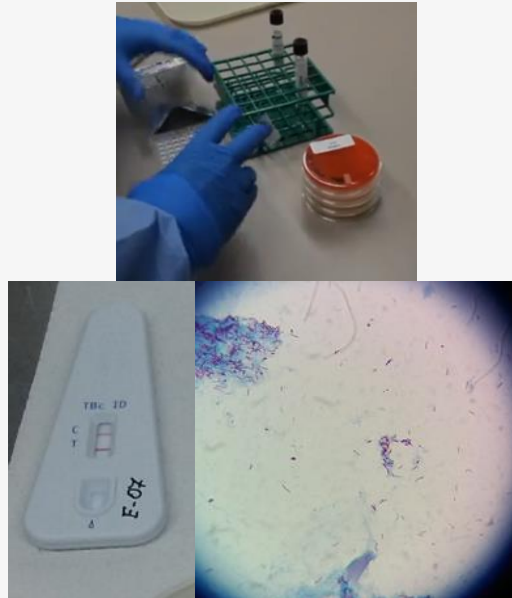
Incubar a 37°C por 6 semanas



## Lectura de placas y selección de cepas



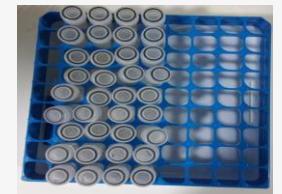
Microscopio  
invertido



Baciloscopia  
Agar sangre  
Identification test  
BD



Siembra en 7h11  
4 semana de  
incubacion



Extracción de  
DNA  
(15 muestras x 6  
horas)

# Resultados

## 126 muestras de tuberculosis pulmonar con cultivo negativo

110 (87,3%) eran ZN-smear[-]

47 (42,7%) eran Xpert MTB/RIF Ultra[-]

ZN-Smear[-]/Xpert[-]

1/47 (2,1%) de las muestras se recuperaron en medios suplementados con CF

ZN-Smear[-]/Xpert-trace

3/23 (13%) se recuperaron con medios no suplementados y 2/23 (8,7%) con medios suplementados con CF

ZN-Smear[-]/Xpert muy bajo y bajo

5/40 (12,5%) se recuperaron con medios no suplementados y 10/40 (25%) con medios suplementados con CF

ZN-Smear[+]/Xpert[+]

Se recuperaron 5/15 (31,3%) tanto con medios sin suplemento como con medios con suplemento de CF

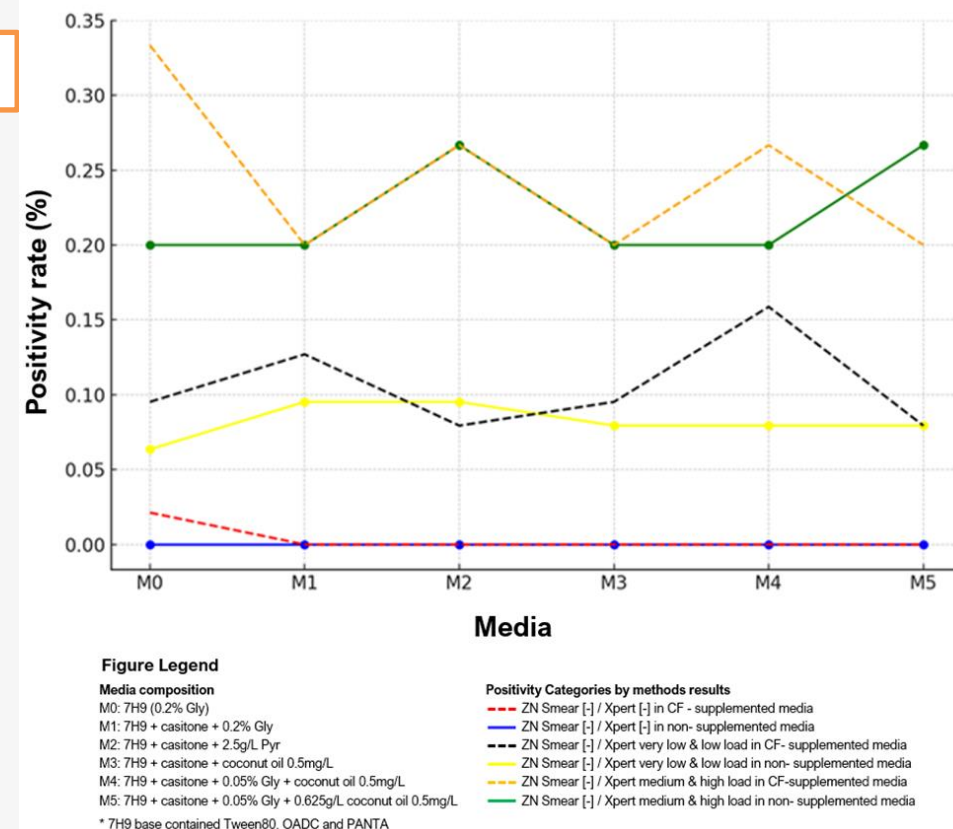


Fig. 1: Tasa de Positividad MTB categorizados por resultados de baciloscopia y Xpert MTB/RIF Ultra

El medio suplementado con CF con la mejor recuperación contenía bajo contenido en glicerol y aceite de coco (14/126, 11,1%) (**M4CF**), seguido de 7H9 solo (12/126, 9,5%) (**M0CF**), y 7H9 modificado (11/126, 8,7%) (**M1CF**). Entre los medios no suplementados, el 7H9 modificado más piruvato mostró la mejor recuperación (10/126, 7,9%) (**M2**) (Fig.2).

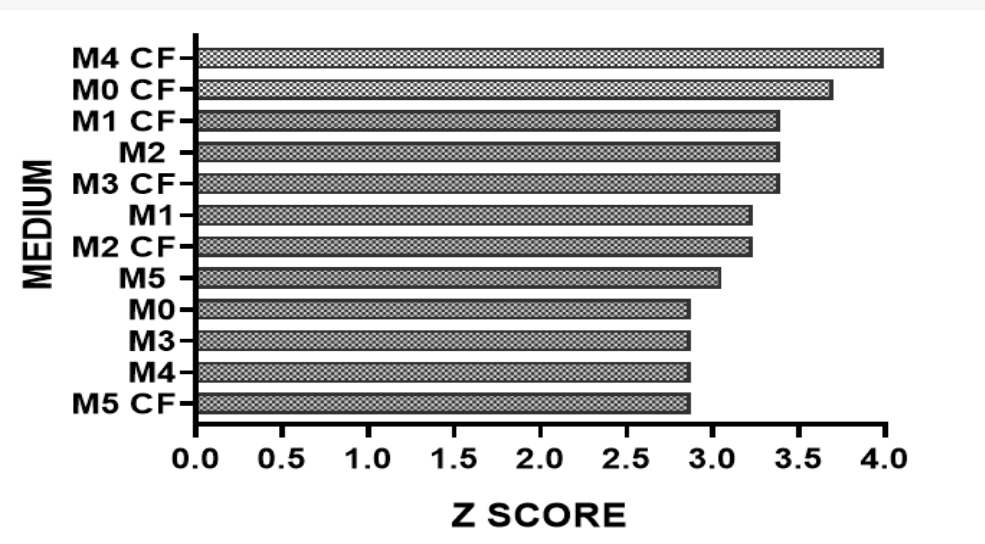
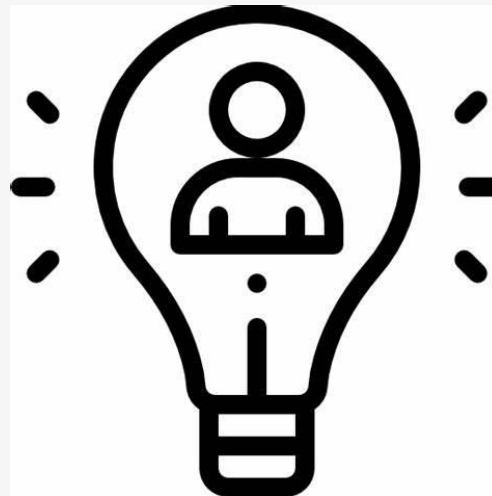


Fig. 2: Z score de medios suplementados

# Conclusiones

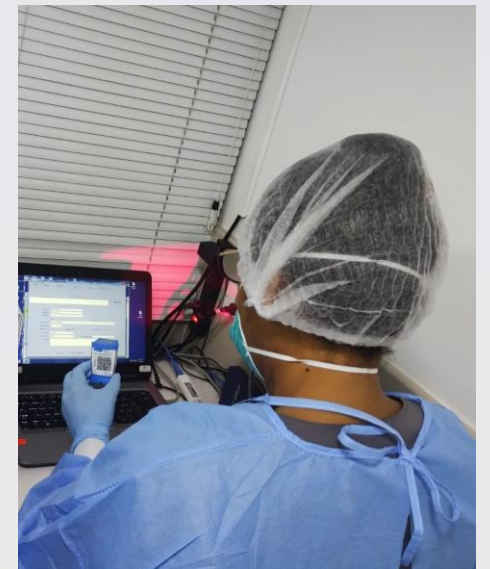
---

- El mejor medio en donde se recupera una mayor cantidad de muestras es el M4 CF que esta compuesto por caldo 7H9 mas caseína, glicerol, aceite de coco y tween
- Las muestras con resultados de xpert RIF/ULTRA bajo y muy bajo fueron las que tuvieron mayor recuperación en medios suplementados con Cultivos Filtrados.





#RompeElCiclo



[www.sociosensalud.org.pe](http://www.sociosensalud.org.pe)



**LABORATORIO**  
SOCIOS EN SALUD SUCURSAL PERU

Av. Chimpu Ocllo 998 Urb. Res. Lucyana  
Carabayllo. Lima 15318  
Lima - PERU

☎ 981740806

[nbarreda\\_ses@pih.org](mailto:nbarreda_ses@pih.org)

**Socios  
En Salud**  
LA SALUD ES UN DERECHO

