

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA
FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA
“Alberto Cazorla Talleri”



Evaluación de medios de cultivo modificados para el desarrollo de un kit microbiológico basado en MODS de *Mycobacterium tuberculosis* usando un modelo de crecimiento de *Mycobacterium smegmatis*

Tesis para optar el título de Licenciado en Biología

Maria de Grecia Cauti Mendoza

Lima-Perú

2021

Asesor(a) de tesis

PhD. Patricia Sheen Cortavarria

JURADO DE TESIS

DRA. JASMÍN ELENA HURTADO CUSTODIO

PRESIDENTE

Dra. MANUELA VERASTEGUI PIMENTEL

VOCAL

DR. DANIEL GUERRA GIRALDEZ

SECRETARIO

DEDICATORIA.

Este trabajo representa una pequeña parte de cada una de las personas que estuvieron en estos 5 años de estudios. Principalmente a mis padres Mario Cauti Rojas y Mirian Lidia Mendoza Huachaca por su soporte y motivación diaria. A mis hermanos Arquímedes y Mayra que han sido un fuerza para dar lo mejor.

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 durante todo el desarrollo del proyecto.

A mi compañero de la vida R. y a los chicos del Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular

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.

RESUMEN

El método de susceptibilidad a drogas por observación microscópica (MODS) ha brindado nuevas oportunidades para la detección rápida, sensible, específica y económica de *Mycobacterium tuberculosis*. Sin embargo, pocos laboratorios han podido implementar este método, debido principalmente a la complejidad de su preparación. Para responder a esta situación, la industria desarrolló un Kit de MODS con los reactivos en líquido listos para usar, sin éxito alguno y retirándose del mercado por la baja demanda.

Uno de los motivos, posiblemente, es el alto costo que demanda mantener la cadena de frío para la conservación de las propiedades del medio líquido, esto incluye el costo de los equipos y su mantenimiento. Por ello, se desea desarrollar un prototipo de kit que incluya medios deshidratados para ser reconstituídos en el momento de su uso y no requieren almacenamiento refrigerado.

En este estudio se evaluó el crecimiento de *M. smegmatis*, como modelo de *M. tuberculosis*, en el medio líquido Middlebrook 7H9-OADC (7H9-OADC) en dos presentaciones: liofilizado y mezclado, ambos esterilizados con radiación gamma y PANTA. El crecimiento de la micobacteria en estos dos medios fue comparado al crecimiento de la misma en el medio convencional MODS 7H9-OADC (MODS convencional) (control). El medio liofilizado fue preparado a partir del medio 7H9-OADC esterilizado y liofilizado; el medio mezclado fue elaborado mezclando el medio base 7H9 con albúmina, dextrosa y catalasa en su estado natural (7H9-ADC). Ambos medios deshidratados fueron esterilizados eficientemente con radiación gamma y el reactivo PANTA. El reactivo PANTA restringió el crecimiento de *M. smegmatis*, mientras que la exposición a radiación gamma no mostró efecto adverso en el crecimiento *M. smegmatis*. Los medios candidatos para la implementación del prototipo de kit de MODS para el diagnóstico de *M. tuberculosis* son el medio liofilizado, liofilizado con radiación gamma y mezclado con radiación gamma.

Palabras clave: MODS, liofilización, radiación gamma, PANTA.

ABSTRACT

The Microscopic Observation Drug Susceptibility (MODS) method has provided new opportunities for the rapid, sensitive, specific, and inexpensive detection of *Mycobacterium tuberculosis*. However, few laboratories have been able to implement this method, mainly due to the complexity of its preparation. To respond to this situation, the industry developed a MODS Kit with ready-to-use liquid reagents, without any success and withdrawing from the market due to low demand.

One of the reasons, possibly, is the high cost required to maintain the cold chain for the conservation of the properties of the liquid medium, this includes the cost of the equipment and its maintenance. Therefore, it is desired to develop a prototype kit that includes dehydrated media to be reconstituted at the time of use and does not require refrigerated storage.

In this study, the growth of *M. smegmatis*, as a model of *M. tuberculosis*, was evaluated in the liquid medium Middlebrook 7H9-OADC (7H9-OADC) in two presentations: lyophilized and mixed, both sterilized with gamma radiation and PANTA. The growth of the mycobacterium in these two media was compared to the growth of the same in the conventional medium MODS 7H9-OADC (conventional MODS). The lyophilized medium was prepared from the sterilized and lyophilized 7H9-OADC medium; The mixed medium was made by mixing the 7H9 base medium with albumin, dextrose and catalase in their natural state (7H9-ADC). Both dehydrated media were efficiently sterilized with gamma radiation and the PANTA reagent. The PANTA reagent restricted the growth of *M. smegmatis*, while exposure to gamma radiation showed no adverse effect on the growth of *M. smegmatis*. Candidate media for the implementation of the MODS kit prototype for the diagnosis of *M. tuberculosis* are lyophilized medium, lyophilized with gamma radiation and mixed with gamma radiation.

Keywords: MODS, lyophilization, gamma radiation, PANTA.

ÍNDICE

| | Pág. |
|---|------|
| I. INTRODUCCION | 1 |
| II. MARCO TEÓRICO | 2 |
| III. PREGUNTA DE INVESTIGACION | 4 |
| IV. OBJETIVOS | 4 |
| V. MATERIALES Y MÉTODOS | 5 |
| 5.1. Muestra biológica | 7 |
| 5.2. Preparación y evaluación de la esterilidad de las presentaciones del medio de cultivo: medios liofilizado y mezclado | 7 |
| 5.3. Esterilización de las presentaciones liofilizado y mezclado por radiación gamma y PANTA | 7 |
| 5.4. Diluciones y cultivo de <i>M. smegmatis</i> en los medios modificados | 8 |
| 5.5. Selección del día de determinación del porcentaje de crecimiento y conteo de microcolonias | 9 |
| 5.6. Determinación cualitativa y cuantitativa del crecimiento de <i>M. smegmatis</i> en los medios liofilizados y mezclados | 9 |
| 5.7. Análisis estadístico | 9 |
| 6. RESULTADOS | 10 |
| 6.1 Evaluación de la esterilidad de los medios modificados | 10 |
| 6.2 Evaluación de la esterilidad de los medios modificados tratados con radiación gamma y PANTA | 11 |
| 6.3 Porcentaje de crecimiento (cualitativo) de <i>M. smegmatis</i> en los medios modificados | 12 |
| 6.4 Selección del día de conteo de las microcolonias de <i>M. smegmatis</i> | 13 |
| 6.5 Número de microcolonias (cuantitativo) de <i>M. smegmatis</i> en los medios modificados | 14 |
| 7. DISCUSION | 15 |
| 8. CONCLUSION | 17 |
| 9. REFERENCIAS | 18 |
| 10. ANEXOS | 20 |

I. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una de las principales causas de muerte por enfermedad infecciosa en todo el mundo de acuerdo a la organización mundial de la salud (OMS) (1). El control global de la TB se ve afectado por la falta de acceso a pruebas de diagnóstico confiable y accesible en los países de mayor incidencia, lo que resulta en altas tasas de mortalidad anual (2). El cultivo convencional en medio de Löwenstein-Jensen continúa siendo usado para el diagnóstico; sin embargo, éste puede tomar varias semanas antes de tener un resultado concluyente.

En el año 2000 se descubrió una prueba de diagnóstico en medio líquido a la cual se denominó *Microscopic-Observation Drug Susceptibility Assay* o MODS, que permite el crecimiento rápido y una visualización pronta de las microcolonias de *M. tuberculosis* en el medio líquido 7H9-OADC. Asimismo, permite detectar simultáneamente la sensibilidad a fármacos de primera línea. Esta prueba está dirigida hacia el mundo en desarrollo, con una alta especificidad y sensibilidad a un precio menor de 2 \$, con una metodología de relativa simplicidad (3,4).

Las ventajas de esta prueba generaron la creación de un kit de diagnóstico rápido basado en MODS, con una presentación de los medios en líquido listos para usar. Sin embargo, fue descontinuada y esto se pudo atribuir alto costo por parte del reactivo OADC comercial y al transporte refrigerado (5). Este trabajo plantea dos presentaciones distintas del medio líquido 7H9-OADC. Una presentación liofilizada, donde el medio final ha sufrido un proceso de deshidratación y es fácilmente reconstituido con agua estéril, además, tiene una estabilidad microbiológica y no requiere refrigeración estricta para su transporte (6). Por otro lado, una presentación mezclada, donde los reactivos en polvo que se utilizan para la preparación del medio 7H9-OADC son agrupados y para su uso en cultivo reconstituidos con agua estéril. Esta última presentación otorga un bajo precio de producción y fácil distribución sin cadena de frío.

La descontaminación de ambas presentaciones por exposición a radiación gamma o incorporación del suplemento antimicrobial PANTA resultan adecuados para el proceso. Ambas técnicas reportan una buena esterilidad y no alteran significativamente la naturaleza del producto. En base a ello exponemos dos presentaciones del medio en líquido 7H9-OADC, liofilizado y mezclado. Se evalúa el crecimiento de *M. smegmatis*, como modelo biológico de *M. tuberculosis*, en las dos presentaciones y son comparados con el crecimiento en el medio control. Asimismo, se realiza un análisis cualitativo y cuantitativo del crecimiento observado con la finalidad de reportar la presentación del medio más adecuado para un estudio posterior en *M. tuberculosis*.

II. MARCO TEÓRICO

El ensayo de susceptibilidad a fármacos por observación microscópica (MODS) es una prueba de diagnóstico fenotípico, altamente sensible y específica (97,8% y 99,6% respectivamente) para TB y TB-multidrogoresistente (TB-MDR) (3). Este ensayo consiste en el cultivo en líquido de muestras de esputo descontaminadas, donde detecta *M. tuberculosis* y evalúa la sensibilidad frente a las drogas isoniacida y rifampicina, antibióticos de primera línea. La detección se realiza mediante la visualización de microcolonias en una placa de 24 pozos donde se encuentra la muestra de esputo descontaminada y resuspendida en caldo Middlebrook 7H9 suplementado con OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa) (7H9-OADC) a través de un microscopio óptico de luz invertida. Los resultados se obtienen en un promedio de 7 días, mucho menor que el cultivo en sólido (3 semanas) y con una alta reproducibilidad (3) (4).

En el año 2014, una compañía americana diseñó un kit de MODS con el medio líquido 7H9-OADC listo para usar (5). Sin embargo, este kit no obtuvo la demanda esperada y fue retirada del mercado; probablemente debido al alto costo por parte del reactivo OADC comercial y al transporte refrigerado (4-8°C).

El trabajo plantea evaluar dos nuevas presentaciones del medio 7H9-OADC deshidratados: medio liofilizado y el mezclado que podrían reducir el costo del producto. Debido a que estos medios pueden presentar contaminantes; el medio liofilizado puede contaminarse en el proceso de liofilización y el medio mezclado no será esterilizado, por lo que será necesario un paso de descontaminación. Los medios serán esterilizados mediante radiación gamma y uso de PANTA. Asimismo, estos medios deshidratados podrían alterar el crecimiento de *M. tuberculosis* en las pruebas de diagnóstico; por lo que se evaluará la efectividad de los medios, mezclado y liofilizado estériles en el crecimiento de la cepa de *M. smegmatis*.

M. smegmatis es una micobacteria que es utilizada como modelo biológico de *M. tuberculosis*. *M. smegmatis* conserva una semejanza con la maquinaria transcripcional de *M. tuberculosis*, 9 de los 13 genes que codifican factores sigma de *M. tuberculosis* están presentes en *M. smegmatis* (7). Asimismo, este modelo no patógeno presenta cambios fisiológicos, metabólicos y moleculares similares a *M. tuberculosis* como respuesta de adaptación a un ambiente hipóxico. Entre ellos, el sistema de transducción de señales DevR-DevS, un candidato de vínculo clave entre la hipoxia y una respuesta de persistencia de *M. tuberculosis* presenta homólogos en *M. smegmatis*. Asimismo, genes como hspX, sigF y otros que codifican nitrato reductasa, isocitrato liasa y alanina deshidrogenasa que se regulan al alza en una fase de latencia también están presentes en *M. smegmatis* (8) y en este ambiente hipóxico ambas micobacterias siguen un modelo de persistencia no replicativo, detienen la síntesis de ADN, y frente a la reactivación con oxígeno presentan una división sincronizada (8, 9). Además, *M. smegmatis* es un buen modelo para el desarrollo de fármacos antituberculosos, dado que presenta complejos o dominios, para fármacos, ortólogos en *M. tuberculosis*. Un ejemplo de ello es el dominio catalítico F1 de la adenosina triptófano sintasa (ATP) presente en ambas micobacterias y es blanco para la bedaquilina, un fármaco nuevo contra tuberculosis (10).

Por otro lado, *M. smegmatis* presenta diferencias con la micobacteria patógena que hacen más práctico el trabajo en el laboratorio y en este estudio. *M. smegmatis* es una micobacteria no patógena por lo que no requiere de un laboratorio de bioseguridad 3; además, presenta un tiempo de generación mucho más rápida, 3 a 4 horas, que *M. tuberculosis*, 24 horas, por lo que los experimentos pueden ser realizados hasta 4 veces más rápido (11). Por todo lo mencionado, *M. smegmatis* es considerado un buen modelo biológico de *M. tuberculosis* y es utilizado en este proyecto.

El medio 7H9-OADC liofilizado, medio liofilizado, incluirá la preparación del medio de manera convencional (re suspensión del medio con agua destilada y estéril por autoclave) y su posterior liofilización (12).

La liofilización es una técnica de conservación de productos, basada en la deshidratación por sublimación directa en condiciones de vacío (13). Esta técnica es ideal para la preservación de productos alimenticios, farmacéuticos y biológicos que en su estado natural requieren temperaturas frías como: células, vegetales y entre lo más común las vacunas (14-17). Además, no altera o no de manera significativa la estructura fisicoquímica del producto liofilizado, proporciona una vida útil más larga, asimismo, el producto tiene menos del 15% de humedad, por lo que tiene una alta estabilidad microbiológica, y permite su conservación sin cadena de frío estricta (17), características que facilitan su distribución y almacenamiento. No se registran estudios de la eficacia de medio de cultivo microbiológicos liofilizados, pero se ha demostrado altas probabilidades en otros productos.

La preparación del medio 7H9-OADC mezclado incluirá la mezcla de todos los reactivos en polvo. Los reactivos líquidos como la catalasa y el glicerol serán añadidos previo al cultivo de la cepa. Además, no presentará ácido oleico por el requerimiento refrigerado que exige para su transporte (4°C). La eficiencia de esta presentación en el crecimiento general de bacterias es desconocida; la diferencia con respecto al medio convencional y liofilizado es que este medio no será homogeneizado ni esterilizado mediante autoclave antes de su uso. El costo de su preparación es menor que el costo del medio convencional debido a que no requiere pasar por la autoclave y un transporte refrigerado.

La radiación gamma y el PANTA son formas de esterilización, seleccionados por los resultados aceptables de descontaminación en distintos materiales biológicos. La radiación gamma es un tipo de radiación electromagnética capaz de eliminar contaminación por bacterias, virus u otros microorganismos. Además, ha demostrado no alterar las propiedades estructurales del producto esterilizado (18). La fuente de radiación gamma que se utilizará es proveniente del Cobalto-60, por su amplia utilización para este tipo de procesos, como la esterilización de biomateriales sin afectar su post disponibilidad, material biológico como trasplantes y xenoinjertos (19,20). Los resultados efectivos de la esterilización con radiación gamma son producto de su buena penetración en el material y del alcance uniforme de las regiones de la muestra a esterilizar (19). Sin embargo, la radiación gamma al poseer una alta energía podría causar alguna alteración en las propiedades químicas, eléctricas, mecánicas y biológicas de la muestra.

Por lo que se tomará una dosis de radiación en base al sistema de Dosimetría estándar de Referencia ASTM 1026 (Fricke) utilizada por el Instituto de Energía Nuclear (IPEN), mediante la cual se establece un mínimo, intermedio y máximo de dosis para esterilizar la muestra, de las cuales se seleccionará la menor dosis que logre descontaminar el medio.

PANTA BD BACTEC (PANTA) es un producto que contiene polimixina B, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprima y azlocilina, agentes antimicrobianos utilizados para suprimir el crecimiento de microorganismos contaminante. Además, forma parte del medio 7H9-OADC, utilizado para el cultivo de muestras de esputo en MODS convencional. Este reactivo es utilizado como descontaminante debido a su alta capacidad de esterilización bacteriana y fúngica (3). En el método del tubo indicador de crecimiento de micobacterias (MGIT) redujo en un 7% la contaminación, pero también redujo un día la detección de la cepa tuberculosa (21).

Una de las formas para evaluar la efectividad de un medio de cultivo consiste en el registro de crecimiento del microorganismo cultivado, donde es calificado como un buen medio aquel donde se genera más biomasa (22) (23). En este estudio se evaluará el crecimiento de *M. smegmatis* en los medios modificados liofilizado y mezclado estériles con respecto al crecimiento en el medio MODS convencional, con la finalidad de seleccionar los mejores medios para el desarrollo de un prototipo de kit de diagnóstico para *M. tuberculosis*.

III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿El crecimiento de *M. smegmatis* en los medios modificados, liofilizado y mezclado, variará en relación al cultivo en el medio convencional MODS?

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar la eficiencia de crecimiento de *M. smegmatis* en medios de cultivos modificados: Liofilizado y mezclado.

4.2. Objetivo específico

- Evaluar la esterilidad de los medios modificados liofilizados y mezclados.
- Evaluar la esterilidad del medio mezclado y liofilizado irradiado con gamma y PANTA.
- Comparar el crecimiento de *M. smegmatis* en medios liofilizados estériles con MODS convencional.
- Comparar el crecimiento de *M. smegmatis* en medios mezclados estériles con MODS convencional.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizó seis tipos de medios modificados del medio en líquido 7H9-OADC: Liofilizado más radiación gamma, mezclado más radiación gamma, liofilizado más PANTA, mezclado más PANTA y liofilizado (Figura 1).

Se evaluó tres lotes por cada medio modificado a excepción de los dos medios esterilizados con PANTA, un lote. Cada lote estuvo conformado por 9 viales (v= 25 ml), donde cada vial permite 4 siembras o cultivos de *M. smegmatis*. Un lote del medio liofilizado y mezclado esterilizados con radiación gamma se estableció como un envío al IPEN. El lote para el medio liofilizado fue equivalente a un ciclo de liofilización. Finalmente, un lote del medio mezclado fue considerado como la preparación del medio en una fecha dada, con reactivos al pesados al momento. La descripción de la preparación y evaluación de los medios modificados es descrita en base a la unidad mínima de evaluación, un vial.

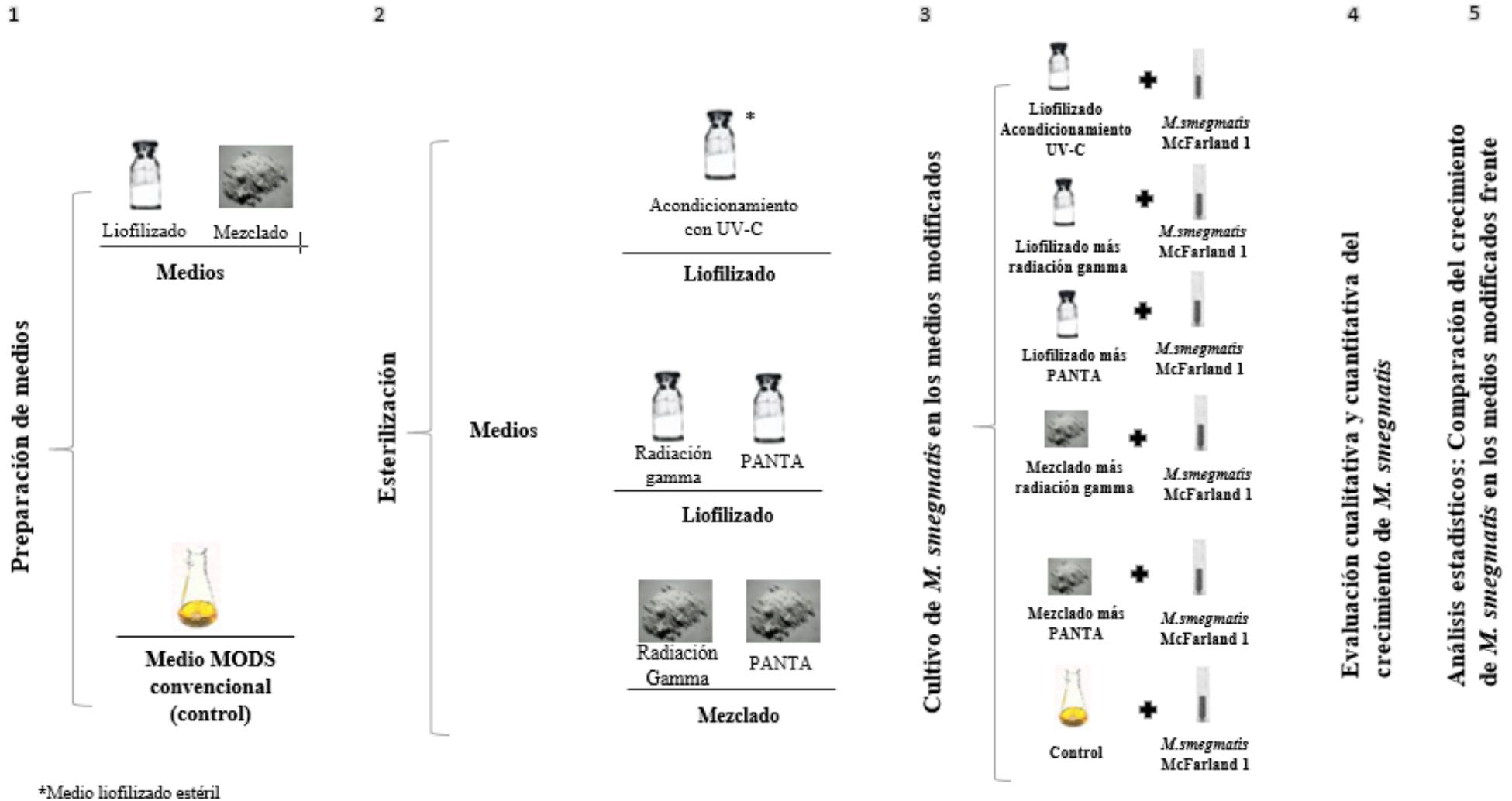


Figura 1. Flujo de actividades. 1. Preparación de las dos presentaciones de medio de cultivo, liofilizado y mezclado, y el medio MODS (control) 2. Esterilización de las dos presentaciones mediante Radiación gamma, el suplemento antimicrobiano PANTA y la adecuación de un ambiente estéril por radiación UV-C (solo en el caso del medio liofilizado) 3. Cultivo de *Mycobacterium smegmatis* en los medios estériles o medios modificados 4. Evaluación del crecimiento de *M. smegmatis* en los medios modificados, mediante el conteo de microcolonias (cuantitativo) y el porcentaje de crecimiento (cualitativo), frente al crecimiento en el medio control. 5. Análisis estadísticos comparativos para el crecimiento de *M. smegmatis* en medios modificados y control.

5.1. Muestra biológica

Se utilizó la cepa mc2 155 de *M. smegmatis* del Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular- LID de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH). La cepa fue guardada en la concentración equivalente a la escala 1 de McFarland en un volumen de 10 mL (3×10^7 cel/mL) en un tubo sellado, protegida de la luz y refrigerada entre 2 y 8°C. Su uso se limitó a un plazo no mayor a 15 días sugerida en la Guía de MODS (19).

5.2. Preparación y evaluación de la esterilidad de las presentaciones del medio de cultivo: medios liofilizado y mezclado

Medio liofilizado.

El medio 7H9-OADC es preparado de la siguiente manera: 0.13 g de medio 7H9 Middlebrook (BD), 0.068 mL de glicerol (J.T BAKER), 0.027 g de Bacto™ casitona (BD) y 22.5 mL de agua destilada. Seguidamente, se coloca en autoclave y en esterilidad se agrega 10% de OADC (2.5ml). El OADC fue preparado de manera manual mediante la adición de 120 ul de ácido oleico, 1.13 g de bovine serum albumin (BD), 23 g de dextrosa (BD) y 0.007 g de catalasa para un volumen final de 50 ml (23).

El vial con 25ml de medio fue congelado a -72°C por 12 horas. Posteriormente fue llevada a un equipo de liofilización y ejecutada de acuerdo al proveedor (Labconco, modelo LYPH.LOCK 12) a una temperatura de -46°C y una presión entre 50 - 70 (10)-3 MBAR.

Medio mezclado.

El medio fue preparado mezclando los componentes en polvo del medio 7H9-OADC. La composición para un vial fue la siguiente: 0.1475 g de medio Middlebrook 7H9 (BD), 0.0281 g de Bacto™ Casitona (BD), 0.125 g de bovine serum albumin (SIGMA), 0.0213 g de NaCl (MERCK) y 0.05 g de D-Glucosa (SIGMA). Los reactivos fueron pesados en una balanza analítica (MS-TS) con una fidelidad de 0.1mg. El reactivo glicerol, por ser líquido, fue autoclavado e incorporado en el momento del cultivo de la cepa.

La evaluación de la contaminación bacteriana o fúngica fue realizada sembrando 20 µL de las dos presentaciones, reconstituidos en agua destilada estéril, en placas con agar Luria- Bertani (LB-Difco) y agar Sabouraud glucosa (Difco) e incubados por 2 y 5 días a 37°C y temperatura ambiente respectivamente.

5.3. Esterilización de las presentaciones liofilizado y mezclado por radiación gamma y PANTA

Irradiación gamma. Los viales con los medios secos mezclados y liofilizados fueron irradiados con radiación gamma en el Instituto Peruano de Energía Nuclear (IPEN) con 5, 10 y 15 kGy, potencia establecida por el sistema de Dosimetría Estándar de Referencia ASTM 1026 (Fricke) del IPEN, usando las siguientes condiciones: Irradiador tipo 1, marca Gammacell 220 Excel, modelo: C-198, serie: GS-401, radiación gamma de Co-60 y condiciones ambientales: 19°C; 968 hPa.

PANTA. Se agregó 500 µl del suplemento antimicrobial PANTA (BD) por vial, dosis utilizada en la Guía de MODS (25).

La evaluación de la contaminación bacteriana o fúngica fue realizada sembrando 20 µL de los medios modificados, reconstituidos en agua destilada estéril, en placas con agar Luria- Bertani (LB-Difco) y agar Sabouraud glucosa (Difco) e incubados por 2 y 5 días respectivamente.

5.4. Diluciones y cultivo de *M. smegmatis* en los medios modificados

La cepa de *M. smegmatis* McFarland 1 fue diluido en los medios modificados estériles reconstituidos con agua destilada (H₂O_(d)) (1:1000, 1:5000, 1:10000 y 1:50000) como indica el siguiente diagrama (Figura 2). Las placas fueron incubadas a 37°C (Thermo Scientific™ 3311).

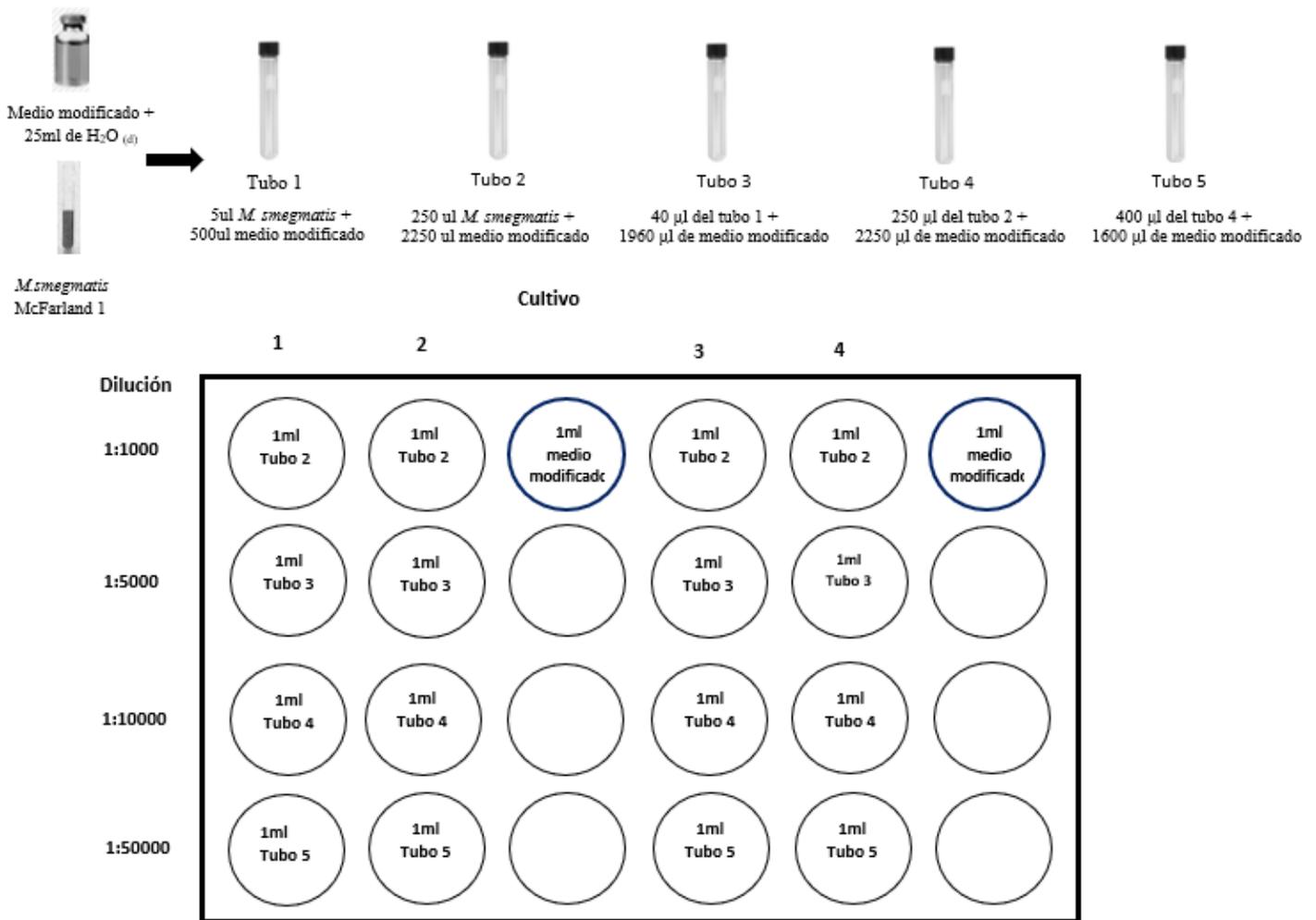


Figura 2. Distribución de las diluciones de *M. smegmatis* en la placa MODS.

Diluciones de *M. smegmatis* (1:1000, 1:5000, 1:10000, 1:50000) a partir de un vial de medio modificado (v=25ml) y una muestra de *M. smegmatis* McFarland1, dando como resultado el cultivo de muestras y dos muestras control.

5.5. Selección del día de determinación del porcentaje de crecimiento y conteo de microcolonias

Se realizó un seguimiento del crecimiento de *M. smegmatis* McFarland 1 en las 4 diluciones en el medio convencional MODS. La elección del día más adecuado se basó en la factibilidad, visibilidad y dispersión, de un conteo de microcolonias y la diferencia de crecimiento en las distintas diluciones. El crecimiento de *M. smegmatis* en las diluciones en las placas MODS fue observado bajo un microscopio invertido a un aumento de 50X (TS100-Nikon) en los días 1, 2 y 3 de incubación.

5.6. Determinación cualitativa y cuantitativa del crecimiento de *M. smegmatis* en los medios liofilizados y mezclados

El crecimiento de *M. smegmatis* observado en el microscopio invertido (50X) en el día 2 de incubación (día elegido por un ensayo previo) fue registrado de dos maneras:

1. **Determinación cualitativa:** Porcentaje crecimiento de *M. smegmatis* en el medio modificado, teniendo como 100% al crecimiento de la misma cepa en el medio convencional MODS (control). Los porcentajes fueron atribuidos del 0 al 100% , donde cero representa una nula similitud entre ambos cultivos y 100% una completa similitud (Anexo 1).
2. **Determinación cuantitativa:** Número de microcolonias en la máxima dilución (1:50000). El conteo de microcolonias se realizó en 1 a 3 imágenes capturadas de todo el pozo de siembra con una cámara con una resolución de 2,270 x 1,080 píxeles. El conteo fue facilitado por el uso de la aplicación móvil APD Colony Counter (Anexo 2).

5.7. Análisis estadístico

Se evaluaron la normalidad de los datos, tanto del conteo de microcolonias y el porcentaje de crecimiento mediante la prueba de Shapiro Wilk ($p > 0.05$) dando como resultado una no normalidad por lo cual los datos fueron tratados por pruebas no paramétricas. El porcentaje de crecimiento de *M. smegmatis*, datos cualitativos, entre medios de cultivo fueron comparados con las pruebas Kruskal Wallis y post hoc Dunn. El número de microcolonias, datos cuantitativos, en la dilución, 1:50000 entre los medios modificados y el medio control fueron comparados con la prueba Kruskal Wallis. Los análisis fueron realizados en el programa STATA versión 15.

VI. RESULTADOS

6.1. Evaluación de la esterilidad de los medios modificados

Las dos presentaciones del medio de cultivo, liofilizado y mezclado fueron preparados (Figura 2) y se resuspendieron con agua destilada auto clavada. Ambas presentaciones mostraron contaminación bacteriana y fúngica en las placas de agar LB y Sabouraud respectivamente (Figura 3). Por otro lado, el medio liofilizado trabajado en un ambiente descontaminado con radiación UV-C no mostró contaminación.

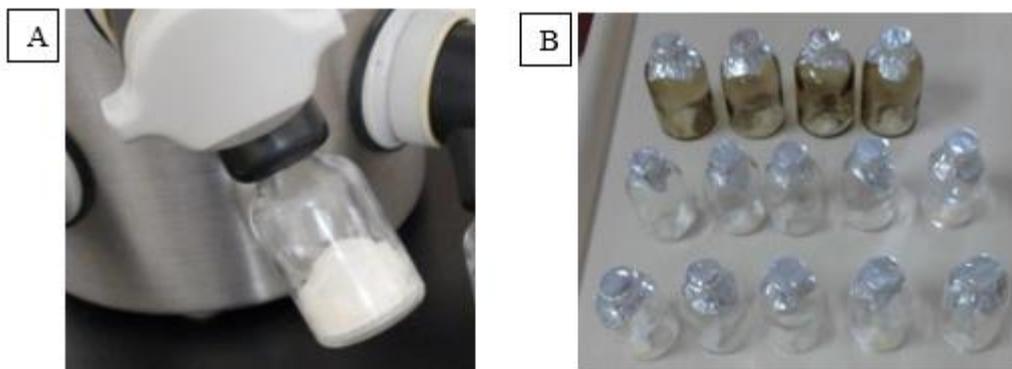


Figura 3. Preparación de medios modificados. A. Liofilizado, B. Medio mezclado

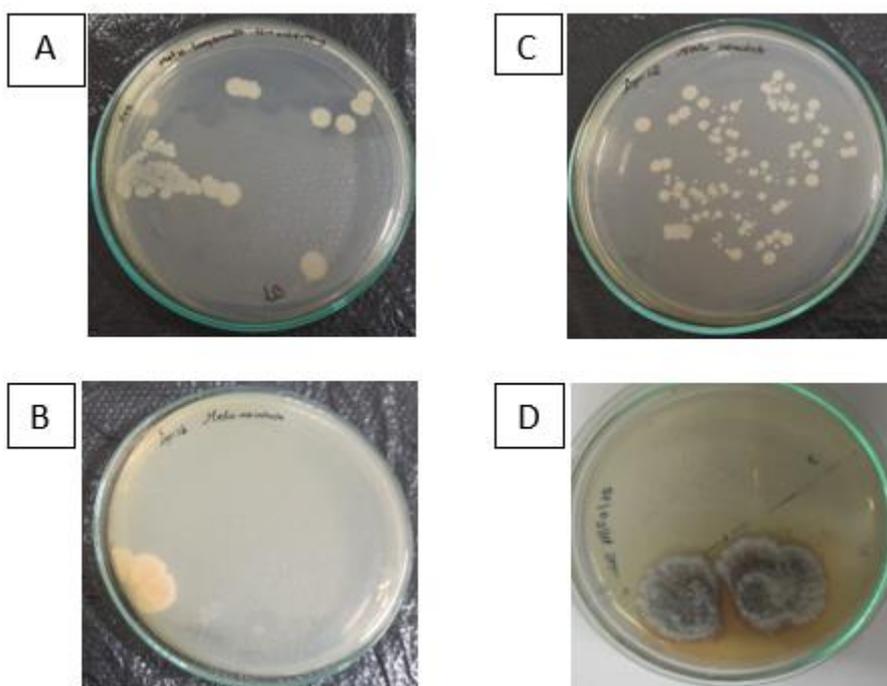


Figura 4. Evaluación de la esterilidad de los medios recién preparados

A. Medio liofilizado en agar LB. B. Medio liofilizado en agar Sabouraud
C. Medio mezclado en agar LB. D. Medio mezclado en agar Sabouraud.

6.2. Evaluación de la esterilidad de los medios modificados tratados con radiación gamma y PANTA

Los 15 cultivos del medio liofilizado y 15 del medio mezclado esterilizados con las 3 dosis de radiación gamma 5, 10 y 15 kGy, mostraron esterilidad en las placas de agar LB y Murashing & Scof (Figura 4). A partir de este resultado las siguientes esterilizaciones de ambos medios se efectuaron a una intensidad de 5 kGy. Asimismo, los 15 cultivos de los medios mezclados y liofilizados con PANTA no mostraron contaminación (Figura 5)

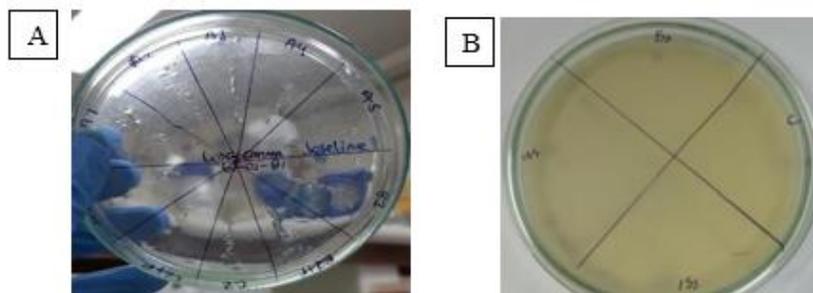


Figura 5. Evaluación de la esterilización con radiación gamma a tres intensidades 5, 10 y 15 kGy. A. Siembra de alícuotas del medio liofilizado irradiado a las 3 intensidades (A=5 kGy, B=10 kGy, C=15 kGy). B. Siembra de alícuotas del medio liofilizado irradiado a tres intensidades más el control negativo (c).

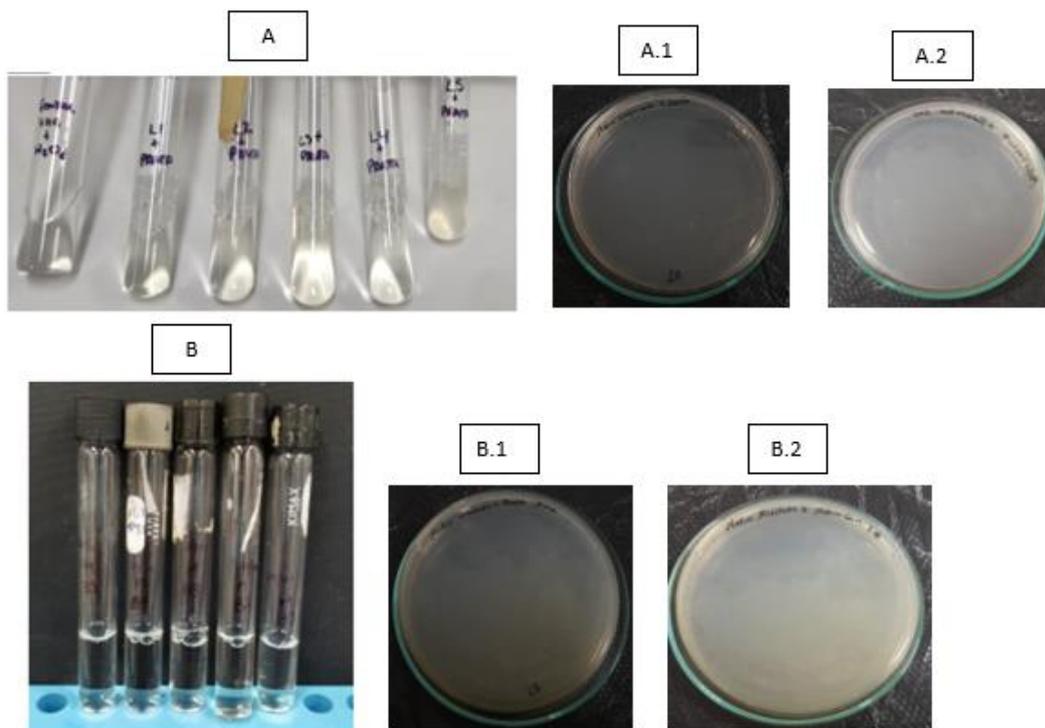


Figura 6. Evaluación de la esterilidad de medios modificados con PANTA. A. Turbidez de medio liofilizado A.1 Medio liofilizado en agar LB A.2 Medio liofilizado en agar Sabouraud B. Turbidez de medio mezclado B.1 Medio mezclado en agar LB B.2 Medio mezclado en agar Sabouraud.

6.3. Porcentaje de crecimiento de *M. smegmatis* en los medios modificados

En la figura 6 y en la tabla 2 se muestran los resultados del porcentaje de crecimiento de *M. smegmatis* en los medios mezclados y liofilizados en las 4 diluciones (1:1000, 1:5000, 1:10000, 1:50000). El porcentaje de crecimiento en los medios modificados y esterilizados con radiación gamma fue similar al porcentaje de crecimiento en el medio MODS convencional ($p > 0.05$).

El porcentaje de crecimiento en los medios modificados tratados con PANTA fue menor al mostrado en el medio convencional MODS ($p = 0.001$). Sin embargo, el efecto del PANTA cambió con la dilución de la cepa; en la dilución 1:1,000, *M. smegmatis* creció un 30% y 60% en el medio mezclado y liofilizado con PANTA, respectivamente. En diluciones mayores el crecimiento fue menor a 5% (Figura 6 y Tabla 1).

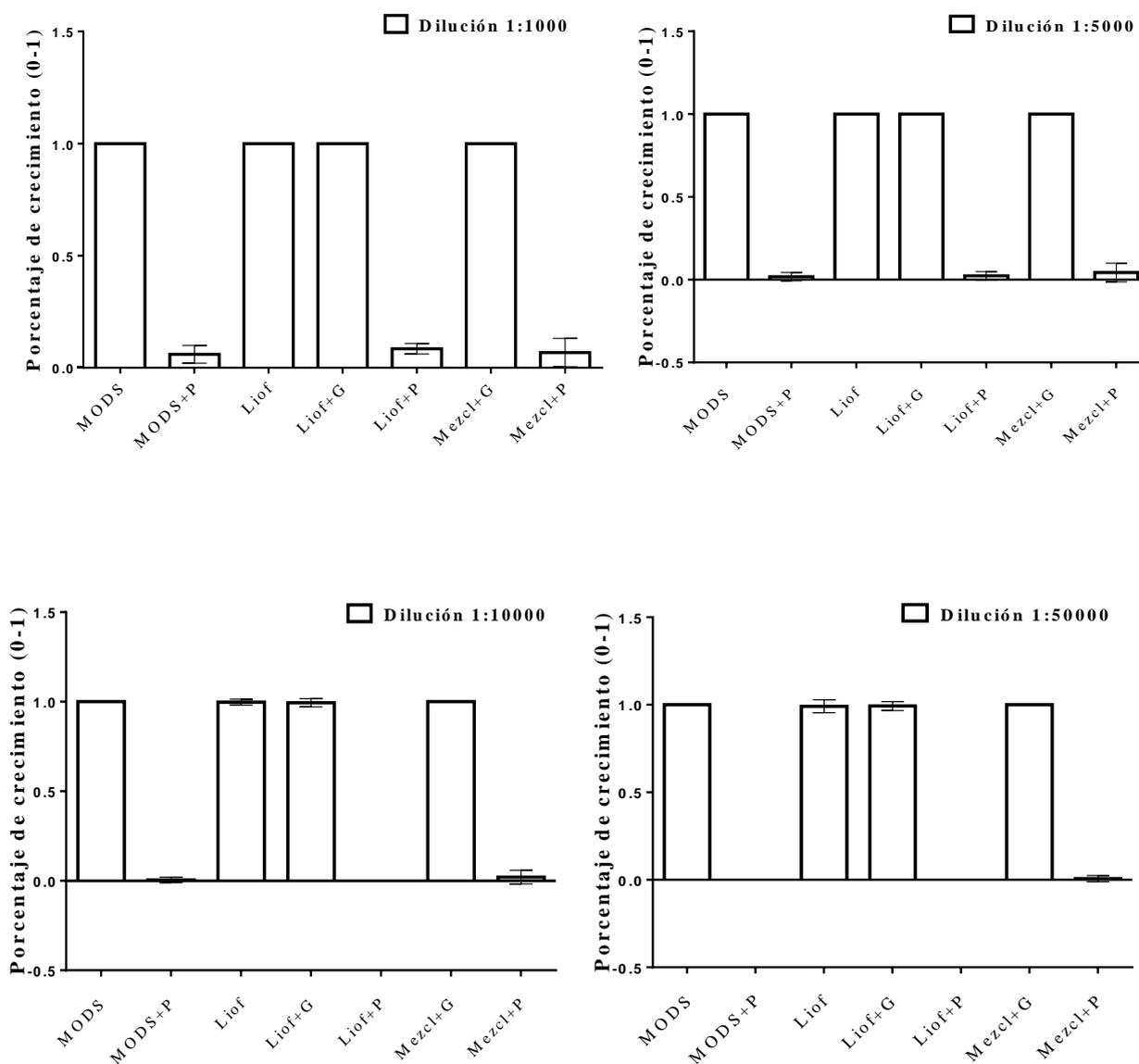


Figura 7. Porcentaje de crecimiento de *M. smegmatis* por medio modificado en 4 diluciones: 1:1000 (A), 1:5000 (B), 1:10000 (C) y 1:50000 (D) en los medios modificados.

Medio control (MODS), MODS más PANTA (MODS+P); medio liofilizado (Liof), liofilizado más radiación gamma (Liof+G), liofilizado más PANTA (Liof+P); mezclado más radiación gamma (Mezcl+G), mezclado más PANTA (Mezcl+P)

Tabla 1. Comparación del porcentaje de crecimiento de *M. smegmatis* entre los medios modificados usando diluciones Me (Mediana) *p* (p-value)

| Medio de cultivo | Dilución de la cepa <i>M. smegmatis</i> | | | | | | | |
|-------------------------------|---|----------|--------|----------|---------|----------|---------|----------|
| | 1:1000 | | 1:5000 | | 1:10000 | | 1:50000 | |
| | Me | <i>p</i> | Me | <i>p</i> | Me | <i>p</i> | Me | <i>p</i> |
| MODS (control) | 1 | | 1 | | 1 | | 1 | |
| Liofilizado | 1 | NS | 1 | NS | 1 | NS | 1 | NS |
| Liofilizado + radiación gamma | 1 | NS | 1 | NS | 1 | NS | 1 | NS |
| Mezclado + radiación gamma | 1 | NS | 1 | NS | 1 | NS | 1 | NS |

La diferencia entre los seis medios frente al control fue acorde a la prueba no paramétrica Dunntest. NS: No significativo, $p > 0.05$

6.4. Selección del día de conteo de las microcolonias de *M. smegmatis*

En el primer día de incubación en el medio 7H9-OADC convencional de *M. smegmatis* se observó crecimiento mínimo con ausencia de microcolonias y bacilos separados. En el segundo día se observó una agrupación mayor de los bacilos, dando lugar a microcolonias con una distribución y visibilidad adecuada para el conteo. Por otro lado, al tercer día de crecimiento las microcolonias bacterianas formaron conglomerados, impidiendo su conteo (Figura 8).

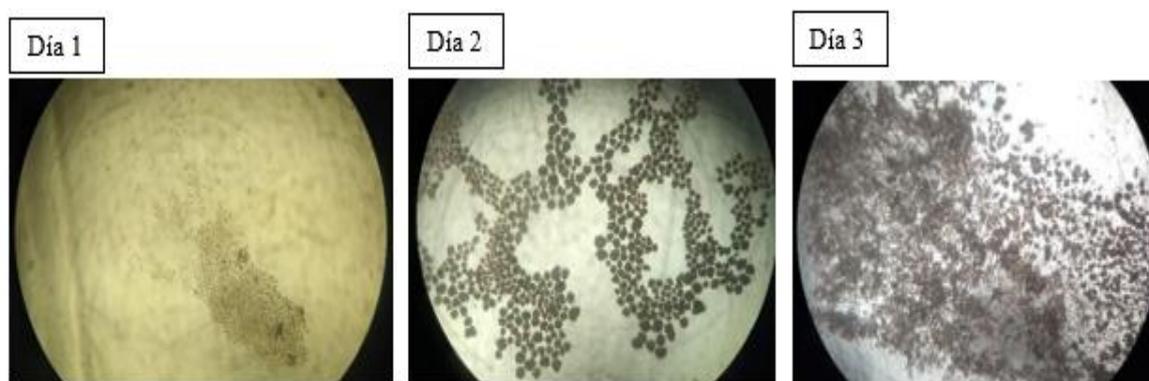


Figura 8. Registro del crecimiento de *M. smegmatis* durante los tres primeros días de siembra. Observación de microcolonias de *M. smegmatis* en el medio 7H9-OADC, bajo un microscopio invertido (50X), en los días 1, 2 y 3 de siembra.

6.5. Número de microcolonias (cuantitativo) de *M. smegmatis* en los medios modificados

El número de microcolonias de *M. smegmatis* contados en la dilución 1:50000 fue similar entre el medio mezclado esterilizado con radiación gamma y el control MODS convencional ($p=0.65$) (Figura 9, Tabla 2).

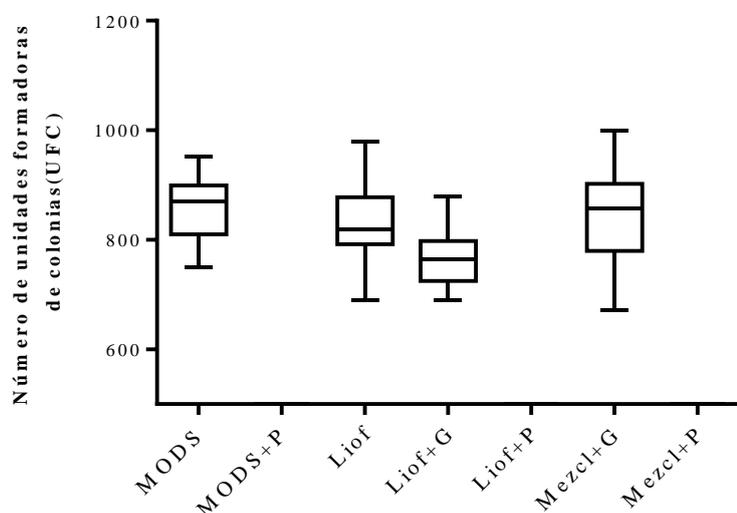


Figura 9. Número de microcolonias de *M. smegmatis* por medio modificado en la dilución 1:50000. Control (MODS), MODS más PANTA (MODS+P); medio liofilizado (Liof); medio liofilizado con radiación gamma (Liof +G); medio liofilizado más PANTA (Liof+P); medio mezclado con radiación gamma (Mezcl+G), medio mezclado más PANTA (Mezcl+P).

Tabla 2. Comparación del número de microcolonias de *M. smegmatis* entre los medios modificados. Los valores corresponden a la mediana (Me) del número de microcolonias, Rango intercuartil (IRQ) y la significancia.

| Tipo de medio | Me del número de microcolonias | IRQ | Significancia |
|-------------------------------|--------------------------------|-----|------------------|
| MODS (Control) | 868.5 | 90 | |
| Liofilizado | 820 | 83 | * ($p=0.048$) |
| Liofilizado + Radiación gamma | 765 | 73 | * ($p=0.0001$) |
| Mezclado + Radiación gamma | 870 | 120 | NS ($p=0.65$) |

NS: No significativo, $p > 0.05$; * = $p \leq 0.01$

VII. DISCUSIÓN

Las dos presentaciones del medio de cultivo 7H9+OADC, liofilizado y mezclado, requieren ser estériles para evitar algún tipo de contaminación en el cultivo final de *M. smegmatis*. El medio liofilizado incluye en su elaboración un paso de autoclavado. Sin embargo, este medio estéril es expuesto al ambiente por un corto periodo al ser transferido y retirado del equipo de liofilización. Este momento fue suficiente para mostrar contaminación bacteriana y fúngica en las placas de agar LB y Saboraud respectivamente. Por esta razón esta presentación tuvo que ser esterilizado con radiación gamma o PANTA.

Más adelante, adecuamos un ambiente con el mínimo de contaminación posible (corroborado mediante la colocación de placas de agar Murashige y Skoog, LB, Saboraud en el ambiente). Para conseguir ello instalamos un ambiente con un sistema de radiación UV-C, limpieza de las superficies con amonio cuaternario (TEGO) y el personal debidamente protegido (gorra, cubierta de zapato y mandil descartable) con la finalidad de poner a evaluar este medio sin otro factor adicional. Este acondicionamiento no sería necesario si se utilizara un modelo distinto de liofilizador que entre sus beneficios brinda un sellado a presión finalizado el proceso. Nuestra primera alternativa de descontaminación por radiación. La presentación liofilizada presenta ventajas como la reducción de un 75% de humedad, lo que lo hace menos susceptible a una contaminación. Asimismo, presenta una estructura porosa de fácil hidratación y la capacidad de transportarlo a una temperatura no estricta, que reduce el precio de transporte y con ello el costo del producto (21) (24).

Por otro lado, el medio mezclado sin previo tratamiento de esterilización mostró contaminación bacteriana y fúngica propio del estado natural en que se encuentran, a temperatura ambiente o en refrigeración, pero expuestos al ambiente cuando se pesan.

El medio liofilizado, sin ninguna modificación a su ambiente de elaboración su preparación, y el medio mezclado fueron descontaminados mediante la exposición a radiación gamma y el reactivo antimicrobial PANTA. Estos tratamientos son importantes, en especial en el medio mezclado porque no presenta tratamiento previo de esterilización. Al final de esta descontaminación obtuvimos los “medios modificados” como denominados a las presentaciones estériles de los dos medios: Medio liofilizado (ambiente con UV-C), medio liofilizado con radiación gamma, medio liofilizado más PANTA medio mezclado con radiación gamma, y medio mezclado más PANTA.

El medio liofilizado, esterilizado con radiación gamma y con acondicionamiento UV, presentó un porcentaje de crecimiento, en las 4 diluciones, de *M. smegmatis* similar al crecimiento en el MODS convencional. Sin embargo, los resultados en el conteo de microcolonias mostró una ligera diferencia frente al crecimiento de la micobacteria en el medio mezclado y el control ($p \leq 1$). La esterilización con radiación gamma implica la exposición de la muestra a rayos con un alto nivel energético, que dañan el material genético de los microorganismos contaminantes y evitan su multiplicación. En este concepto se ha logrado esterilizar diversos productos biológicos (9) (25). Sin embargo, algunos componentes son sensibles a esta radiación, como es el caso de vitaminas o macronutrientes que están presentes en el medio de cultivo: Albumina, suero bovino o caseína (26). Asimismo, el medio liofilizado contiene 15% de humedad a diferencia del medio mezclado, producto seco; este microambiente hidratado, favorece la difusión de los rayos gamma en la muestra por medio de productos de radiación difusibles principalmente del disolvente,

intensificando el daño (27). Esta situación no se observa en las muestras secas como el medio mezclado, al carecer de productos de radiación difusibles y el posible daño por radiación es por el efecto directo de la radiación a las moléculas (27).

Los medios mezclados y liofilizados fueron esterilizados eficientemente con el reactivo antimicrobiano PANTA. Pero, mostraron un crecimiento disminuido de *M. smegmatis* al día 2 de incubación. Este cultivo tuvo un seguimiento hasta el día 5, donde mostró un nulo o mínimo crecimiento de la cepa, confirmando su acción inhibitoria para esta cepa micobacteriana no antes reportada. El PANTA es una mezcla liofilizada de agentes antimicrobianos que tiene como blanco la eliminación de bacterias orales, por lo que eliminó contaminación fúngica y bacteriana (3). Este reactivo es utilizado para descontaminar las muestras de esputo para el diagnóstico en MODS, por lo que acompaña el crecimiento de *M. tuberculosis* en un cultivo positivo (3). En este sentido, los medios mezclado y liofilizado, esterilizado con PANTA podrían ser usados para un estudio posterior en *M. tuberculosis*.

El porcentaje de crecimiento de la cepa en los medios modificados con PANTA, en las 4 diluciones, son menores al control MODS (Figura 6) ($p < 0.05$). El PANTA redujo el porcentaje de crecimiento dependiendo de la dilución de la cepa, a mayor dilución el efecto es mayor; así, en la dilución mayor (1:50000) el crecimiento fue casi nulo. No hay reportes que indiquen un efecto negativo del PANTA en el crecimiento de *M. smegmatis*. Por lo que, este trabajo presenta una primera información de este efecto.

El porcentaje de crecimiento de *M. smegmatis* en los medios modificados sin PANTA, en las 4 diluciones, son similares al porcentaje de crecimiento en el medio MODS convencional (Figura 7) ($p > 0.05$), lo que indica a ambas presentaciones del medio de cultivo como aptas para el crecimiento de la cepa de micobacteria utilizada. Las cuatro diluciones trabajadas en este estudio partieron de la dilución 1:1000, utilizada en el control positivo del método MODS convencional en el diagnóstico de *M. tuberculosis*. Diluciones mayores se utilizaron para evaluar el grado de eficiencia de los medios de cultivo modificados. Esto permitió conocer la capacidad de los medios para permitir el crecimiento de bajas cargas bacilares como podría suceder en el futuro uso de estos medios para el diagnóstico de personas con cargas bajas de *M. tuberculosis*. Los resultados mostraron que el crecimiento de *M. smegmatis* en los medios liofilizado, liofilizado con radiación gamma y mezclado con radiación gamma tiene un porcentaje de crecimiento similar al control, infiriendo así que las dos presentaciones del medio de cultivo, liofilizado y mezclado, poseen propiedades similares al medio convencional MODS

El método de cultivo MODS para diagnosticar *M. tuberculosis* ha demostrado tener una alta rentabilidad diagnóstica frente al resto de pruebas convencionales, siendo una prueba costo efectiva. Sin embargo, a pesar de toda la evidencia favorable pocos países lo han implementado. Para simplificar el equipamiento necesario para la implementación del MODS, investigadores de la Universidad Nacional de Ingeniería y la Universidad Peruana Cayetano Heredia han desarrollado alternativas económicas para reemplazar el microscopio invertido incluso hasta con cámaras digitales convencionales (28) (29).

En el método MODS la presencia de *M. tuberculosis* se determina como positivo o negativo en el que la presencia de bacterias ya sea en forma escasa o abundante es detectada. En este estudio se evaluó el crecimiento de *M. smegmatis* en forma cualitativa usando el porcentaje de crecimiento en los medios modificados con respecto al medio MODS convencional y cuantitativa usando el conteo de microcolonias en la dilución más alta (1:50000). El análisis cualitativo

mostró que los medios modificados sin PANTA (mezclado con radiación gamma, liofilizado y liofilizado con radiación gamma) no alteran el porcentaje de crecimiento de *M. smegmatis*. El medio mezclado no fue expuesto a tratamientos previos como homogenización ni autoclavado; por otro lado, el medio liofilizado ha sido homogenizado, autoclavado y liofilizado proceso de deshidratación que de acuerdo a literatura no altera de manera significativa sus propiedades (8)(30); estos procedimientos no afectan al medio 7H9-OADC por lo que el crecimiento de *M. smegmatis* en los medios modificados sin PANTA es similar al control.

En el diagnóstico de *M. tuberculosis*, la prueba MODS se ve afectada por la carga bacteriana en las muestras de esputo. Los pacientes, en período temprano de enfermedad, pueden tener muestras con bajo número de micobacterias dificultando su detección; por lo que conocer diferencias menores en los medios es de utilidad para seleccionar un medio de cultivo. El análisis cuantitativo mostró que solamente el medio mezclado más radiación gamma tiene el número de microcolonias similar al presente en el medio MODS convencional ($p=0.65$). Sin embargo, el número de microcolonias en el medio liofilizado presenta una semejanza con el medio MODS convencional muy cercana a la significancia estadística ($p=0.048$).

Los medios propuestos para el uso como Kit en la prueba de MODS para la detección de *M. tuberculosis* son los medios mezclados con radiación gamma y medio liofilizado. A partir de este trabajo, se sugiere realizar nuevos ensayos con estos medios modificados para el desarrollo de un prototipo de kit de diagnóstico de tuberculosis.

Los resultados de este estudio servirán para el desarrollo de un kit del cultivo MODS con el objetivo reducir la complejidad y el costo de esta prueba evitando la adquisición de los componentes del medio y preparación de los medios.

VIII. CONCLUSIONES

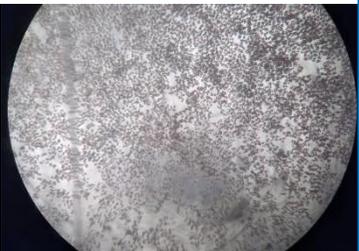
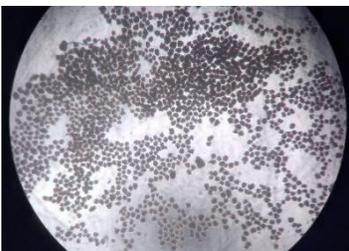
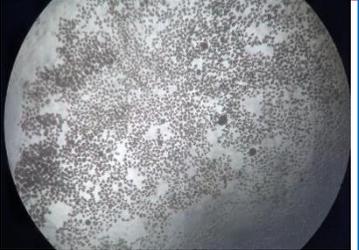
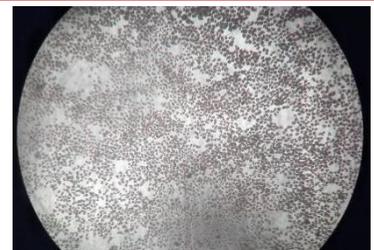
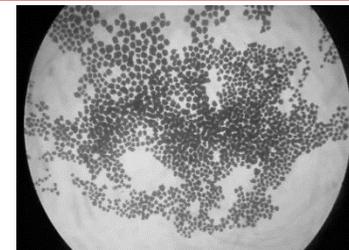
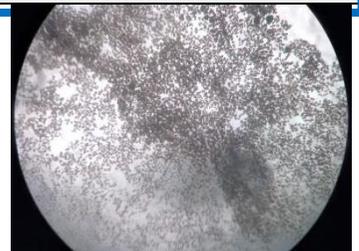
- La exposición a radiación gamma y la incorporación del suplemento antimicrobiano PANTA esterilizaron a los medios liofilizados y mezclados.
- El medio liofilizado en un ambiente estéril acondicionado; el medio liofilizado y mezclado esterilizados con radiación gamma mostraron un porcentaje de crecimiento de *M. smegmatis* similar al crecimiento en el medio convencional MODS.
- El medio mezclado con radiación gamma mostró similar número de microcolonias al medio convencional, mientras que el medio liofilizado y el medio liofilizado con radiación gamma mostraron menor número de microcolonias con respecto al medio convencional.

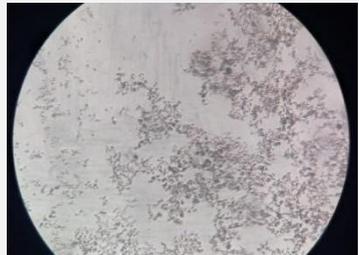
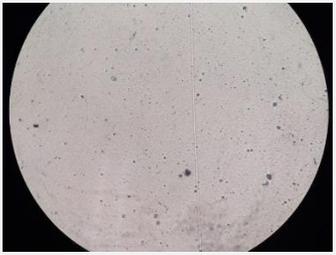
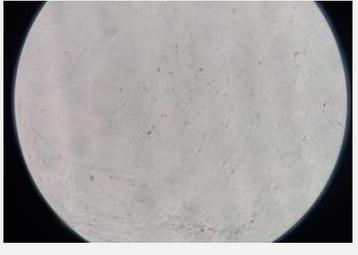
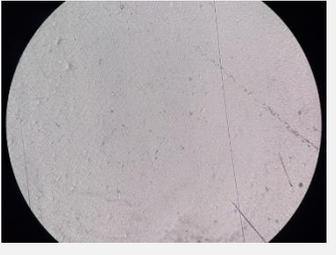
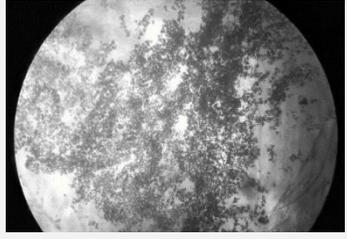
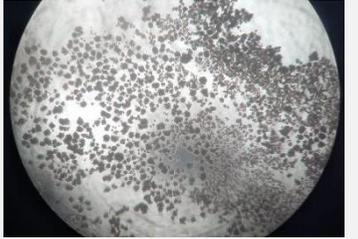
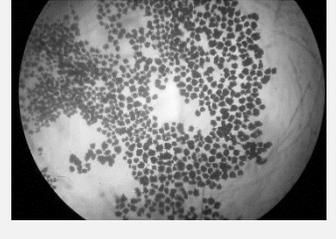
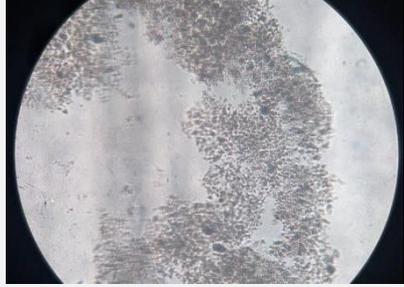
IX. REFERENCIAS

1. Furin J, Cox H, Pai M. Tuberculosis. Vol. 393, The Lancet. Lancet Publishing Group; 2019. p. 1642–56.
2. OPS. Tuberculosis en las Américas 2018. Washington; 2018.
3. Arnez Durán R, Ayllón Anzaldo LA, Castro Soto; Rosario, Beltrán Lozano D. El Método MODS, una Alternativa para el Diagnóstico de la Tuberculosis y la Detección de Cepas Multidrogoresistentes. 2010.
4. Caviedes L, Tien-Shun L, Gilman RH, Sheen P, Spellman E, Lee EH, et al. Rapid, efficient detection and drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis in sputum by microscopic observation of broth cultures. J Clin Microbiol. 2000 ;38(3):1203–8.
5. 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; 9(9):e107258.
6. Spring S. 15 Preservation of Thermophilic Microorganisms. Methods Microbiol. 2006; 35:349–68.
7. Sivaswami J, Sharma D. Mycobacterium smegmatis and tuberculosis. Trends in microbiology. 2002.
8. Dick T, Heng B, Murugasu B, et al. Oxygen depletion induced dormancy in Mycobacterium smegmatis. 1998.
9. Antony J, SunsarsT, Ranjitha J, et al. Features of the biochemistry of Mycobacterium smegmatis, as a possible model for Mycobacterium tuberculosis. 2020.
10. Zhang AT, Montgomery MG, Leslie AGW, Cook GM, Walker JE. The structure of the catalytic domain of the ATP synthase from Mycobacterium smegmatis is a target for developing antitubercular drugs. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019;116(10):4206–11.
11. Klann A, Belanger A, Abanes A, et al. Characterization of the dnaG Locus in Mycobacterium smegmatis Reveals Linkage of DNA Replication and Cell Division. J Bacteriol. 1998.
12. Spring S. 15 Preservation of Thermophilic Microorganisms. Methods Microbiol. 2006; 35:349–68.
13. Merabishvili M, Vervaet C, Pirnay J-P, De Vos D, Verbeken G, Mast J, et al. Stability of Staphylococcus aureus Phage ISP after Freeze-Drying (Lyophilization). Lin B, editor. PLoS One. 2013.
14. Ben Amira A, Blecker C, Richel A, Arias AA, Fickers P, Francis F, et al. Influence of the ripening stage and the lyophilization of wild cardoon flowers on their chemical composition, enzymatic activities of extracts and technological properties of cheese curds. Food Chem . 2018.
15. Da Costa Neto JJG, Gomes TLM, Justo TF, Pereira KS, Amaral PFF, Rocha Leão MHM, et al. Microencapsulation of tiger nut milk by lyophilization: Morphological characteristics, shelf life and microbiological stability. Food Chem. 2019 Jun 30; 284:133–9.
16. Chan MY, Dutill TS, Kramer RM. Lyophilization of adjuvanted vaccines: Methods for

- formulation of a thermostable freeze-dried product. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc.; 2017. p. 215–26.
17. Ramírez Navas JS. Liofilización de alimentos. Colombia: Revista ReCiTeIA. 2006.
 18. Andrade A, Cetto A, Gertsch J, Ndhkala AR, Hazekamp A, Ni H. Evaluating the Effects of Gamma-Irradiation for Decontamination of Medicinal Cannabis. *Front Pharmacol*. 2016.
 19. Kim S, Jeong JO, Lee S, Park JS, Gwon HJ, Jeong SI, et al. Effective gamma-ray sterilization and characterization of conductive polypyrrole biomaterials. *Sci Rep*. 2018 Dec 1;8(1).
 20. Islam MM, Sharifi R, Mamodaly S, Islam R, Nahra D, Abusamra DB, et al. Effects of gamma radiation sterilization on the structural and biological properties of decellularized corneal xenografts. *Acta Biomater*. 2019 Sep 15;96:330–44.
 21. Peres RL, Palaci M, Loureiro RB, Dietze R, Johnson JL, Maciel EL. Reduction of contamination of mycobacterial growth indicator tubes using increased PANTA concentration. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2011.
 22. Den Hertog AL, Menting S, Smienk ET, Werngren J, Hoffner S, Anthony RM. Evaluation of a microcolony growth monitoring method for the rapid determination of ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Infect Dis* . 2014;14(1):380.
 23. Mauerhofer L, Pappenreiter P, Paulik C, et al. Métodos de cuantificación del crecimiento y la productividad en microbiología y biotecnología anaeróbica. *Folia Microbiol*. 2018
 24. Coronel J, Roper M, Caviedes L, Moore DA. MODS: Guía del usuario. Microscopic observation drug susceptibility as say. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Laboratorio de Investigación y Desarrollo. 2008.
 25. Parzanese TM. Tecnologías para la Industria Alimentaria Liofilización de alimentos. 2019.
 26. Shahbaz HM, Akram K, Ahn JJ, Kwon JH. Worldwide Status of Fresh Fruits Irradiation and Concerns about Quality, Safety, and Consumer Acceptance. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2016 Aug 17;56(11):1790– 807.
 27. Caulfield CD, Cassidy JP, Kelly JP. Effects of gamma irradiation and pasteurization on the nutritive composition of commercially available animal diets. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2008.
 28. Kempner ES. Direct effects of ionizing radiation on macromolecules. Vol. 49, *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics*. NIH Public Access; 2011. p. 827–31.
 29. Zimic M, Velazco A, Comina G, Coronel J, Fuentes P, Luna CG, et al. Development of low-cost inverted microscope to detect early growth of *Mycobacterium tuberculosis* in MODS culture. *Plos One*. 2010; 5(3):e9577.
 30. Comina G, Mendoza D, Velazco A, Coronel J, Sheen P, Gilman RH, et al. Development of an automated MODS plate reader to detect early growth of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Microsc*. 2011; 242(3):325–

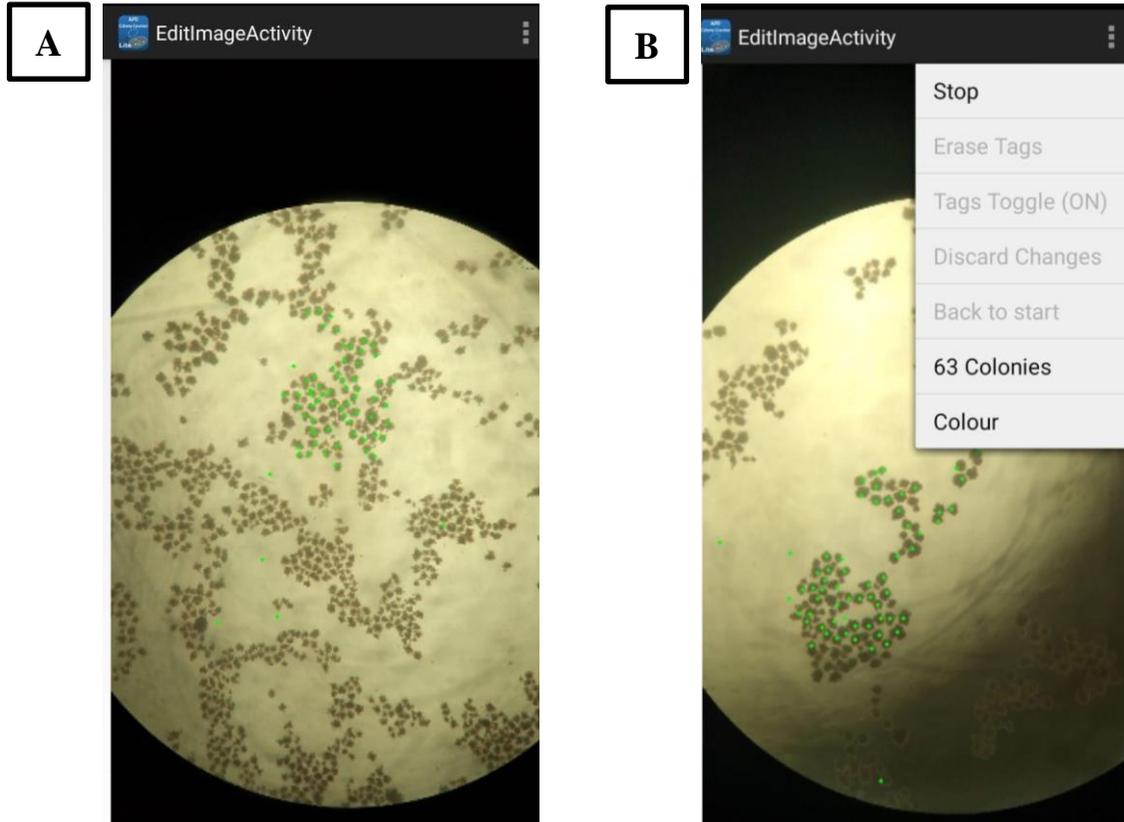
X. ANEXO 1

| | Dilución de <i>M. smegmatis</i> (McFarland 1) | | | |
|--|---|--|---|---|
| Medio de cultivo | 1:1000 | 1:5000 | 1:10000 | 1:50000 |
| Medio convencional MODS (Control) |  |  |  |  |
| Porcentaje de crecimiento (%) | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Medio modificado |  |  |  |  |
| Porcentaje de crecimiento (%) | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Medio Liofilizado + radiación gamma |  |  |  |  |

| | | | | |
|---|--|---|--|--|
| Medio liofilizado + PANTA |  |  |  |  |
| Porcentaje de crecimiento (%) | 10 | 0 | 0 | 0 |
| Medio mezclado + Radiación gamma |  |  |  |  |
| Porcentaje de crecimiento (%) | 90 | 90 | 80 | 80 |
| Medio mezclado +PANTA |  |  |  |  |
| Porcentaje de crecimiento (%) | 20 | 5 | 5 | 0 |

Evaluación cualitativa . Porcentaje de crecimiento de *M. smegmatis* en los medios modificados tomando como referencia el crecimiento de la misma cepa en el medio convencional MODS (control) (rojo) de manera independiente para cada dilución (azul).

ANEXO 2



Evaluación cuantitativa Número de microcolonias en la dilución 1:50000 de *M.smegmatis*, mediante la captura de imágenes al pozo de cultivo y el uso de la aplicación móvil APD Colony Counter. **A.** Medio convencional MODS **B.** Medio modificado