

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE FARMACIA



**TESIS DOCTORAL**

Efecto de la claritromicina sobre biofilms del  
complejo *Mycobacterium avium*

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Arij Akir

DIRIGIDA POR

Jaime Esteban Moreno



Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Farmacia

Plan de Doctorado en Microbiología y Parasitología



UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE  
MADRID

**Tesis Doctoral**

Efecto de la Claritromicina Sobre Biofilms Del  
Complejo *Mycobacterium avium*.

**Memoria para optar al grado de Doctor presentada por**

Arij Akir

**Director de la Tesis Doctoral**

Jaime Esteban Moreno

Madrid, 2024







## **AGRADECIMIENTOS**

No te rindas, ni te acobardes. Desafíate a ti mismo, intenta una y otra vez ese largo camino ya que su destino es tener un final que te satisfaga, si te esfuerzas en él con sinceridad, paciencia y dedicación. Y aquí termina el viaje del doctorado para comenzar un recorrido lleno de éxitos y avances prácticos y científicos. Fue un periodo lleno de dificultades, comenzando por estar en otro país y hablar otro idioma distinto al mío, con obstáculos en la vida social que intenté superar con todo mi esfuerzo para que no fueran un obstáculo para mí. Todo ello me ha hecho ser más fuerte y tener más dedicación en mi vida profesional y personal. Todo lo que he alcanzado ha sido gracias a la ayuda de Dios en los momentos difíciles y también los más felices. En estos momentos de felicidad, solo puedo expresar mi más sincero agradecimiento y aprecio a:

Mis hijas, Ghna Allah y Malla de las que he sido tanto madre como padre, y ellas han sido como una hermana y una amiga en cada momento para mí. Sé muy bien que están orgullosas de este gran éxito que han esperado durante años para que sea un ejemplo digno y honorable para ellas. A mi familia en Libia: han sido mi apoyo principal a pesar de la distancia, han estado conmigo paso a paso (mi padre Hussain, mi madre Salha, mis hermanos Amer, Aboubaker, Ossama, Akram, Ayman, mis hermanas Aisha, Mouna, Warda, Noura, Najat). Y todos mis sobrinos y sobrinas en especial Abdou. Sé muy bien que están esperando estos momentos con muchas ganas y orgullo. Gracias por vuestro apoyo incondicional, por siempre estar a mi lado y cuidarme como vuestra hermana pequeña. No lo podría haber conseguido sin vosotros.

Mi director: el Dr. Jaime Estaban quien ha dado todo lo posible a pesar de sus ocupaciones, pero siempre ha estado para ayudarme y guiarme en este camino. A los jefes de Microbiología, el Dr. Ignacio y el Dr. Ricardo.

Al equipo del laboratorio de Microbiología del Hospital Fundación Jiménez Díaz: todos los presentes en el laboratorio, especialmente a Curra, Africa y Ester. Gracias por vuestro apoyo.

Profesores del colegio de mis hijas: Ana Rosa Ventura, Rafa Calcerrada y Beatriz Ayuso. Gracias por vuestro apoyo.

A mis amigas, Abrar, Huda, Ana y a todas las personas que me han brindado su apoyo durante esta etapa de mi vida. Gracias por el apoyo moral en todo momento y no dejar que me rinda nunca.

Y, por último, agradecer a mi país de origen Libia y al país que me ha acogido con tanto amor, España y al que también considero como mi país.

Este trabajo ha sido realizado gracias a una ayuda del Gobierno de Libia para la doctoranda, y al Proyecto de Investigación del Instituto de Salud Carlos III PI18/01068 (cofinanciado por European Regional Development Fund. ERDF, a way to build Europe) y al proyecto CIBERINFEC (CB21/13/00043).

# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	5
<b>PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES A CONGRESOS RELACIONADAS CON LA PRESENTE TESIS.</b> .....	7
<b>RESUMEN</b> .....	9
<b>SUMMARY</b> .....	11
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	13
1.1. El género <i>Mycobacterium</i> . .....	15
1.2. El complejo <i>Mycobacterium avium</i> .....	17
1.2.1. Definición.....	17
1.2.2. Taxonomía.....	18
1.2.3. Epidemiología. ....	18
1.2.4. Patología humana. ....	21
1.2.5. Diagnóstico.....	22
1.2.6. Tratamiento. ....	27
1.2.7. Sensibilidad <i>in vitro</i> y mecanismos de resistencia antibiótica. ....	32
1.3. Biofilms.....	37
1.3.1. Definición.....	37
1.3.2. Crecimiento planctónico frente a crecimiento en biofilms.....	38
1.3.3. La adherencia primaria y el desarrollo del biofilm. ....	39
1.3.4. Regulación del proceso de formación del biofilm.....	41
1.3.5. Biofilms bacterianos e infección. ....	45
1.3.6. Biofilms y micobacterias.....	46
<b>2. HIPÓTESIS.</b> .....	49
<b>3. OBJETIVOS DEL ESTUDIO.</b> .....	53
3.1. Objetivos Generales: .....	55
3.2. Objetivos Específicos:.....	55

<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>57</b>
4.1. Micobacterias empleadas en el estudio. ....	59
4.2. Análisis estructural mediante microscopio de láser confocal (CLSM). ....	59
4.3. Sensibilidad frente a claritromicina del biofilm y bacterias planctónicas. ....	59
4.3.1. Sensibilidad antimicrobiana de bacterias planctónicas. ....	59
4.3.2. Sensibilidad antimicrobiana de bacterias sésiles. ....	60
4.4. Estudio de la concentración mínima de prevención de formación de biofilms frente a claritromicina. ....	61
4.5. Estudio del efecto de claritromicina en la estructura del biofilm mediante microscopio de láser confocal. ....	61
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>63</b>
5.1. Análisis estructural mediante CLSM. ....	65
5.1.1. Variaciones intraespecie para <i>M. avium</i> . ....	66
5.1.2. Variaciones intraespecie para <i>M. intracellulare</i> . ....	68
5.1.3. Variaciones intraespecie para <i>M. chimaera</i> . ....	70
5.2. Sensibilidad frente a claritromicina de biofilm y bacterias planctónicas (CMI, CMB, CMIB, CMEB). ....	72
5.3. Estudio de la concentración de prevención de formación de biofilms frente a claritromicina. ....	73
5.4. Estudio del efecto de claritromicina en la estructura del biofilm mediante CLSM. ....	74
<b>6. DISCUSIÓN.....</b>	<b>77</b>
6.1. Análisis estructural mediante CLSM. ....	79
6.2. Sensibilidad frente a claritromicina de biofilm y de las bacterias planctónicas (CMI, CMB, CMIB, CMEB). ....	81
6.3. Estudio de la concentración de prevención de formación de biofilms de claritromicina. ....	84
6.4. Estudio del efecto de claritromicina en la estructura del biofilm mediante CLSM. ....	85
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>89</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>93</b>

**ANEXOS: PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA PRESENTE TESIS**

**DOCTORAL..... 105**



## ABREVIATURAS

ARNr 16S: ARN ribosómico 16S

ATS: American Thoracic Society

BAAR: ácido-alcohol resistentes

BPC: susceptibilidad de biopelícula

BDI: dos veces al día

CAMHB: caldo Mueller-Hinton ajustado catiónicamente

CPB: concentración de prevención del biofilm

CHL: claritromicina

CIE-9: Clasificación Internacional de Enfermedades

CLM: microscopía de láser confocal

CMB: concentración mínima bactericida

CMI: concentración mínima inhibitoria

CMEB: Concentración Mínima de Erradicación de Biopelícula

CMIB: Concentración Mínima Inhibitoria de Biopelícula

EIP: enfermedad infecciosa pulmonar

ELISA: enzimoimmunoanálisis de adsorción

EPOC: enfermedad obstructiva crónica

EPS: polímeros extracelulares

ESKAPE: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter spp*

IDSA: Infectious Diseases Society of America

IMC: Índice de masa corporal

MAA: *Mycobacterium avium subespecie avium*

MAC: complejo *Mycobacterium avium*

MAH: *Mycobacterium avium subespecie hominis*

MAI: *Mycobacterium avium intracellulare*

MAP: *Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis*

MTC: *Mycobacterium tuberculosis*

MNT: complejo de micobacterias no tuberculosas

MOTT: *Mycobacterium* other than tuberculosis

PNTM: micobacterias pulmonares no tuberculosas

PRA: análisis de los patrones de restricción

QD: una vez al día

SPE: sustancias poliméricas extracelulares

TB: tuberculosis

TC: tomografía computarizada

TCAR: tomografía computarizada de alta resolución

SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

VATS: cirugía de toracoscopia videoasistida

VIH: Virus de inmunodeficiencia humana

## **PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES A CONGRESOS RELACIONADAS CON LA PRESENTE TESIS.**

### **Publicaciones:**

1. Muñoz-Egea MC, Akir A, Esteban J. *Mycobacterium* biofilms. *Biofilm*. 2023. 5: 100107. Doi: 10.1016/j.bioflm.2023.100107. Journal Impact Factor (2022): 6.8. Q2 (Microbiology 40/156).

2. Akir A, Senhaji-Kacha A, Muñoz-Egea MC, Esteban J, Aguilera-Correa JJ. Biofilm development by *Mycobacterium avium* complex clinical isolates. Effect of clarithromycin in ultrastructure. *Antibiotics (Basel)*. 2024. 13: 263. Doi: 10.3390/antibiotics13030263. Journal Impact Factor (2022): 4.8. Q1 (Pharmacology & Pharmacy 66/277).

3. Senhaji-Kacha A\*, Akir A\*, Broncano-Lavado A, Esteban J. Biofilm prevention concentration of clarithromycin against clinically relevant species of Nontuberculous Mycobacteria. *Revista Española de Quimioterapia*. 2024. Aceptado. Journal Impact Factor (2022): 1.9. Q4 (Pharmacology & Pharmacy 224/277). \*: First autor.

### **Comunicaciones a congresos:**

1. Akir, J Esteban, JJ Aguilera Correa. Caracterización del biofilm formado por cepas salvajes y de colección de *Mycobacterium avium*. XIV Congreso Nacional de la SEIMC (Virtual, junio 2021).

2. Akir, A. Senhaji-Kacha, M.C. Muñoz-Egea, J. Esteban, John-Jairo Aguilera-Correa. Effect of Clarithromycin in the viability of *Mycobacterium avium* complex species biofilms. 34<sup>th</sup> ECCMID (Barcelona, abril 2024).

3. Senhaji-Kacha, A. Akir, A. Broncano-Lavado, J. Esteban. Biofilm prevention concentration of clarithromycin against clinically relevant species of Nontuberculous Mycobacteria. 34<sup>th</sup> ECCMID (Barcelona, abril 2024).



## RESUMEN

El complejo *Mycobacterium avium* (MAC) es un grupo de bacterias de crecimiento lento pertenecientes a la familia *Mycobacteriaceae*, que se agrupan dentro las micobacterias no tuberculosas (MNT), formado por *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. arosiense*, *M. bouchedurhonense*, *M. chimaera*, *M. colombiense*, *M. marseillense*, *M. timonense*, *M. vulneris* y *M. yongenense*. Se encuentran ampliamente extendidos en el medio ambiente, evidenciándose un incremento acelerado de las infecciones por MAC a nivel mundial, posiblemente debido al incremento de pacientes inmunocomprometidos, consumo de productos de origen animal contaminados, y el contacto directo con la piel, originando una variedad de síntomas que incluyen linfadenitis, infecciones pulmonares e infecciones de la piel y los tejidos blandos. Esto resalta la necesidad de desarrollar métodos moleculares que permitan su correcta identificación, y conocer los mecanismos de patogenicidad para la implementación de tratamientos efectivos. Entre los mecanismos de resistencia a los antibióticos de las MAC se encuentra la formación de biopelículas, no solo en superficies sino también en la interfaz del medio aéreo, gracias a la composición celular distintiva de la matriz extracelular y de los elevados niveles de lípidos de la pared celular de las micobacterias. En este trabajo se estudió el efecto de la claritromicina sobre biofilms formados por micobacterias de crecimiento lento del MAC, específicamente *M. avium*, *M. intracellulare* y *M. chimaera*, usando cepas procedentes de pacientes, así como cepas de colección, en las que se analizó la formación del biofilm, se evaluó la sensibilidad del biofilm a la claritromicina mediante la determinación de los valores de CMIB y CMEB, y se estudió la sensibilidad planctónica por microdilución del complejo *M. avium* a partir de los valores de CMI y CMB. Los resultados permitieron determinar que cada una de las especies estudiadas forma biofilms con características propias, pero no distintivas de especie, permitiendo concluir que la formación de las biopelículas por parte de los miembros del complejo MAC depende de la cepa en estudio, sin que se observen diferencias evidentes entre las especies *M. avium*, *M. intracellulare* y *M. chimaera*. Por otra parte, los valores de CMI para *M. avium* y *M. chimaera* para la forma planctónica fueron inferiores a los valores de CMIB, indicando el incremento de la resistencia a los antibióticos en su forma sétil; mientras que los valores de CMEB de *M. intracellulare* y *M.*

*chimaera* fueron superiores a los de la CMB, indicando un incremento de la resistencia a la claritromicina, siendo necesarias dosis superiores para conseguir la muerte de las bacterias del biofilm. No se observaron patrones específicos de los valores de CPB que indiquen una tendencia inter o intraespecie, en general, los valores CPB son superiores a los de CMI, demostrando que la claritromicina inhibe el crecimiento de bacterias planctónicas, pero es menos eficiente en la prevención de la formación del biofilm, o en la eliminación del mismo cuando ya se ha instaurado y formado por completo. Se observó una correlación negativa entre la viabilidad de las bacterias contenidas en el biofilm en función del tiempo de tratamiento, siendo fuerte o débil dependiendo de la cepa, sin que sea posible establecer un patrón dependiente de la especie. Por último, no fue posible esclarecer si el efecto de la claritromicina en la formación del biofilm puede ser atribuido a la edad del biofilm o a la duración del tratamiento, aunque la edad del biofilm parece ser un factor fundamental para la resistencia a la claritromicina, siendo necesaria la aplicación de tratamientos prolongados que incrementan la posibilidad de aparición de resistencia a los macrólidos. Estos resultados hacen evidente que son necesarios más estudios para comprender la formación de biopelículas por parte de MAC que para determinar tratamientos más específicos útiles en pacientes con infecciones relacionadas con MAC.

## SUMMARY

The *Mycobacterium avium* complex (MAC) is a group of slow-growing bacteria belonging to the Mycobacteriaceae family, classified as non-tuberculous mycobacteria (NTM), consisting of *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. arosiense*, *M. bouchedurhonense*, *M. chimaera*, *M. colombiense*, *M. marseillense*, *M. timonense*, *M. vulneris*, and *M. yongenense*. They are widely distributed in the environment, with an accelerated increase in MAC infections worldwide, possibly due to the rise in immunocompromised patients, consumption of contaminated animal products, and direct skin contact, leading to various symptoms including lymphadenitis, pulmonary infections, and skin and soft tissue infections. This highlights the need for developing molecular methods for accurate identification and understanding the pathogenic mechanisms for effective treatments. Among MAC antibiotic resistance mechanisms is the formation of biofilms, not only on surfaces but also at the air-medium interface, facilitated by the distinctive cellular composition of the extracellular matrix and high levels of lipid in the cell wall of mycobacteria.

This study investigated the effect of clarithromycin on biofilms formed by slow-growing MAC mycobacteria, specifically *M. avium*, *M. intracellulare*, and *M. chimaera*, using strains from patients as well as collection strains. Biofilm formation was analyzed, biofilm sensitivity to clarithromycin was evaluated by determining Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) values, and planktonic sensitivity was studied through microdilution of the *M. avium* complex from MIC and MBC values. Results showed that each studied species forms biofilms with distinct characteristics but not species-specific, concluding that biofilm formation by MAC complex members depends on the strain under study, with no apparent differences among *M. avium*, *M. intracellulare*, and *M. chimaera* species.

Furthermore, MIC values for *M. avium* and *M. chimaera* planktonic form were lower than their respective MBC values, indicating increased antibiotic resistance in their sessile form. Conversely, *M. intracellulare* and *M. chimaera* MBC values were higher than their MIC values, indicating increased resistance to clarithromycin, requiring higher doses for bacterial biofilm death. No specific patterns of MBC values indicating inter or intra-species

trends were observed. Generally, MBC values were higher than MIC values, demonstrating that clarithromycin inhibits planktonic bacterial growth but is less efficient in preventing biofilm formation or eliminating it once fully formed.

A negative correlation was observed between biofilm bacteria viability and treatment time, being strong or weak depending on the strain, without establishing a species-dependent pattern. Lastly, it was unclear whether the effect of clarithromycin on biofilm formation could be attributed to biofilm age or treatment duration, although biofilm age seems to be a fundamental factor for clarithromycin resistance, necessitating prolonged treatments that increase macrolide resistance possibility. These results underscore the need for further studies to comprehend MAC biofilm formation to determine more specific treatments useful in patients with MAC-related infections.

# 1. INTRODUCCIÓN



### 1.1. El género *Mycobacterium*.

*Clasificación taxonómica del género Mycobacterium: Dominio Bacteria, Filo: Actinomycetota, Clase: Actinomycetia, Orden: Microbacteriales, Familia: Mycobacteriaceae, Género: Mycobacterium. (Lehmann and Neumann 1896 (Approved Lists 1980)).*

Históricamente, las dos primeras especies descritas fueron *Mycobacterium leprae* y *Mycobacterium tuberculosis*, pero poco después comenzaron a describirse otros microorganismos de características similares que se agruparon dentro de las denominadas micobacterias no tuberculosas o micobacterias ambientales (1). En la actualidad, se han descrito más de 200 especies dentro de este género, las cuales se caracterizan por ser bacterias aerobias, no móviles, no productoras de endosporas y resistentes al ácido-alcohol (BAAR). Aunque se les considera bacterias Gram positivas, no retienen el colorante violeta, por lo que se emplean colorantes especiales como los arilmetanos para su tinción (2). Estas bacterias presentan una pared celular más gruesa y contienen una abundancia de diferentes moléculas de lípidos, lo que les confiere una resistencia superior frente a diversas agresiones medioambientales, incluyendo varios tipos de antibióticos. Esto les permite sobrevivir durante meses en casi cualquier superficie resguardada de la luz solar, ya que son resistentes a los desinfectantes, la congelación y la desecación, pero sensibles al calor y a la luz ultravioleta (3).

Las especies cultivables del género *Mycobacterium* se han dividido tradicionalmente en dos grandes grupos: el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC) y el grupo denominado micobacterias no tuberculosas (MNT) (Figura 1). El complejo *M. tuberculosis* incluye especies como *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti* y otras patógenas de animales (4). Todas ellas comparten más del 95% de homología en su material genético, lo que permite agruparlas en un mismo clado y ha permitido el desarrollo de sondas universales capaces de detectarlas a todas. Se les nombra de manera general como bacilos tuberculosos, siendo todos capaces de desarrollar la enfermedad conocida como tuberculosis en el hospedador, aunque presentan diferencias epidemiológicas, fisiológicas, bioquímicas y genéticas entre sí (5).

Por otro lado, las MNT, también llamadas micobacterias atípicas, micobacterias oportunistas, MOTT (*Mycobacterium other than tuberculosis*) o micobacterias ambientales, representaban alrededor del 10 al 30% de las micobacterias aisladas en los laboratorios clínicos, aunque en la actualidad, en muchos países desarrollados, dicho porcentaje se ha invertido, siendo más frecuentes que *M. tuberculosis* (6). Constituyen un grupo muy heterogéneo, con un gran número de miembros y con grandes dificultades para su sistematización, ya que algunos son ubicuos y otros pueden estar restringidos a ciertos nichos ecológicos. Además, algunas especies pueden ser altamente patógenas (como *M. ulcerans* o *M. marinum*), mientras que sobre otras se desconoce su capacidad para ser el agente etiológico de alguna infección, no habiéndose descrito nunca como causa de infección humana una gran parte de ellas. En este sentido, y debido a sus diferencias en virulencia, el hallazgo de una MNT en un paciente no es suficiente por sí mismo para afirmar que presenta una enfermedad causada por micobacterias, denominada micobacteriosis (7,8). Por lo tanto, se han desarrollado guías para evaluar su significado clínico de forma sistematizada, facilitando así el manejo de los pacientes con micobacteriosis (8,9).

<b><i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex</b>	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
<i>Mycobacterium africanum</i>	
<i>Mycobacterium bovis</i>	
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG	
<b>Micobacterias No Tuberculosas (MNT)</b>	
De crecimiento lento:	De crecimiento rápido:
Micobacterias no cromógenas:	Micobacterias no cromógenas:
<i>Mycobacterium avium</i> complex	<i>Mycobacterium abscesus</i>
<i>Mycobacterium celatum</i>	<i>Mycobacterium chelonae</i>
<i>Mycobacterium gastrii</i>	<i>Mycobacterium fortuitum</i>
<i>Mycobacterium genavense</i>	<i>Mycobacterium mucogenicum</i>
<i>Mycobacterium haemophilum</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
<i>Mycobacterium malmoense</i>	
<i>Mycobacterium shigmoidei</i>	
<i>Mycobacterium terrae</i> complex	
<i>Mycobacterium triviale</i>	
<i>Mycobacterium ulcerans</i>	
<i>Mycobacterium xenopi</i>	
Micobacterias cromógenas:	Micobacterias cromógenas:
<i>Mycobacterium asiaticum</i>	<i>Mycobacterium phlei</i>
<i>Mycobacterium flavescens</i>	<i>Mycobacterium vaccae</i>
<i>Mycobacterium gordonae</i>	
<i>Mycobacterium kansasii</i>	
<i>Mycobacterium marinum</i>	
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	
<i>Mycobacterium simiae</i>	
<i>Mycobacterium szulgai</i>	
<i>Mycobacterium xenopi</i>	

**Figura 1. Principales micobacterias aisladas a partir de muestras clínicas. La clasificación de realiza en función de las características de crecimiento y pigmentación. Fuente: Vincent *et al.* (2003).**

## 1.2. El complejo *Mycobacterium avium*.

### 1.2.1. Definición.

El complejo *Mycobacterium avium* (MAC) es un grupo de micobacterias de crecimiento lento pertenecientes a la familia *Mycobacteriaceae*, que se agrupan dentro del conjunto de micobacterias no tuberculosas (MNT) (10). Las bacterias pertenecientes a este complejo son responsables de la mayoría de las infecciones humanas relacionadas con micobacterias no tuberculosas y clásicamente estaba formado por *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium intracellulare*. Los miembros de MAC se encuentran ampliamente distribuidos en el medio ambiente, causando infecciones oportunistas en humanos y animales. Entre las más relevantes para los humanos se encuentran las producidas por *M. avium*, *M. intracellulare* y, en los últimos años, *Mycobacterium chimaera*, lo que

constituye una creciente amenaza para la salud pública, especialmente en países desarrollados (10–12).

Este aumento acelerado de las infecciones por MAC a nivel mundial posiblemente se debe al incremento de pacientes inmunocomprometidos, al consumo de productos de origen animal contaminados y al contacto directo con la piel, ya que se trata de micobacterias ambientales cuyo hábitat es predominantemente acuoso. Esto origina una amplia variedad de síndromes que incluyen linfadenitis, infecciones pulmonares e infecciones de la piel y los tejidos blandos. Esto subraya la necesidad de desarrollar métodos moleculares que permitan su correcta identificación, así como de conocer más en profundidad los mecanismos de patogenicidad de estos microorganismos, con el objetivo de desarrollar tratamientos efectivos para estas patologías (13).

### **1.2.2. Taxonomía.**

Aunque, como ya se ha comentado, originalmente el complejo incluía esencialmente dos especies, *M. avium* y *M. intracellulare*, el desarrollo de las técnicas de biología molecular ha permitido una mayor caracterización del mismo, identificándose ocho especies más: *Mycobacterium arosiense*, *Mycobacterium bouchedurhonense*, *M. chimaera*, *Mycobacterium colombiense*, *Mycobacterium marseillense*, *Mycobacterium timonense*, *Mycobacterium vulneris* y *Mycobacterium yongonense* (5,10,11). Sin embargo, es importante tener en cuenta que el estatus taxonómico de algunas de ellas todavía está en debate.

Por otra parte, se han descrito cuatro subespecies en *M. avium* (subsp. *hominissuis*, subsp. *paratuberculosis*, subsp. *silvaticum* y subsp. *avium*), siendo de especial relevancia *M. avium* subsp. *hominissuis*, ya que es el principal agente causal de enfermedad pulmonar e incluso muerte en los seres humanos, especialmente en América del Norte, Asia y Europa (14). Además, algunas de las especies anteriormente mencionadas han sido reclasificadas como subespecies de *M. intracellulare* (subsp. *intracellulare*, subsp. *chimaera* y subsp. *yongonense*). De hecho, la situación taxonómica actual ha llevado a la publicación de artículos recientes buscando establecer una nomenclatura práctica para los laboratorios clínicos que tenga en cuenta todo lo anterior (15), con el objetivo de evitar confusiones que puedan afectar al correcto manejo de los pacientes..

### **1.2.3. Epidemiología.**

La estimación de la prevalencia de las micobacteriosis ha enfrentado varios retos a lo largo del tiempo. Entre estos, es importante mencionar la ausencia de declaración obligatoria en varios países desarrollados, lo que significa que la información disponible se conoce a través de estudios en regiones y no en países, lo que introduce sesgos en el procesamiento de la información. En segundo lugar, las pruebas diagnósticas disponibles ofrecen en algunos casos una sensibilidad muy baja, especialmente en muestras ambientales. Y en tercer lugar, no todas las personas con cultivos positivos para el MAC presentan enfermedad, lo que dificulta la diferenciación entre colonización y enfermedad.

Las mejores estimaciones de la incidencia se han realizado mediante el análisis de grandes conjuntos de datos, utilizando la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE-9) y evaluaciones de laboratorio. Por ejemplo, Marras et al. (16) determinaron una incidencia de 14,1 casos por 100.000 habitantes en el año 2003, utilizando los datos de laboratorios provinciales de Ontario (Canadá). Por otro lado, Cassidy et al. (17) determinaron una incidencia de 5,6 casos por 100.000 habitantes para enfermedades pulmonares relacionadas con MAC en Oregon, con una prevalencia mayor en mujeres (6,4 casos por 100.000) que en hombres (4,7 casos por 100.000), y más alta en personas mayores de 50 años (15,5 casos por 100.000). En otro informe de Oregon, la prevalencia general de enfermedad pulmonar por MNT fue de 8,6 casos por 100.000 habitante (18).

En líneas generales, la información proporcionada por diferentes estudios sugiere que la prevalencia de infecciones pulmonares por MNT es mayor en personas mayores de 50 años, especialmente en pacientes con diversos factores de riesgo.

Por otro lado, se han utilizado los códigos de la CEI-9 para determinar la prevalencia de la enfermedad. Según esta información, para el año 2007 se encontraron 47 casos por cada 100.000 habitantes en Estados Unidos (19); sin embargo, esta estimación subestima el número de casos, ya que alrededor del 70% de los pacientes infectados con MNT no se encontraban hospitalizados, por lo que se desconoce con certeza el número real de casos en Estados Unidos. Para abordar esta situación, Strollo et al. (20) utilizaron la información de los beneficiarios de Medicare en el período 2003-2007, utilizando la codificación CEI-9 e incluyendo la información de las personas menores de 65 años, encontrando un total de 82.244 casos en Estados Unidos en 2005.

A nivel mundial, se ha observado un aumento en los casos de enfermedades pulmonares causadas por MNT, especialmente por MAC, con informes en Canadá, Taiwán, Países Bajos, Australia y Estados Unidos. Las razones que propician este aumento de la incidencia no están claras, pero sin duda, el mejoramiento de las técnicas de diagnóstico y el mayor conocimiento de la enfermedad contribuyen a una mejor detección de las MAC. Otros factores que pueden contribuir al aumento de la prevalencia son el envejecimiento de la población, cambios en el huésped, aumento de las personas inmunocomprometidas y la disminución de la inmunidad cruzada por *M. tuberculosis*. Brode et al. (21) realizaron una revisión sistemática que les permitió concluir que en 16 áreas geográficas de 4 continentes se ha incrementado en un 75% la incidencia de MNT, mientras que en el 12,5% se mantiene estable y en el 12,5% restante se encuentra en disminución; en el 81% de los casos, el aumento de la tasa de MNT coincide con una disminución de los casos de tuberculosis.

Más recientemente, Hoefsloot *et al.* (14) evaluaron la distribución de las especies de MNT a nivel mundial, mediante la identificación de especies provenientes de 20.182 pacientes, de 62 laboratorios en 30 países de seis continentes. Lograron aislar 91 especies de MNT. En cuanto al complejo MAC, este fue predominante en la mayoría de las regiones; sin embargo, *Mycobacterium xenopi* se encontró con mayor frecuencia en Hungría y *Mycobacterium kansasii* en Polonia y Eslovaquia. La distribución relativa de los distintos miembros de MAC reveló diferencias geográficas: *M. avium* predominó en los participantes provenientes de América del Norte, del Sur y de Europa, mientras que *M. intracellulare* se aisló con mayor frecuencia en América del Sur, África y Australia.

La identificación de los nuevos miembros de MAC por parte de los laboratorios es, en muchas ocasiones, poco confiable, debido a la falta de técnicas diagnósticas que puedan discernir entre ellos, como ocurre con *M. colombiense* y *M. chimaera*. Más recientemente, en la Comunidad de Madrid, un estudio de aislamientos demostró que MAC era la MNT aislada con mayor frecuencia a lo largo de todo el periodo de estudio, representando casi el 50 % de los aislamientos (6). Sin embargo, en este estudio no se diferenció entre las diferentes especies del complejo, en gran medida debido a los problemas anteriormente citados.

Adjemian *et al.* (22) llevaron a cabo una revisión bibliográfica de la prevalencia anual de micobacterias pulmonares no tuberculosas (PNTM), encontrando que esta varía según la región, el sexo y la raza/etnia. Se observó una mayor prevalencia entre mujeres y personas de ascendencia asiática, así como en el sur de los Estados Unidos y Hawái. Los estudios indican consistentemente que la prevalencia de PNTM está en aumento, con estimaciones que oscilan entre el 2,5% y el 8% anual. La mayoría de las enfermedades PNTM se asocian con MAC, aunque la proporción de enfermedades atribuidas a MAC varía según la región. Se han identificado factores del huésped que influyen en el riesgo de enfermedad, incluyendo la enfermedad pulmonar estructural, el tratamiento con medicación inmunomoduladora, así como variantes en el tejido conectivo, aclaramiento mucociliar y genes inmunes.

#### **1.2.4. Patología humana.**

En la actualidad se considera que las MAC son la causa etiológica más común de la enfermedad extrapulmonar relacionada con MNT en personas no infectadas con VIH. La linfadenitis es la manifestación principal de la enfermedad, pero pueden infectar otros órganos y tejidos, causando osteomielitis, infección séptica de la piel, artritis, y adenopatía intratorácica. Es importante destacar que las infecciones con MAC son frecuentes en pacientes infectados con VIH con una cuenta de CD4 menor a  $100/\text{mm}^3$ ; así como en pacientes inmunocomprometidos por sufrir de cáncer, enfermedades autoinmunes o encontrarse tomando inhibidores del sistema inmune para un trasplante (Delay, 2017).

Las infecciones por MAC no causan síntomas en todas las personas, aunque son especialmente peligrosas en los individuos inmunocomprometidos, tales como los infectados con VIH, los que padecen de leucemias o linfomas, los que reciben terapia inmunosupresora. Otro grupo de pacientes con factor de riesgo lo forman aquellos que



tienen una enfermedad pulmonar de base tales como la enfermedad obstructiva crónica (EPOC) o la fibrosis quística, en los que la enfermedad está más localizada (Figura 1).

**Figura 1: Bronquiectasias nodulares causadas por *Mycobacterium intracellulare*.**

La edad y el sexo son considerados también como factores de riesgo para contraer infecciones con MAC, siendo éstas más comunes en las mujeres que en los hombres, así como en edades medias o avanzadas. Hasta el momento se han descrito tres tipos de infecciones causadas por MAC (9,23):

- a. **MAC pulmonar o infección pulmonar por MAC:** se considera la forma más frecuente de infección por MAC, afectando principalmente a los pulmones; es común en personas que no tienen SIDA, pero que sufren de alguna enfermedad pulmonar de base, así como en mujeres mayores de 50 años.
- b. **MAC diseminada o infección diseminada por MAC:** puede afectar a varios órganos y tejidos, y es muy común en pacientes con SIDA en estado avanzado y en personas que sufren de linfoma.
- c. **Linfadenitis ocasionada por MAC:** la cual causa una inflamación generalizada de los ganglios linfáticos, siendo muy común en niños menores de 4 años de edad.

Los síntomas de la enfermedad varían dependiendo de la forma de presentación de la misma, pero son comunes fiebre, pérdida de peso, sudores nocturnos y fatiga. La infección pulmonar por MAC produce síntomas que aparecen de forma gradual, los cuales pueden durar semanas o meses, siendo frecuentes tos y disnea. Por su parte, la infección diseminada por MAC incluye habitualmente la presencia de diarrea, dolor abdominal, anemia y disnea; con menor frecuencia se pueden presentar mastitis, piomiositis, problemas gastrointestinales y abscesos en el cerebro y la piel. Por último, la linfadenitis causada por MAC tiene como único síntoma la inflamación de los ganglios linfáticos de uno de los lados del cuello. En general, no es posible adquirir la infección con MAC por medio del contacto con una persona infectada, siendo más común infectarse por el contacto con agua (dulce o salada), suelo o partículas de polvo contaminadas (24).

### **1.2.5. Diagnóstico.**

#### **1.2.5.1. Criterios ATS/IDSA.**

La Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society (IDSA/ATS) sugiere realizar el diagnóstico cuando existe una sospecha clínica y hallazgos radiológicos sugestivos de patología pulmonar. Si no se dispone de pruebas de imagen, se debe considerar iniciar el tratamiento (recomendación moderada, nivel de evidencia III) (Figura 2) (8,9,25). Según estos criterios, cualquier paciente sospechoso de tener una enfermedad por micobacterias no tuberculosas debería someterse a las principales pruebas diagnósticas, que incluyen: (1) radiografía de tórax que muestre opacidades nodulares o cavitarias, o tomografía computarizada de alta resolución (TCAR) de tórax; (2) obtención de tres o más muestras de esputo para cultivo y tinción de bacilos acidorresistentes (BAAR); y (3) exclusión de otros trastornos, como la tuberculosis (TB).

<p><i>Criterios clínicos (se requieren ambos)</i></p> <p>Síntomas pulmonares, cavitación o nódulos en radiografía pulmonar, o bronquiectasias multifocales con múltiples nódulos pequeños en TC de alta resolución</p> <p>Exclusión adecuada de otros diagnósticos posibles (p. ej., tuberculosis)</p> <p><i>Criterios microbiológicos (sólo se requiere uno)</i></p> <p>Cultivos positivos de al menos 2 muestras seriadas de esputo. Si éstos no son diagnósticos, repetir la baciloscopia y cultivos de esputo de forma periódica</p> <p>Cultivo positivo de al menos un BAL</p> <p>Biopsia transbronquial u otra biopsia pulmonar con histopatología propia de presencia de micobacterias (granuloma inflamatorio o BAAR) y cultivo positivo para MNT, o biopsia con características histopatológicas micobacterianas y uno o más esputos, o BAL con cultivo positivo para MNT</p> <p>Consideraciones a incluir en estos criterios:</p> <p>Consultar al experto cuando la MNT ha crecido como hallazgo infrecuente o pueda representar una contaminación ambiental</p> <p>En estos pacientes con sospecha de EIP por MNT pero sin otros criterios diagnósticos deberá pautarse un seguimiento periódico hasta que se pueda establecer o rechazar claramente el diagnóstico</p> <p>El diagnóstico de EIP por MNT no implica necesariamente la instauración inmediata de tratamiento, y se debe tomar la decisión tras valorar los potenciales riesgos/beneficios de la terapia</p>
---

**Figura 2. Criterios clínicos y microbiológicos para el diagnóstico de enfermedad infecciosa pulmonar (EIP) por micobacterias no tuberculosas (MNT). Recomendaciones de la American Thoracic Society/Infectious Diseases Society of America (ATS/IDSA).** BAAR: bacilos ácido-alcohol resistentes; BAL: lavado broncoalveolar; TC: tomografía computarizada. EIP-MNT cuando se cumplen los 2 criterios clinicorradiológicos y al menos 1 de los microbiológicos (no se han incluido los niveles de evidencia de trabajo original). Fuente: Griffith *et al.* (2007) con modificaciones.

Los criterios clínicos incluyen la presencia de síntomas pulmonares, opacidades nodulares o cavitadas en radiografía de tórax, o bronquiectasias con múltiples nódulos de pequeño tamaño, junto con una exclusión adecuada de otros diagnósticos. En cuanto a los criterios microbiológicos, se establecen los siguientes (8):

1. El cultivo positivo resulta de al menos dos muestras separadas de esputo.
2. Resultados de cultivo positivos de al menos un lavado bronquial.

3. Biopsia transbronquial u otra biopsia pulmonar con características histopatológicas (inflamación granulomatosa o presencia de BAAR) y cultivo positivo para MNT, o biopsia que muestre características histopatológicas compatibles y una o más muestras respiratorias con cultivo positivo para MNT.

Es importante tener en cuenta las siguientes recomendaciones:

(a) En caso de que se aíslen MNT poco frecuentes o que puedan suponer una contaminación ambiental, se debe consultar con expertos.

(b) Los pacientes con sospecha de enfermedad pulmonar por MNT pero que no cumplan con los criterios de diagnóstico deben ser seguidos hasta que se establezca un diagnóstico firme, o se excluya la presencia de MNT.

(c) El diagnóstico positivo de enfermedad pulmonar por MNT no implica la aplicación de una terapia, la cual debe basarse en los riesgos y beneficios potenciales de la terapia para cada paciente. Sin embargo, en las recomendaciones más recientes se opta por iniciar el tratamiento en todos los pacientes que cumplan los criterios para evitar la progresión de la enfermedad y la destrucción de tejido pulmonar que pueda resultar en un empeoramiento en la capacidad respiratoria del paciente (8,9).

Los criterios clínicos, radiográficos y microbiológicos son igualmente importantes y deben cumplirse todos para establecer un diagnóstico de enfermedad pulmonar por micobacterias no tuberculosas (MNT). Estos criterios deben aplicarse preferentemente a pacientes sintomáticos, preferiblemente con hallazgos radiológicos anormales. Es importante destacar que estos criterios se correlacionan mejor con el tratamiento y el pronóstico en pacientes con aislamientos de MAC, *M. kansasii* y *M. abscessus*. Sin embargo, hay poca información disponible sobre otras MNT para poder aplicar los criterios diagnósticos de manera generalizada. Por lo tanto, en estos casos, será necesario analizar a cada paciente de forma individualizada (9,26).

#### 1.2.5.2. Estudios de laboratorio.

Es crucial llevar a cabo la correcta identificación de la cepa que está causando la infección una vez que se ha establecido el diagnóstico. Esto permite aplicar un tratamiento específico para el paciente, reduciendo la posibilidad de que la cepa desarrolle resistencia al tratamiento. Los métodos de identificación incluyen tradicionalmente pruebas bioquímicas, moleculares y cromatográficas.

Entre las pruebas bioquímicas de laboratorio que se solían utilizar se encontraban la hidrólisis de Tween 80, ureasa, tiacetazona, picrato y oleato, reducción de nitratos, catalasa semicuantitativa, catalasa termoestable, pirazinamidasas, producción de niacina, arilsulfatasas, crecimiento en medios con cloruro de sodio y fosfatasa ácida. Sin embargo, debido a la gran variabilidad de los resultados, la dificultad en su realización y la disponibilidad de pruebas moleculares comerciales mucho más sensibles, específicas y accesibles, así como el aumento en el número de especies difícilmente identificables sin un estudio molecular, estas pruebas han dejado de utilizarse en los laboratorios de micobacteriología clínica.

En cuanto a las tinciones, estas son útiles para observar bacilos ácido-alcohol resistentes. Entre las tinciones clásicas se encuentran las de Ziehl-Neelsen, Kinyoun y fluorescencia, que pueden informar sobre el tamaño y la abundancia de los bacilos (27–29).

Las particularidades que deben considerarse en las pruebas de laboratorio aplicadas a las micobacterias no tuberculosas (MNT) son las siguientes:

- a. Se prefiere utilizar la tinción con fluorocromos en lugar de la tinción de Gram, ya que esta última no es útil para las MNT, y que el Ziehl-Neelsen, que tiene una menor sensibilidad y requiere un personal más entrenado y más tiempo por muestra.
- b. Las muestras deben cultivarse preferentemente en medios sólidos y líquidos, teniendo en cuenta las condiciones especiales de cultivo y temperatura de algunas cepas. El medio sólido más utilizado es el Lowenstein-Jensen, con un período de incubación de 3 a 4 semanas, dando lugar a colonias pequeñas, transparentes y no cromógenas.
- c. El hemocultivo es muy útil para las infecciones diseminadas por MNT, con una sensibilidad de hasta el 95%. Se emplea una extracción de sangre similar a la realizada para otros microorganismos, utilizando medios de cultivo líquidos semiautomatizados o automatizados, así como el de lisis-centrifugación.
- d. La identificación a nivel de especie suele realizarse mediante técnicas moleculares basadas en PCR-hibridación, secuenciación o MALDI-ToF.
- e. Para el estudio de sensibilidad a los antibióticos, se recomienda emplear la metodología empleada por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), utilizando la microdilución en caldo para MAC y los puntos de corte recomendados para claritromicina y ampicilina, y eventualmente para linezolid y moxifloxacino.

f. En el caso específico de aislados de *M. kansasii*, solo se recomienda realizar pruebas de sensibilidad para rifampicina.

g. Para las pruebas de sensibilidad de micobacterias de crecimiento rápido, se deben emplear los antimicrobianos descritos por el CLSI, interpretando los resultados en función de la especie aislada.

En la actualidad, es común el uso de sistemas de cultivo automáticos, como el Middlebrook 7H19 (7H12 en el sistema radiométrico), que registran las diferencias en las concentraciones de dióxido de carbono producto de la respiración bacteriana. Estos sistemas, como MGIT (Becton Dickinson, Inc.), MB Check system (Becton Dickinson, Inc.) y VersaTREK (Biomérieux), necesitan una identificación posterior mediante métodos moleculares, que puede realizarse directamente del medio líquido o de subcultivos en medios sólidos. (27–29).

Recientemente, se ha desarrollado un medio selectivo para micobacterias no tuberculosas (MNT) llamado NTM Elite Agar, fabricado por BioMérieux. Este medio ha demostrado una mayor sensibilidad para la detección de micobacterias de crecimiento rápido, aunque no ha mostrado la misma eficacia para las micobacterias de crecimiento lento (30). Sin embargo, la combinación de este nuevo medio con los sistemas convencionales aumenta la capacidad del laboratorio para aislar MNT en muestras clínicas. Este avance en la tecnología de cultivo proporciona una herramienta adicional para mejorar la detección y el aislamiento de MNT en entornos clínicos, lo que puede tener un impacto significativo en el diagnóstico y tratamiento de las infecciones por MNT.

#### 1.2.5.3. Otras pruebas.

Para lograr la identificación a nivel de especie de las micobacterias del complejo *M. tuberculosis*, a menudo se requiere la aplicación de pruebas adicionales. Esto se debe a la dificultad para diferenciar entre cepas dentro del complejo y a la limitada información disponible sobre las nuevas especies que puedan pertenecer al mismo.

**a. Pruebas moleculares:** La técnica más utilizada es la secuenciación del gen que codifica para el ARN ribosomal 16S. Esta técnica permite diferenciar entre micobacterias no tuberculosas (MNT) de crecimiento lento, que tienen una sola copia del operón ribosómico, y las de crecimiento rápido, que tienen dos copias del mismo. En algunos

casos, resulta más útil utilizar la región V del gen rpoB o una región de 441 pares de bases del gen hsp65.

b. **Pruebas cromatográficas:** Estas pruebas incluyen la cromatografía de gases, la cromatografía de capa fina o la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En estas pruebas se analizan los patrones de ácidos micólicos, que presentan diferencias entre cada especie de micobacteria. Aunque esta técnica no se utiliza comúnmente como prueba diagnóstica en la actualidad debido a su complejidad y la necesidad de instrumentos específicos y costosos, es muy útil para investigaciones sobre el metabolismo de las micobacterias.

c. **La técnica de MALDI-ToF (Espectrometría de Masas por Ionización con Desorción y Aireación asistida por Láser con Matrices, por sus siglas en inglés):** es de gran utilidad para la identificación de micobacterias en la actualidad. Esta técnica se emplea en numerosos laboratorios de microbiología clínica para la identificación de diversos patógenos bacterianos y fúngicos. Ha demostrado ser útil para la identificación de micobacterias, y existen protocolos específicos para su aplicación en esta área. (31).

### **1.2.6. Tratamiento.**

#### 1.2.6.1. Tratamiento médico.

Una vez realizado el diagnóstico, es crucial determinar si se tratará o no la infección, una decisión que se basa en una evaluación de los riesgos y beneficios para cada paciente. El tratamiento farmacológico implica la administración de un régimen de varios antibióticos durante largos periodos de tiempo, lo que conlleva el riesgo de complicaciones debido a los efectos secundarios de los fármacos.

En la Tabla 1 se enumeran los antimicrobianos que han demostrado ser efectivos para el tratamiento clínico de las infecciones causadas por micobacterias no tuberculosas, siendo los macrólidos los más importantes. Específicamente, se destacan la azitromicina y la claritromicina, que deben combinarse con otros fármacos para reducir el riesgo de que las cepas desarrollen resistencia (13). Es crucial realizar un seguimiento constante y cercano de los efectos secundarios en todos los casos, especialmente considerando que los antibióticos no deben administrarse como monoterapia. Además, es importante tener en cuenta que algunos medicamentos utilizados para el tratamiento de las infecciones por micobacterias no tuberculosas (MNT) pueden interferir con otros medicamentos. Por lo tanto, se debe

llevar a cabo una historia clínica detallada del paciente y ajustar el resto del tratamiento en consecuencia. Es esencial garantizar una coordinación efectiva entre los profesionales de la salud involucrados en el cuidado del paciente para minimizar los riesgos y maximizar los beneficios del tratamiento. (8,9,13).

Cuando el paciente no recibe tratamiento, puede experimentar una rápida progresión de la infección, manifestando síntomas clínicos o cambios radiológicos en un período de 2 a 5 años, especialmente si presenta factores de riesgo como bajo índice de masa corporal (IMC), afectación de múltiples segmentos pulmonares, presencia de enfermedad cavitaria, género masculino, edad avanzada, anemia, hipoalbuminemia, elevación de la proteína C reactiva o una baja velocidad de sedimentación de glóbulos rojos. Por lo tanto, antes de decidir si se aplicará o no un tratamiento, es crucial realizar estudios clínicos y radiológicos para evaluar la infección, así como llevar a cabo un seguimiento muy estrecho para evaluar su progresión, especialmente si se opta por no tratar la infección. (32).

**Tabla 1. Antimicrobianos efectivos para el tratamiento de infecciones con MAC.**

<b>Droga</b>	<b>Efectos secundarios</b>
<b>Macrólidos</b>	
<b>Azitromicina</b>	Diarrea, náuseas, dolor abdominal, sarpullido, elevación de transaminasas hepáticas, pérdida de la audición, prolongación QT
<b>Claritromicina</b>	Diarrea, náuseas, dolor abdominal, sarpullido, elevación de transaminasas hepáticas, pérdida de la audición, prolongación QT, dispepsia
<b>Etambutol</b>	
<b>Etambutol</b>	Disminución de la agudeza visual, neuritis óptica, sarpullido, neuropatía periférica
<b>Rifamicinas</b>	
<b>Rifabutin</b>	Dolor abdominal, náuseas, sarpullido, alteración del gusto, artralgias, uveítis, leucopenia, trombocitopenia, síndrome parecido al resfriado, elevación de transaminasas hepáticas, secreciones naranja
<b>Rifampicina</b>	Dolor abdominal, náuseas, sarpullido, elevación de transaminasas hepáticas, hiperbilirrubinemia, síndrome parecido al resfriado, leucopenia, trombocitopenia, nefritis intersticial, secreciones naranja

<b>Aminoglucósidos</b>	
<b>Amicacina</b>	Toxicidad vestibular (particularmente la estreptomicina), pérdida de la audición por toxicidad coclear, nefrotoxicidad (más con estreptomicina que con amicacina), sarpullido, fiebre, debilidad muscular
<b>Estreptomicina</b>	
<b>Fluoroquinolonas</b>	
<b>Ciprofloxacina</b>	Náusea, vómito, dolor abdominal, sarpullido, elevación de transaminasas hepáticas, efectos en el Sistema nervioso central (delirios, insomnio), tendinitis/ruptura del tendón, rotura del tendón, prolongación QT
<b>Moxifloxacina</b>	
<b>De uso potencial</b>	
<b>Clofzimina</b>	Dolor abdominal, náuseas, sarpullido, diarrea, vómito, decoloración de la piel, piel seca, pigmentación de la conjuntiva y la córnea, irritación ocular
<b>Linezolid</b>	Diarrea, náusea, dolor de cabeza, mielosupresión, acidosis láctica, neuropatía óptica, neuropatía periférica
<b>Bedaquilina</b>	Náusea, artralgias, dolor de cabeza, prolongación QT, hígado transaminasas hepáticas anormales

Tomado de Daley (10).

Por otro lado, el régimen de tratamiento de una infección por MAC sensible a macrólidos se elige en función de la gravedad de la enfermedad, si es cavitaria o no cavitaria, y si el paciente ha sido tratado anteriormente. En la Tabla 2 y la Figura 3 se presentan los regímenes más comunes de tratamiento de MAC, tanto para pacientes con enfermedad con bronquiectasias nodulares como para aquellos con enfermedad fibrocavitaria que no toleran la terapia diaria. En estos casos, se recomienda la administración de tres medicamentos tres veces por semana, incluyendo azitromicina (en dosis de 500 a 600 mg) o claritromicina (1.000 mg), etambutol (25 mg/kg de peso corporal) y rifampicina (600 mg). Para la enfermedad fibrocavitaria, se recomienda la administración diaria de azitromicina 250 mg o claritromicina 1.000 mg, etambutol a 15 mg/kg y rifampicina 600 mg. Los aminoglucósidos se recomiendan en los primeros 2 a 3 meses en pacientes con enfermedad cavitaria, resistencia a macrólidos o fracaso del tratamiento, pudiendo administrarse por vía

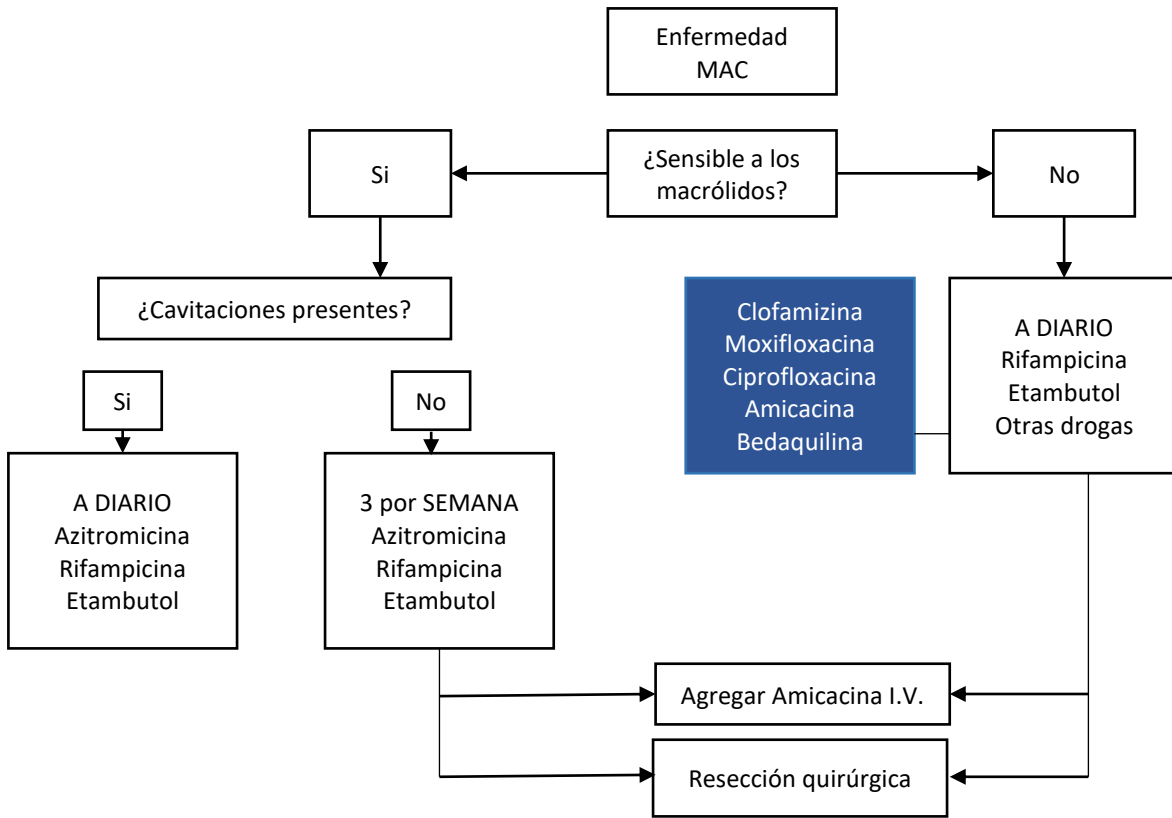
parenteral o inhalada. (8). En cuanto a la duración del tratamiento, debe mantenerse durante un periodo mínimo de 12 meses, contando a partir del momento en que los cultivos de esputo resultan negativos, lo que suele ocurrir alrededor de 6 meses después de iniciado el tratamiento. (8,9).

**Tabla 2. Recomendaciones para el tratamiento farmacológico de las enfermedades MAC.**

Tipo de enfermedad	Terapia recomendada
<b>MAC Pulmonar</b>	
<b>Enfermedad nodular/bronquiectásica, media a moderada, tratamiento inicial</b>	Azitromicina 500–600 mg tres veces por semana, o claritromicina 1.000 mg tres veces por semana, más etambutol 25 mg/Kg tres veces por semana, más rifampicina 600 mg tres veces por semana.
<b>Enfermedad cavitaria, tratamiento inicial</b>	Azitromicina 250–300 mg QD, o claritromicina 1.000 mg diarios, más etambutol 15 mg/kg QD, más rifampicina 450–600 mg, más aminoglucósidos (estreptomina a 500–1,000 mg o ampicacina a 15 mg/kg 2 o 3 veces a la semana) por los primeros dos meses.
<b>Casos severos o tratados previamente</b>	Azitromicina 250–300 mg QD, o claritromicina 1.000 mg diarios, más etambutol 15 mg/kg QD, más rifampicina 450–600 mg o rifabutina 150–300 mg QD, más aminoglucósidos (estreptomina 500–1,000 mg o ampicacina 15 mg/kg 2 o 3 veces a la semana) por los primeros dos meses o más.
<b>MAC diseminada</b>	
Azitromicina 500–600 mg QD o claritromicina 1.000 mg, más etambutol 15 mg/kg QD, más rifabutina 300-450 mg QD.	
<b>Profilaxis para MAC diseminada</b>	
Azitromicina 1.200 mg una vez a la semana o claritromicina 500 mg QD o BID	

QD, una vez al día, BDI, dos veces al día Fuente: Varghese *et al.* (33).

¿



**Figura 3. Algoritmo de tratamiento de la enfermedad de MAC.** Si el aislado es susceptible a macrólidos y no hay cavitaciones presentes en las imágenes de tórax, se recomienda un régimen de 3 medicamentos tres veces por semana. Si hay cambios cavitarios, se recomienda la administración diaria, junto con la adición de amicacina parenteral (o estreptomicina) y consideración de la resección de la enfermedad pulmonar focal. Para la enfermedad resistente a macrólidos, amicacina parenteral y pulmonar, se sugiere seriamente la resección quirúrgica y agregar amicacina. I.V., intravenoso. Fuente: Daley (10).

#### 1.2.6.2. Tratamiento quirúrgico.

Como tratamiento quirúrgico, en ocasiones se ha recurrido a la resección pulmonar, siendo necesaria en pacientes con enfermedad pulmonar localizada refractarios al tratamiento farmacológico. Habitualmente, se intenta la lobectomía en el caso de pacientes en los que se observan focos de la enfermedad bien delimitados anatómicamente, mientras que la neumonectomía es útil cuando la enfermedad tiene una extensión más amplia. Las complicaciones más frecuentes incluyen la presencia de otras MNT, la conversión de esputo positivo de 85% a 100% después de la cirugía, y una tasa de recaída de 0 a 16%. En cuanto a la mortalidad, se considera mínima, pero se han observado tasas de

complicaciones entre 0 y 35%, presentándose fístula broncopleurales (5,3%) e insuficiencia respiratoria/neumonía nosocomial (3,4%) (34,35).

La cirugía por toracoscopia video asistida (VATS) es otra opción quirúrgica que se ha utilizado en el tratamiento de la enfermedad pulmonar por MAC localizada. Un estudio que evaluó 134 pacientes sometidos a 172 VATS para el tratamiento de dicha enfermedad encontró bajas tasas tanto de morbilidad (7%) como de mortalidad (0%). Estos pacientes fueron intervenidos después de varios meses de tratamiento antimicobacteriano y requirieron entre 1 y 15 días de hospitalización. Después de un seguimiento de 23 meses tras la cirugía, el 16% de los pacientes presentaron un cultivo positivo de esputo (35).

#### **1.2.7. Sensibilidad *in vitro* y mecanismos de resistencia antibiótica.**

Una vez confirmado el diagnóstico de enfermedad pulmonar por micobacterias no tuberculosas (MNT) de acuerdo a los criterios de la Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society (IDSA/ATS), es crucial realizar el estudio de sensibilidad *in vitro* de la cepa aislada. Sin embargo, los resultados de estos estudios no siempre predicen con precisión la eficacia del tratamiento en el paciente. Por esta razón, es fundamental seleccionar cuidadosamente el método para evaluar la sensibilidad frente a las MNT.

En este sentido, se debe emplear el método recomendado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para pruebas de susceptibilidad de MNT. Este método implica el uso de microdilución en caldo Mueller-Hinton ajustado catiónicamente (CAMHB) con la adición de un 5% de oleato, albúmina, dextrosa y catalasa (OADC) para las MNT de crecimiento lento. Este enfoque se considera el estándar para evaluar la sensibilidad de las MNT a los antibióticos y garantiza resultados más confiables y consistentes (36). En el documento M24S se encuentran los criterios de interpretación de los distintos antimicrobianos frente a cepas tanto de crecimiento lento (MAC, *M. kansasii* y *M. marinum*) y de crecimiento rápido (grupo *M. fortuitum*, *M. chelonae* y *M. abscessus*), así como al grupo conocido como “otras micobacterias de crecimiento lento”, en el que se encuentran *M. xenopi*, *M. malmoense*, *M. simiae* y otras especies (37). Una vez completado el estudio de sensibilidad *in vitro*, el laboratorio informará los resultados utilizando la escala de sensible, intermedio o resistente, y en casos particulares, determinará la concentración mínima inhibitoria (CMI) en mg/l. Los estudios de sensibilidad *in vitro* para

micobacterias no tuberculosas (MNT) deben llevarse a cabo en laboratorios con técnicas e infraestructuras adaptadas a los estándares establecidos para estos microorganismos.

En situaciones donde se observe resistencia a los antibióticos probados, puede ser necesario confirmar los resultados mediante un laboratorio de referencia. Esto garantiza la precisión y la fiabilidad de los hallazgos, lo que es crucial para guiar adecuadamente el tratamiento del paciente y evitar la propagación de cepas resistentes (38).

La incorporación de métodos comerciales adaptados al estándar de referencia del CLSI ha facilitado el trabajo en el laboratorio y ha aumentado la sensibilidad de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana. Por ejemplo, el sistema de microdilución en caldo, como el Sensititre TREK Diagnostic Systems, está disponible para las micobacterias de crecimiento lento y las micobacterias de rápido crecimiento, lo que permite una evaluación más precisa de la susceptibilidad a los antibióticos.

Además, los sistemas automatizados de cultivo en medio líquido, como el BACTEC MGIT 960, originalmente utilizado para el complejo *M. tuberculosis*, ahora se pueden aplicar a otras micobacterias, como *M. kansasii* (39,40). Estos avances tecnológicos mejoran la eficiencia y la precisión de los resultados de sensibilidad antimicrobiana.

Es importante tener en cuenta que otras técnicas, como el E-test o el antibiograma disco-placa, no están validadas para su uso en micobacterias y pueden conducir a errores de interpretación, especialmente en el caso de los macrólidos. Por lo tanto, es crucial utilizar métodos que estén respaldados por evidencia científica y validados para su aplicación en el diagnóstico y tratamiento de las infecciones por micobacterias.

Especie	Antimicrobiano	CMI (mg/l) <sup>a</sup>			
		S	I	R	
MAC <sup>b</sup>	Primera línea	Clarithromicina <sup>c</sup>	≤ 8	16 <sup>d</sup>	≥ 32
	Secundarios	Moxifloxacino	≤ 1	2	≥ 4
		Linezolid	≤ 8	16	≥ 32
<i>M. kansasii</i> <sup>e</sup>	Primera línea	Rifampicina <sup>f</sup>	-	-	> 1
		Clarithromicina <sup>g</sup>	-	-	> 16
	Secundarios	Amikacina	-	-	> 32
		Ciprofloxacino <sup>h</sup>	-	-	> 2
		Ethambutol	-	-	> 4
		Isoniazida <sup>i</sup>	-	-	-
		Linezolid	-	-	> 16
		Moxifloxacino	-	-	> 2
		Rifabutina	-	-	> 2
		Streptomina <sup>j</sup>	-	-	-
		Trimetroprin-sulfametoxazol (SXT)	-	-	> 2/38

**Figura 4. Criterios de interpretación y antimicrobianos en el estudio de sensibilidad in vitro ante enfermedad infecciosa pulmonar por *Mycobacterium avium* complex (MAC) o *M. kansasii*.** CMI: concentración mínima inhibitoria. <sup>a</sup>Valores de CMI para el método de dilución en caldo CAMHB (pH 7,3-7,4) con 5% de OADC. <sup>b</sup>MAC: no se recomienda determinar los puntos de corte de antimicrobianos como EMB, RMP, rifabutina, SM o ampicilina a pesar de su posible utilidad clínica. <sup>c</sup>Se debe ensayar claritromicina, siendo el resultado aplicable a azitromicina. <sup>d</sup>Si la cepa es intermedia a macrólido se debe indicar la posibilidad de resistencia emergente y controlar el caso. <sup>e</sup>*M. kansasii*: sólo se consideran los valores indicativos de resistencia. <sup>f</sup>En pacientes con inhibidores de proteasa las cepas sensibles a RMP se asume que son sensibles a rifabutina. <sup>g</sup>Claritromicina se considera de primera línea en *M. kansasii* en pacientes con pautas cortas y/o intermitentes con RMP, EMB y claritromicina. En los casos con pauta de elección (RMP, EMB, INH) la claritromicina sería un fármaco secundario que representa al grupo de macrólidos activos (claritromicina, azitromicina). <sup>h</sup>Ciprofloxacino y levofloxacino son intercambiables, con menor actividad in vitro que moxifloxacino. <sup>i</sup>INH y SM pueden usarse clínicamente, pero los puntos de corte para sensibilidad/resistencia en MNT no están establecidos, habiéndose modificado los valores INH 5 mg/l y SM 10 mg/l del documento previo M24-A y debiéndose informar sólo el valor de la CMI sin interpretar. Fuente: CLSI (36,37)

La resistencia del MAC a diversos tratamientos antimicrobianos presenta desafíos significativos en comparación con las cepas causantes de la tuberculosis. Al igual que otras bacterias, es posible encontrar cepas resistentes, cuya resistencia se debe principalmente a mutaciones en el cromosoma bacteriano. Además, pueden exhibir resistencia constitutiva a ciertos antibióticos, como los betalactámicos, debido a diversos mecanismos de resistencia. La resistencia adquirida a los antibióticos también puede ocurrir mediante la incorporación de material genético externo.

Este proceso de adquisición de resistencia se facilita por la capacidad de las bacterias para adquirir material genético a través de la transferencia horizontal de genes. En este proceso, el material genético externo se incorpora al cromosoma bacteriano mediante eventos de recombinación. Como resultado, la resistencia a los antibióticos puede manifestarse de dos maneras principales: resistencia innata debido a mutaciones cromosómicas y resistencia adquirida por la incorporación de material genético externo (41):

a. **Cromosómica:** En el proceso de resistencia mediada por mutaciones cromosómicas, una mutación espontánea puede ocurrir en la secuencia de un gen específico relacionado directamente con la acción del antibiótico. Esta mutación puede ser heredada de manera estable y se transmite verticalmente a través de las generaciones bacterianas. Inicialmente, la población bacteriana puede contener solo unas pocas bacterias con esta

mutación, pero cuando se expone al antibiótico, las bacterias resistentes tienen una ventaja de supervivencia sobre las susceptibles. La presión selectiva del antibiótico favorece la proliferación de las bacterias resistentes, lo que lleva a un aumento en la población de bacterias resistentes en comparación con las susceptibles. Con el tiempo, esta población de bacterias resistentes puede convertirse en la mayoría, lo que resulta en una población dominada por bacterias que han desarrollado resistencia al antibiótico. Este proceso de selección natural, impulsado por la presión del antibiótico, es un ejemplo de evolución bacteriana en acción.

b. **Resistencia extracromosómica:** Exactamente, en el caso de la resistencia adquirida mediante la transferencia horizontal de genes, los elementos genéticos móviles, como los plásmidos o los elementos genéticos integrativos y conjugativos (ICE), pueden transportar genes de resistencia a los antibióticos entre diferentes bacterias. Estos elementos genéticos pueden moverse libremente dentro y entre las células bacterianas, facilitando así la diseminación de la resistencia a los antibióticos dentro de una población bacteriana y entre diferentes especies bacterianas. La transferencia horizontal de genes puede ocurrir a través de varios mecanismos, siendo los principales la conjugación, la transducción y la transformación.

La resistencia intrínseca o natural en las micobacterias no tuberculosas (MNT) es un fenómeno que se observa en ciertas especies y está relacionado con la presencia de mecanismos de resistencia que son inherentes a la bacteria y no son adquiridos a través de la exposición a antimicrobianos. Estos mecanismos pueden incluir:

a. **Bomba de eflujo:** Las MNT pueden poseer sistemas de bombas de eflujo que les permiten expulsar los antimicrobianos de la célula, lo que reduce su efectividad.

b. **Biotransformación:** Algunas MNT tienen la capacidad de modificar químicamente los antimicrobianos para inactivarlos o disminuir su actividad.

c. **Mecanismos de resistencia inducibles:** En ciertas especies de MNT, los mecanismos de resistencia pueden ser inducidos por la exposición a antimicrobianos, lo que puede contribuir a la resistencia adquirida.

d. Estos mecanismos de resistencia intrínseca pueden estar presentes en especies como MAC, *M. abscessus*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium malmoense* y *Mycobacterium simiae*, entre otras. Es importante tener en cuenta que la presencia

de estos mecanismos de resistencia intrínseca puede dificultar la correlación entre las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) encontradas en estudios de laboratorio y la respuesta clínica al tratamiento en los pacientes infectados con MNT. Esto subraya la importancia de realizar estudios clínicos y de sensibilidad in vitro para guiar el tratamiento adecuado de las infecciones por MNT (42,43).

**Tabla 3. Principales características de la resistencia natural y la resistencia adquirida a los antibióticos.**

	<b>Resistencia natural</b>	<b>Resistencia adquirida</b>
<b>Característica</b>	Es característica de cada familia, especie o grupo bacteriano. La diana está ausente, es resistente al antibiótico o es inaccesible	Es variable. Puede presentarse al azar una cepa bacteriana resistente al antibiótico.
<b>Mecanismos de acción</b>	Genes de resistencia cromosómicos.	Mutaciones en el cromosoma bacteriano, elementos genéticos móviles
<b>Forma de transmisión</b>	Transferencia vertical de genes, de células madre a células hijas	Transferencia vertical de genes, transferencia horizontal de genes (entre células de una misma generación de la misma especie o equivalentes)

Fuente: (41)

La resistencia adquirida a los antimicrobianos, especialmente en el contexto de MAC, es un problema significativo que puede surgir durante el curso del tratamiento antimicrobiano. Esta resistencia adquirida se debe principalmente a mutaciones en genes específicos, como el gen 23S rRNA, que está asociado con la resistencia a los macrólidos, y el gen 16S rRNA, que confiere resistencia a la amicacina.

Es esencial destacar que la aplicación de una terapia antimicrobiana inadecuada, que involucre un número inadecuado de antibióticos, dosis inadecuadas o el uso de medicamentos complementarios inapropiados, puede favorecer la selección de mutantes

resistentes. Estas mutaciones pueden llevar al desarrollo de resistencia antimicrobiana, lo que puede resultar en el fracaso completo del tratamiento.

En el caso de MAC, se ha establecido una buena correlación entre los resultados de las pruebas de sensibilidad in vitro y la respuesta clínica al tratamiento para claritromicina y amicacina. Por lo tanto, se han establecido puntos de corte específicos para estos antimicrobianos. Sin embargo, para otros agentes antimicrobianos como rifampicina o etambutol, las pruebas de sensibilidad in vitro no pueden predecir de manera confiable la respuesta clínica en el paciente. Por lo tanto, no se han establecido puntos de corte para estos antimicrobianos, y su sensibilidad in vitro no debe evaluarse, ya que la concentración mínima inhibitoria (CMI) es considerablemente mayor en comparación con el tratamiento de la tuberculosis.

En resumen, el desarrollo de resistencia antimicrobiana en MAC representa un desafío significativo para el diseño y la implementación de un tratamiento efectivo. Es crucial utilizar pruebas de sensibilidad in vitro adecuadas y considerar cuidadosamente la selección de antimicrobianos y el manejo del tratamiento para minimizar el riesgo de desarrollo de resistencia y optimizar los resultados clínicos para los pacientes infectados con MAC (9,44).

### **1.3. Biofilms.**

#### **1.3.1. Definición.**

Un biofilm bacteriana es una comunidad microbiana que se adhiere a una superficie biótica o abiótica y se mantiene unida por una matriz de polímeros extracelulares (EPS) que las bacterias producen. Esta matriz está compuesta principalmente de polisacáridos, proteínas y ADN extracelular. Los biofilms bacterianas pueden formarse en una amplia variedad de entornos, desde superficies médicas hasta sistemas de tuberías, y pueden ser difíciles de eliminar debido a su estructura compleja y a la resistencia que proporciona la matriz EPS (45,46). Los biofilms pueden formarse en una amplia gama de superficies, tanto bióticas (como tejidos vivos) como abióticas (como plástico, metal, vidrio, etc.). Se han encontrado biofilms en diversos entornos, incluidos minerales, superficies de plantas y animales, así como en entornos artificiales como los sistemas de tuberías en plantas de tratamiento de agua, equipos médicos y dispositivos implantables. Los biofilms formadas en entornos sanitarios, como los catéteres y las mangueras de vías respiratorias, pueden representar un

riesgo significativo para la salud humana al servir como reservorios de patógenos resistentes a los antibióticos y dificultar su eliminación (46,47). Estas comunidades microbianas, al estar inmovilizadas y rodeadas por una matriz extracelular de polímeros, pueden resistir mejor a factores estresantes ambientales, como la desecación, la radiación ultravioleta, los ataques del sistema inmunológico y la exposición a agentes antimicrobianos. El *quorum sensing* es un proceso importante que permite a las bacterias en un biofilm comunicarse entre sí y coordinar su comportamiento, lo que puede influir en la formación, la estructura y la resistencia del biofilm. (48–51).

Los biofilms ofrecen una serie de ventajas adaptativas en el entorno natural, pero en el entorno médico pueden convertirse en un serio problema de salud pública. La capacidad de los biofilms para resistir a los antimicrobianos y al sistema inmunológico las hace especialmente problemáticas en contextos clínicos. La formación de biofilms en dispositivos médicos y en tejidos puede conducir a infecciones crónicas difíciles de tratar, lo que puede resultar en complicaciones graves para los pacientes y aumentar la carga de trabajo y los costos para los sistemas de atención médica. Por lo tanto, la comprensión de los biofilms y el desarrollo de estrategias para prevenir su formación o eliminarlas son áreas de investigación y desarrollo importantes en el campo de la medicina y la microbiología. (52).

### **1.3.2. Crecimiento planctónico frente a crecimiento en biofilms.**

El concepto tradicional de las bacterias como organismos de vida libre en estado planctónico ha evolucionado con el descubrimiento de los biofilms. Si bien las bacterias planctónicas son las que más se estudian en los laboratorios y son más fáciles de cultivar en medios de cultivo líquidos, la mayoría de las bacterias en la naturaleza existen como parte de biofilms. Los biofilms proporcionan a las bacterias un ambiente protegido y colaborativo que les permite resistir mejor las condiciones adversas, incluidos los ataques del sistema inmunológico y los antimicrobianos. La capacidad de las bacterias para existir en ambos estados, planctónico y como parte de un biofilm, es crucial para su adaptabilidad y supervivencia en una amplia gama de entornos (45,46,53,54).

Alrededor del 99% de las bacterias se encuentran formando parte de biofilms. Estos comienzan su desarrollo cuando las bacterias planctónicas encuentran una superficie, se adhieren a ella, comienzan a multiplicarse y a fabricar la matriz extracelular,

y emiten señales químicas que coordinan la diferenciación y formación de la estructura del biofilm (55). Una de las principales ventajas del crecimiento en biofilms es su resistencia a las agresiones ambientales, especialmente a los antibióticos. Esto ha dado lugar a un incremento en los estudios sobre biofilms en las últimas décadas, debido a las enormes implicaciones que tienen en áreas como la medicina y la tecnología de alimentos. Los biofilms, ya sean monoespecie o multiespecie, incluyen una matriz extracelular compleja y suelen desarrollar adherencia a superficies bióticas o abióticas (56), aunque también pueden encontrarse en interfases líquido-gas, la formación de biofilms permite que las bacterias crezcan en un ambiente protegido, brindándoles la posibilidad de colonizar nichos más favorables (57).

### **1.3.3. La adherencia primaria y el desarrollo del biofilm.**

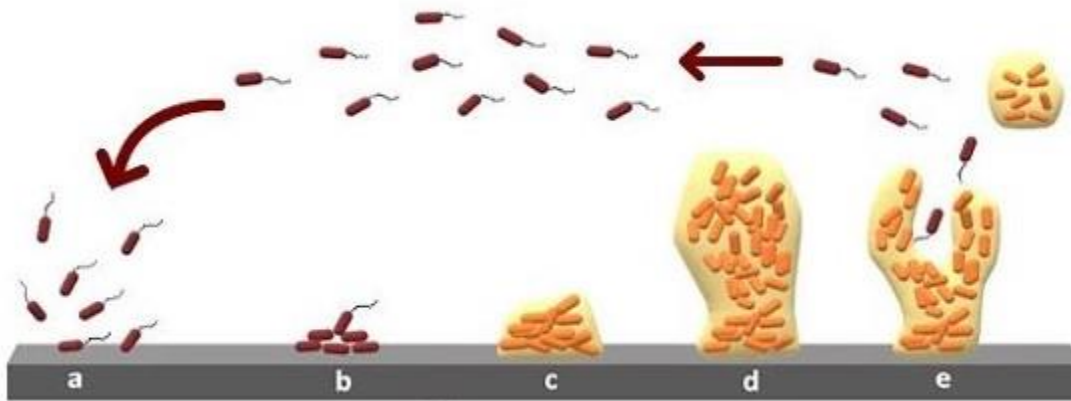
En un biofilm, las células bacterianas se encuentran inmersas en una sustancia polimérica extracelular conocida como matriz extracelular (ECM por sus siglas en inglés), que constituye alrededor del 65% al 95% del volumen del biofilm. En esta matriz se encuentran ácidos nucleicos (1%), polisacáridos (1-2%), lípidos (1%), proteínas (2%), y principalmente agua (97%) (57,57-59). La matriz sirve como la base estructural para la formación del biofilm, ya que facilita la conexión intercelular, promueve la unión e interacción entre las células, y las protege contra agentes antimicrobianos (60). La función de las distintas moléculas presentes en la matriz es proporcionar estabilidad mecánica mediante la formación de una red tridimensional que conecta e inmoviliza las células del biofilm.

La formación de un biofilm ocurre en diferentes etapas (Figura 5) (60,61):

- **Adherencia:** Para que las bacterias pasen de una vida planctónica a formar parte de un biofilm, es necesario que se adhieran a una superficie. Es en este momento cuando se inicia la síntesis de las sustancias poliméricas extracelulares (SPE) que conformarán la matriz del biofilm (55). En el caso de las bacterias gramnegativas, el mecanismo de contacto se lleva a cabo a través de flagelos y fimbrias, mientras que las bacterias grampositivas y las micobacterias utilizan proteínas de superficie. Este proceso ocurre en dos fases. En la primera fase, se produce la adherencia inicial mediante interacciones físicas como interacciones electrostáticas, movimiento browniano, fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas. Estas últimas son fundamentales, ya que las superficies hidrófobas y no polares generan menos repulsión de la bacteria por la superficie. En la

segunda fase, se establece una mayor adherencia a la superficie mediante la formación de enlaces químicos, predominantemente covalentes, que son mucho más estables que las interacciones presentes en la primera fase. Posteriormente, las bacterias que han entrado en contacto con la superficie forman una monocapa de células, con una unión que es reversible en etapas tempranas. Esto permite que las bacterias puedan disociarse en el caso de que las condiciones para la formación del biofilm sean subóptimas (ver Figura 5a).

- **Maduración:** Durante la maduración, se produce una unión irreversible a la superficie, mientras que las bacterias de la monocapa celular continúan dividiéndose (ver Figura 5b), hasta que se forma una microcolonia tridimensional (ver Figura 5c). En esta etapa, la matriz extracelular es más heterogénea, y se convierte en el espacio donde ocurre la comunicación entre los miembros de la comunidad mediante el sistema denominado quorum sensing, el cual modifica la expresión genética y controla la tasa de crecimiento. Estas modificaciones resultan en una multiplicación más lenta de las bacterias en comparación con las bacterias planctónicas, debido a la limitación de recursos. En este punto, las bacterias comienzan a ser menos susceptibles a los antibióticos.



**Figura 5. Ciclo de vida de los biofilms de *Pseudomonas aeruginosa*.** a) Interacción inicial reversible con la superficie, b) Adhesión irreversible a la superficie, c) División celular y producción de la matriz generando las microcolonias, d) Maduración del biofilm e) Dispersión celular para volver a empezar el ciclo. Fuente: Wei y Ma (57).

- **Dispersión:** Cuando las cantidades de nutrientes disminuyen drásticamente, las bacterias más superficiales de la matriz tienden a escapar en busca de otros nichos. Este escape puede ocurrir de manera pasiva, gracias a fuerzas fisicoquímicas, o de forma activa, mediante la detección de señales de estrés ambiental en la comunidad bacteriana, tales como escasez de nutrientes, aumento de productos tóxicos y/o reducción de las

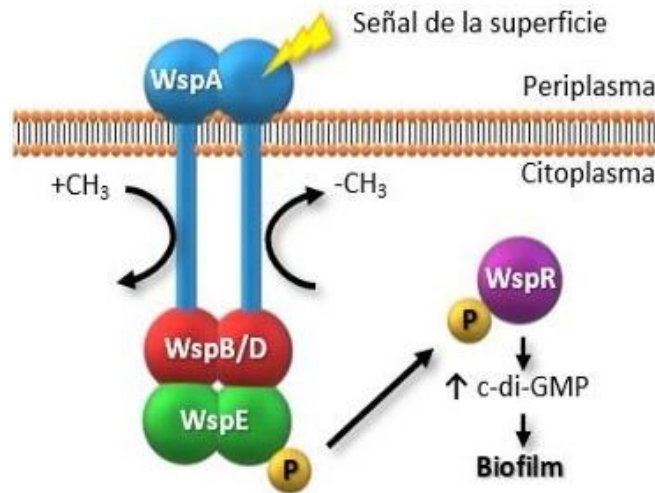
concentraciones de oxígeno. Estas señales desencadenan la degradación de la matriz, la muerte celular y el retorno a la forma de vida libre y móvil, lo que facilita la colonización de una nueva superficie (ver Figura 5e)

#### **1.3.4. Regulación del proceso de formación del biofilm.**

El desarrollo de un biofilm depende de la interacción de múltiples factores, entre los cuales son fundamentales la disponibilidad de recursos y nutrientes, el metabolismo bacteriano, las condiciones ambientales, la regulación genética y la comunicación celular. Esto significa que cada biofilm presenta condiciones únicas en cuanto a su resistencia a antibióticos y las condiciones ambientales externas (62).

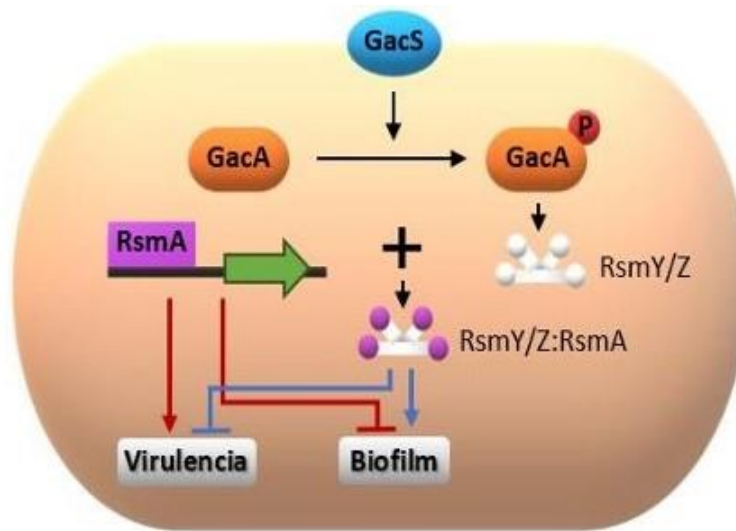
Uno de los mecanismos de regulación implica la detección de bajas concentraciones de antibióticos, lo que promueve cambios genéticos que regulan la formación del biofilm. Este mecanismo es independiente de los sistemas de *quorum sensing* o detección de la densidad celular. Por otro lado, se ha demostrado que los mecanismos de quimiotaxis, es decir, el movimiento bacteriano generado por los gradientes de nutrientes y otros químicos en búsqueda de localizaciones óptimas para su reproducción, pueden estimular la formación de biofilms, ya que favorecen la adhesión a las superficies.

En el caso específico de *Pseudomonas aeruginosa*, se ha descrito el circuito regulador Wsp, que está formado por proteínas homólogas a las utilizadas en la quimiotaxis. En este caso, *P. aeruginosa* posee en la membrana un quimiorreceptor llamado WspA, que detecta señales a nivel de la membrana y activa a las proteínas sensoras WspB, WspD y WspE. En este punto, WspE se autofosforila y transfiere un grupo fosfato a la proteína reguladora de respuesta WspR, la cual activa a la enzima DGC encargada de sintetizar c-di-GMP, que estimula la formación del biofilm (ver Figura 6)(63).



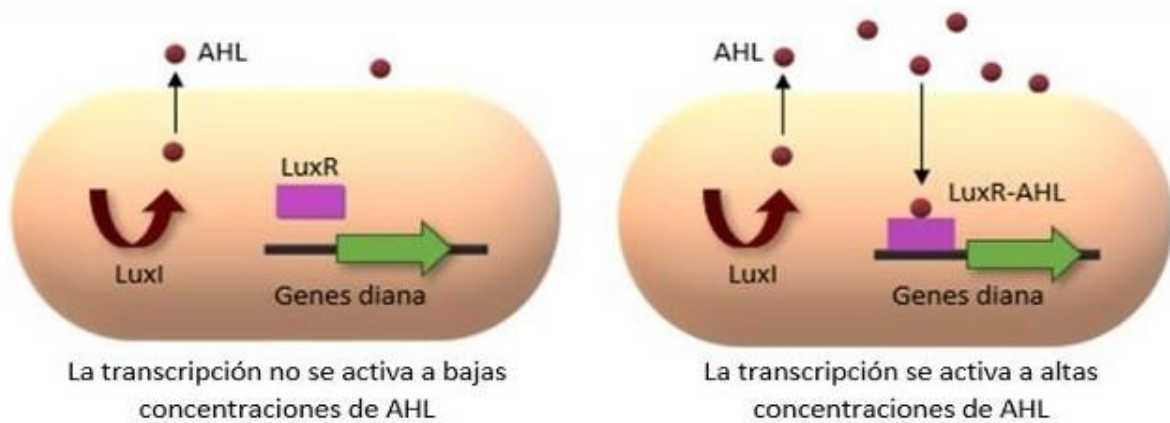
**Figura 6. Sistema de detección de superficie Wsp de *P. aeruginosa*.** WspA es una proteína que detecta la superficie y activa a unas proteínas sensoras (WspB, WspD y WspE). WspE se autofosforila y transmite el grupo fosfato hasta la proteína WspR, desencadenando la formación del biofilm, al aumentar las concentraciones de c-di-GMP (64). Aunque es probable que mecanismos similares existan en otras especies, se desconoce en la actualidad si las micobacterias presentan un sistema parecido.

Otro mecanismo de regulación es el de los sistemas de dos componentes, los cuales están encargados de detectar la información del medio ambiente mediante transferencias de grupos fosforilo. En estos sistemas, un sensor histidina quinasa, que se encuentra en la membrana celular, detecta una señal ambiental. Esta señal se transmite a un regulador de respuesta mediante fosforilación, lo que desencadena una respuesta fisiológica (65). Nuevamente, en el caso de *P. aeruginosa*, se ha descrito el sistema GacS/GacA/RsmZ. En este sistema, el sensor GacS reacciona a una señal ambiental y transmite un grupo fosfato a la proteína reguladora GacA. Luego, GacA activa la transcripción de RsmZ y RsmY, que son pequeños ARN no codificantes. Estos ARN se unen a RsmA, una proteína reguladora postranscripcional que suprime la formación de biofilms e induce la virulencia. Por lo tanto, la unión de los ARN inhibe el efecto negativo de RsmA, lo que desencadena la síntesis de la sustancia polimérica extracelular (SPE) y, por ende, la formación del biofilm (66) (Figura 7).



**Figura 5. Sistema de dos componentes GacS / GacA / RsmZ de *P. aeruginosa*.** GacS es una quinasa sensora de la membrana que, ante una señal ambiental, fosforila a una proteína reguladora llamada GacA. Esta proteína provoca la transcripción de pequeños ARN no codificantes (RsmY/Z), que se unen a una proteína reguladora (RsmA), encargada de inhibir la formación del biofilm y favorecer la virulencia (líneas rojas). Esta unión reprime RsmA, favoreciendo la formación de los biofilms y suprimiendo la virulencia (líneas azules) (57).

Por otro lado, la regulación de la formación de biofilms controlada por los sistemas de quórum sensing, es particularmente importante, ya que estos sistemas contribuyen a la regulación de la densidad celular, la comunicación bacteriana y el comportamiento comunitario, y están involucrados en la dispersión, formación de biofilms, bioluminiscencia, generación de canales o poros y la virulencia. Esto ocurre mediante autoinductores que brindan información sobre la localización y cantidad de otras bacterias. En el caso de las bacterias Gram-negativas, se ha descrito el quorum sensing de tipo LuxI/LuxR, cuyo autoinductor es una acil-homoserina lactona (AHL): la proteína LuxI, que es una autoinductasa sintasa, genera el autoinductor AHL específico, el cual se difunde al exterior a través de la membrana celular. Cuando las concentraciones de AHL en el medio extracelular son altas debido a la densidad celular, el AHL puede entrar en las bacterias y ser reconocido por las proteínas LuxR. LuxR funciona como un activador transcripcional que promueve la expresión de los genes diana (49) (Figura 8).



**Figura 8. Sistema de detección de quórum tipo LuxI/LuxR en bacterias Gram-negativas.** La proteína LuxI cataliza un autoinductor AHL específico que se difunde al exterior a través de la membrana celular. La figura de la izquierda representa este proceso cuando las densidades celulares y la concentración de AHL del medio son bajas. La figura de la derecha simboliza cuando las concentraciones de AHL son altas, al aumentar las densidades celulares. Solo en este último caso, es cuando la proteína tipo LuxR reconocerá la AHL, que es interiorizada por difusión y se une a unos genes diana, activando su transcripción. (49).

En contraste, en las bacterias Gram-positivas, el sistema de quorum sensing es de dos componentes, utilizando pequeños oligopéptidos modificados como autoinductores. Estos oligopéptidos se secretan al exterior de la célula y son detectados por la proteína sensora histidina quinasa (SHK), lo que promueve su autofosforilación. Posteriormente, la SHK transmite un grupo fosfato a una proteína reguladora transcripcional, que a su vez se une a los genes diana para promover su transcripción (67) (Figura 9).



**Figura 9. Sistema de quorum sensing en bacterias Gram-positivas.** Se sintetiza un péptido precursor que es procesado y secretado al exterior. Este autoinductor es reconocido por un sensor histidina quinasa (SHK),

que desencadena una serie de fosforilaciones, que activan a un regulador transcripcional de unos genes diana sensibles al quórum. (67).

En estafilococos, el sistema de quorum sensing está regulado por los sistemas de genes agr y luxS. En el sistema agr, la proteína AgrB se encarga de la producción de péptidos autoinductores (68). Por otro lado, LuxS sintetiza AIP-2 (4,5-dihidroxi-2,3-pentanodiona)(69), que es considerada una molécula universal que participa en intercomunicación de especies (70). En estreptococos los sistemas de quorum sensing son comAB, comCDE (71) y también LuxS (72). Además, en *Streptococcus pneumoniae* se han descrito cerca de 30 sistemas regulatorios que controlan la formación y maduración de biopelículas y la producción de factores de virulencia (73).

### **1.3.5. Biofilms bacterianos e infección.**

El crecimiento el biofilms afecta de manera sustancial los ámbitos ambientales, industriales y biomédicos del hombre. En la actualidad se ha descubierto que más del 80% de las infecciones microbianas y crónicas se deben a bacterias formadoras de biofilms, siendo este un factor patogénico esencial (56), incluyendo alrededor del 65% de las infecciones nosocomiales (49). Incluso se conoce que el grupo de bacterias de mayor interés médico, las denominadas ESKAPE (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* y *Enterobacter* spp), deben su alta patogenicidad en buena medida a la formación de biofilms (74), por lo que se investiga de manera continua en la búsqueda de nuevas estrategias dirigidas frente a estas estructuras.

Las infecciones relacionadas con los biofilms presentan ciertas características específicas, como la colonización bacteriana, la presencia de algún material o superficie dañada, la resistencia al sistema inmunitario del hospedador y la dificultad para ser tratadas con antibióticos. Estas infecciones son especialmente comunes en patologías causadas por bacterias como *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Su aparición se asocia frecuentemente con inflamación, daño tisular y necrosis.

Las enfermedades humanas causadas por bacterias formadoras de biofilms suelen clasificarse en dos tipos: las relacionadas con dispositivos médicos, como las infecciones asociadas a sondas urinarias o catéteres venosos centrales; y las no relacionadas con dispositivos médicos, como la endocarditis de válvulas nativas, la periodontitis o las infecciones crónicas en pacientes con enfermedades pulmonares crónicas, como la fibrosis quística (52,56).

### 1.3.6. Biofilms y micobacterias.

Las primeras biofilms descritas en micobacterias fueron las formadas por los miembros de MAC, los cuales se encontraban en biofilms multiespecie (75). Posteriormente se demostró la capacidad de formar biofilms mono especie en numerosas especies de MNT.

Las micobacterias forman biofilms que poseen una estructura similar a la de otras bacterias, pero con la particularidad de que pueden formarlas no solo en relación con superficies, sino también en la interfaz con el medio aéreo. Esto se debe a la composición celular distintiva de la matriz extracelular, que presenta elevados niveles de lípidos, característica ausente en otras especies bacterianas. A diferencia de otras bacterias, las micobacterias carecen de fimbrias o pilis superficiales, y no producen los exopolisacáridos habituales en la matriz extracelular (76). Se ha demostrado que las micobacterias tienen la capacidad de adherirse a diferentes biomateriales, tales como el polivinilo (77), el diacetato de celulosa (78), y el polipropileno, con diferencias intra e interespecie (79). Por otro lado, Esteban et al. (80) demostraron que las micobacterias de crecimiento rápido pueden desarrollar biofilms usando solo el agua del grifo y otros medios extraordinariamente pobres en nutrientes, lo que puede explicar la detección de micobacterias en entornos acuáticos.

En cuanto a las moléculas necesarias para la formación de biofilms en micobacterias, se ha descubierto que los glicopéptidolípidos de *Mycobacterium smegmatis* son esenciales para la unión superficial inicial, así como para la motilidad de deslizamiento necesaria para la propagación de los biofilms a superficies contiguas (81). Otro estudio ha demostrado que los ácidos micólicos de cadena corta son esenciales para el desarrollo de la estructura del biofilm por parte de las micobacterias no móviles. Estos ácidos micólicos permiten crear una matriz extracelular hidrofóbica que reduce la permeabilidad de los antibióticos (82). Por otro lado, Ojha et al. (83) han determinado el papel esencial de la proteína GroEL1 en el desarrollo de biofilms de *M. smegmatis*.

En lo que se refiere a la ultraestructura de los biofilms de micobacterias, Muñoz-Egea et al. (84) emplearon microscopía de barrido con láser confocal (CLSM) junto con dos tinciones fluorescentes para analizar las características estructurales de biofilms formadas por algunas micobacterias de crecimiento rápido. Estos autores demostraron que el espesor máximo de los biofilms de *M. fortuitum* y *M. chelonae* se detectó a las 72 horas, mientras

que para otras micobacterias de crecimiento rápido, el máximo espesor se alcanzaba a las 96 horas. *M. chelonae* cubrió una superficie menor que *M. abscessus*, pero un área mayor que *M. fortuitum* y *M. mageritense*. Además, se detectó la presencia de autofluorescencia en la matriz extracelular, que podría ser causada por la coenzima F420, la cual puede ser secretada por las bacterias del biofilm y, por lo tanto, detectable en la matriz extracelular (84,85). También se han observado diferencias en las características de crecimiento entre las diferentes especies de *Mycobacterium*. Por ejemplo, *M. chelonae* forma un biofilm que crece verticalmente, mientras que *M. fortuitum* cubre toda la superficie con un crecimiento más fino. Por otro lado, *M. abscessus* y *M. chelonae* forman un cordón que se ha asociado con la patogenicidad debido a la expresión de la enzima deshidratasa (84,86).

La capacidad de formación de biofilms por parte de las micobacterias se ha relacionado con su presencia en fuentes ambientales, especialmente en ambientes acuáticos. Estos biofilms pueden desempeñar un papel crucial en el desarrollo de brotes, como los que incluyen infecciones secundarias en intervenciones cosméticas, procedimientos médicos y otros entornos (87). Recientemente, la especie *M. chimaera* se ha convertido en un importante patógeno nosocomial debido a un brote de infecciones asociadas con la contaminación de unidades de circulación extracorpórea (12,87,88). Esto es un ejemplo de cómo la mayor capacidad de las micobacterias sésiles para resistir la acción de los desinfectantes en comparación con las células planctónicas puede tener importantes implicaciones en la salud humana.

Uno de los síndromes más comunes causados por MNT es la enfermedad respiratoria, que puede ser provocada por micobacterias de crecimiento lento, como las de MAC, o de crecimiento rápido, como *M. abscessus*. Estas enfermedades respiratorias suelen afectar a pacientes con condiciones predisponentes, como cicatrices por tuberculosis previa, silicosis, bullas y otras cavidades pulmonares donde las MNT pueden desarrollar un biofilm que primero coloniza al huésped y luego causa una enfermedad cavitaria. Además, estos patógenos se han identificado en pacientes con bronquiectasias crónicas y fibrosis quística, las cuales se han descrito como factores predisponentes para las infecciones por MNT (89,90), dando lugar a una enfermedad nodular asociada a bronquiectasias. Se ha documentado la asociación entre estas infecciones y el biofilm en los propios pacientes,

identificándose biofilms de micobacterias en muestras histológicas de enfermedad cavitaria pulmonar (91,92).

Por otro lado, también se han descrito más infrecuentemente infecciones relacionadas con biofilms en biomateriales, siendo responsables de diferentes síndromes. Los organismos aislados más frecuentemente son las micobacterias de crecimiento rápido, aunque pueden aparecer también especies de crecimiento lento. Todas ellas se comportan como patógenos oportunistas, encontrándose en diversas infecciones relacionadas con dispositivos, como la bacteriemia relacionada con catéter intravascular, la peritonitis en diálisis peritoneal ambulatoria, infecciones de prótesis articulares, mallas de cirugía abdominal, marcapasos, válvulas cardíacas protésicas, infecciones secundarias a mamoplastia y queratitis relacionada con trasplantes de córnea. En todos estos casos, es extremadamente virtualmente imposible la eliminación de los organismos sésiles mediante antibioterapia exclusivamente (93,94), siendo imprescindible la retirada del dispositivo infectado (y con él, del biofilm) para conseguir la curación del paciente.

## **2. HIPÓTESIS.**



La tesis doctoral estudiará fundamentalmente el efecto de la claritromicina sobre biofilms formados por micobacterias de crecimiento lento del complejo *Mycobacterium avium*. Este tipo de bacterias son causantes de infecciones crónicas respiratorias, con consecuencias graves para pacientes vulnerables como pacientes con fibrosis quística.

La novedad de este proyecto radica en el estudio sobre biofilms, ya que, aunque es la forma habitual en la que se presentan estas bacterias en la infección, los estudios hasta ahora se han centrado en su estado planctónico. Además, se van a realizar estudios tanto con cepas de *M. avium* procedentes de pacientes, así como cepas de colección, para evaluar la existencia de un comportamiento diferencial. Las cepas que se van a estudiar son *M. avium*, *M. intracellulare* y *M. chimaera*.

Nuestra hipótesis es que los macrólidos, y más específicamente la claritromicina, tienen un efecto preventivo para evitar la formación del biofilm, y asimismo un efecto sobre el biofilm ya establecido que sería mayor cuanto más joven sea el biofilm de las micobacterias del complejo *M. avium*.



### **3. OBJETIVOS DEL ESTUDIO.**



### **3.1. Objetivos Generales:**

1. Estudio de biofilms formados por micobacterias de crecimiento lento del complejo *Mycobacterium avium*.
2. Efecto del antibiótico claritromicina sobre los biofilms formados por miembros del complejo *Mycobacterium avium*.

### **3.2. Objetivos Específicos:**

1. Analizar la formación de biofilms de micobacterias del complejo *M. avium* y la ultraestructura de los mismos en cepas clínicas y de colección.
2. Estudiar de sensibilidad del biofilm frente a claritromicina de cada una de las especies del complejo *M. avium* tanto en estado planctónico como sésil.
3. Estudiar la evolución de la ultraestructura del biofilm durante su formación en micobacterias del complejo *M. avium* mediante microscopía confocal laser de barrido (CLSM)
4. Estudiar la concentración preventiva de formación del biofilm en aislados clínicos y en cepas de colección de diversas especies del complejo *M. avium*.
5. Estudiar el efecto de concentraciones terapéuticas de claritromicina sobre biofilms del complejo *M. avium* y su evolución a lo largo del tiempo.



## **4. MATERIALES Y MÉTODOS.**



#### **4.1. Micobacterias empleadas en el estudio.**

Durante el estudio se utilizaron las siguientes cepas: *M. avium* ATCC 25291 (cepa tipo), *M. intracellulare* ATCC 13950 (cepa tipo) y *M. chimaera* DSM 756 (cepa tipo). También se incluyeron cepas clínicas de las siguientes especies: *M. avium* (717 y 647), *M. intracellulare* (505 y 657) y *M. chimaera* (575 y 655). La importancia de los aislamientos clínicos se estableció de acuerdo con los criterios ATS-ERS-IDSA-ESCMID. Todas las cepas se mantuvieron congeladas a -80°C. Las bacterias se conservaron congeladas a -80°C. Antes de realizar los experimentos, se descongelaron las cepas, se inocularon en placas de agar Middlebrook 7H10, se incubaron a 37°C durante 15 días y se verificó su pureza.

#### **4.2. Análisis estructural mediante microscopio de láser confocal (CLSM).**

El desarrollo de los biofilms se llevó a cabo utilizando la técnica descrita por Muñoz-Egea *et al.* (95,96), empleando placas de 2 × 4 pocillos con una superficie hidrofóbica no recubierta (Ibidi GmbH, Martinsried, Alemania), y extendiendo los tiempos de estudio del desarrollo del biofilm a 264, 192, 120 y 48 horas. Un grupo de 4 pocillos se tiñó con el tinte Nile Red© (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO), y el otro grupo se tiñó con el tinte Live/Dead BacLight© (Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kit, Invitrogen, EE. UU.) según las instrucciones proporcionadas por los fabricantes.

Se realizó Microscopía Confocal de Barrido Láser (CLSM) utilizando un microscopio Leica DM IRB (Leica, Alemania). Se evaluaron cuatro parámetros en cada ocasión: el porcentaje de superficie cubierta, el grosor, la viabilidad y la presencia de autofluorescencia. El último parámetro se analizó como el porcentaje de fluorescencia relacionado con el número de células bacterianas detectadas con la tinción Nile Red, mediante la siguiente fórmula: (% autofluorescencia de la superficie cubierta / % de superficie cubierta con Nile Red) × 100. Todas las cepas se estudiaron por triplicado.

#### **4.3. Sensibilidad frente a claritromicina del biofilm y bacterias planctónicas.**

##### **4.3.1. Sensibilidad antimicrobiana de bacterias planctónicas.**

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) utilizando el método de microdilución en caldo (36) con una modificación. La CMI se definió como la concentración mínima requerida para inhibir el crecimiento bacteriano visible. En resumen, se añadió una serie de concentraciones de claritromicina que oscilaban entre 512 y 0,5

$\mu\text{g/ml}$  con una dilución doble en caldo Müller-Hinton ajustado con cationes (Sigma Aldrich, EE. UU.) (CAMHB) suplementado con oleico, albúmina, dextrosa, catalasa (OADC) hasta un volumen final de  $100\ \mu\text{l}$  por pocillo. Se añadieron  $100\ \mu\text{l}$  de suspensión bacteriana en CAMHB a partir de una suspensión de 1-MacFarland a una placa de polipropileno de fondo redondo de 96 pocillos Costar (Corning Inc., EE. UU.), seguido de una incubación estática a  $37\ ^\circ\text{C}$  y  $5\ \%$  de  $\text{CO}_2$  durante al menos 10 días. Después de la incubación, la CMI se determinó a simple vista como el pocillo con la concentración más baja de claritromicina donde no se observó crecimiento bacteriano. La concentración bactericida mínima (CBM) se determinó mediante el método del microbicida flash (97). La CBM se define como la concentración mínima necesaria para matar una determinada concentración bacteriana. Brevemente,  $20\ \mu\text{l}$  de cada pozo de la placa de 96 pozos de la CMI se mezclaron, después de 24 h de incubación, con  $180\ \mu\text{l}$  de CAMHB suplementado con OADC en una nueva placa de 96 pocillos, que se incubó estáticamente a  $37^\circ\text{C}$  y  $5\%$  de  $\text{CO}_2$  durante 10 días. Después de la incubación, se determinó a simple vista que la CMB era el pocillo con la concentración más baja de claritromicina en el que no se observó crecimiento bacteriano. Los experimentos se realizaron tres veces.

#### **4.3.2. Sensibilidad antimicrobiana de bacterias sésiles.**

Se determinó la concentración mínima inhibidora de biofilm (CMIB) y la concentración mínima de erradicación de biofilm (CMEB). La CMIB es la concentración mínima requerida para inhibir el crecimiento visible de un biofilm bacteriana. Para la CMIB, los biofilms se desarrollaron en placas de fondo plano de 96 pocillos no tratadas (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), adhiriendo previamente  $150\ \mu\text{L}$  de una suspensión de  $1,00\pm 0,02$  MacFarland de cada cepa en agua del grifo, esterilizada durante 3 h a  $37^\circ\text{C}$  y  $\text{CO}_2$ . Después de la incubación, cada pocillo se lavó con  $150\ \mu\text{l}$  de agua del grifo estéril y se depositaron por pocillo  $150\ \mu\text{l}$  de Middlebrook 7H9 suplementado con OADC. La placa se incubó estáticamente a  $37^\circ\text{C}$  y  $5\%$  de  $\text{CO}_2$  durante 7 días. Después del crecimiento del biofilm, cada pocillo se lavó con  $150\ \mu\text{l}$  de solución salina tampón fosfato estéril y se llenó con  $200\ \mu\text{l}$  de CAMHB suplementado con OADC que contenía diferentes concentraciones de claritromicina, que oscilaban entre  $512$  y  $0,5\ \mu\text{g/ml}$  con una dilución doble. La placa se incubó estáticamente a  $37^\circ\text{C}$  y  $5\%$  de  $\text{CO}_2$  durante al menos 10 días. Después de la

incubación, se determinó a simple vista que la CMIB era el pozo con la concentración más baja de claritromicina donde no se observó crecimiento planctónico. En el caso de la CMEB, definida como la concentración mínima requerida para matar un biofilm bacteriana, se descartó el fondo de cada pocillo con una punta de 100  $\mu$ l para separar físicamente el biofilm de la superficie inferior de cada pocillo, y se transfirieron 20  $\mu$ l de cada pocillo a un pocillo nuevo que contenía 180  $\mu$ l de CAMHB suplementado con OADC. La placa se incubó estáticamente a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 10 días. Después de la incubación, se determinó a simple vista la CMEB como el pocillo con la concentración más baja de antibiótico donde no se observó crecimiento bacteriano. Los experimentos se realizaron tres veces, y en todos ellos se emplearon controles positivos (con micobacteria y sin antibiótico) y negativos (sin micobacteria y sin antibiótico).

#### **4.4. Estudio de la concentración mínima de prevención de formación de biofilms frente a claritromicina.**

La sensibilidad en biofilms se determinó según lo propuesto por Fernández-Olmos *et al.* (98) con modificaciones. Se utilizó claritromicina en concentraciones entre 0,25 y 256  $\mu$ g/mL. Todas las cepas se suspendieron a  $0,5 \pm 2$  en la escala de McFarland en medio de cultivo Middlebrook y se colocaron 75  $\mu$ L en un pocillo de una placa de 96 pocillos después de agregar 75  $\mu$ L de diluciones seriadas de CHL. Las placas se incubaron durante 10 días para las cepas de MAC. En todos los experimentos se emplearon controles positivos con micobacteria y sin antibiótico y controles negativos sin micobacteria y sin antibiótico. Después de la incubación, se determinó la Concentración Preventiva de Biofilm (PBC) por la falta de formación de biofilm mediante inspección visual utilizando un microscopio invertido (Leica, LEITZ DM IL) y midiendo las placas en un espectrofotómetro (TECAN) a OD<sub>595nm</sub>. Todas las cepas se estudiaron por triplicado.

#### **4.5. Estudio del efecto de claritromicina en la estructura del biofilm mediante microscopio de láser confocal.**

Se realizó el mismo estudio descrito anteriormente incluyendo claritromicina en el medio de cultivo a una concentración de 11,3 mg/L en diferentes momentos, utilizando una fila de pocillos como control sin antibiótico. La concentración de 11,3 mg/L de claritromicina es la alcanzada en los pulmones cuando un paciente recibe este tratamiento (99). Después del

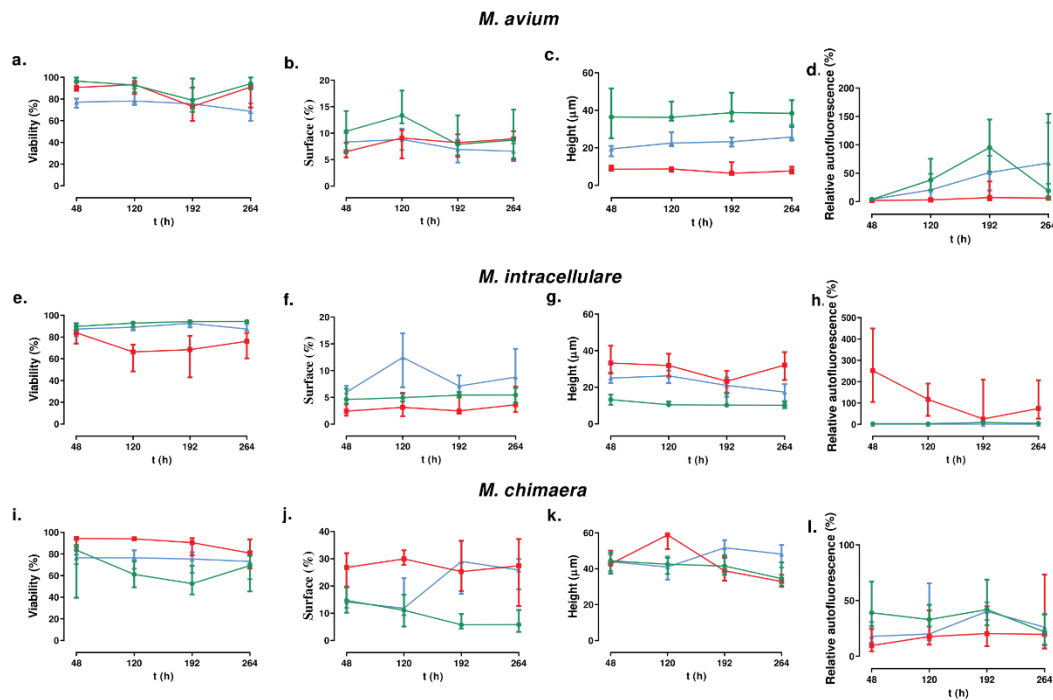
tratamiento, cada pocillo se tiñó con tinción Live/Dead BacLight®. Todas las cepas se probaron por triplicado.

## **5. RESULTADOS.**



## 5.1. Análisis estructural mediante CLSM.

Los resultados del análisis estructural de los biofilms con láser confocal se presentan en la Figura 11. La evaluación temporal de la viabilidad de las cepas de *M. avium* mostró que no se pueden detectar diferencias para la cepa de referencia (valor  $p=0,1212$ ), pero sí para las cepas clínicas (valores  $p=0,0052$  y  $0,0018$  para las cepas 647 y 717, respectivamente). En el caso de *M. intracellulare*, la variación se observó para la cepa de referencia (valor  $p<0,0001$ ) y la cepa 657 (valor  $p=0,0248$ ), pero no para la cepa 505. Por último, para *M. chimaera* la variación mostró características similares a las observadas con *M. intracellulare* (valores de  $p = 0,0,0227$  para la cepa de referencia y  $0,0003$  para la cepa 655, pero no significativos para la cepa 575) (Figura 11).



**Figura 11. Estudio de la viabilidad (a,e,i), superficie cubierta (b,f,j), altura (c,g,k) y autofluorescencia relativa (d,h,l) de los biofilms.** El verde, el azul y el rojo representan cepas de referencia, cepas no clínicamente significativas y cepas clínicamente significativas de cada cepa. Las barras de error representan el rango intercuartil.

En el caso de la superficie cubierta, se observaron diferencias para la cepa de referencia de *M. avium* (valor de  $p=0,0202$ ) y la cepa 717 (valor de  $p=0,0001$ ), para las cepas de *M. intracelular* 657 (valor de  $p=0,0234$ ) y 505 ( $p$ -valor= $0,0042$ ), y para la cepa de referencia de *M. chimaera* (valor  $p<0,0001$ ) y la cepa 575 (valor  $p=0,0426$ ). Además, se observaron

diferencias en la evolución de la altura durante el tiempo para la cepa clínica de *M. avium* (valor  $p=0,0913$  y  $<0,0001$  para el aumento de la altura para las cepas 647 y 717, respectivamente), para la disminución de la altura en la cepa de referencia de *M. intracelular* y la cepa 505 ( $p < 0,0001$  para ambos), y un aumento en la cepa 575 de *M. chimaera* (valor  $p=0,0001$ ); pero una disminución para la cepa de referencia de *M. chimaera* (valor  $p=0,0019$ ) y la cepa 655 (valor  $p < 0,0001$ ). No se detectaron diferencias en altura para las otras cepas (Figura 11).

También se detectaron diferencias en la evolución de la autofluorescencia para todas las cepas de *M. avium* (valores de  $p = 0,0004$  para la cepa de referencia y  $<0,0001$  para ambas cepas clínicas), para la cepa de referencia de *M. intracelular* (aumento, valor de  $p = 0,0101$ ) y para la cepa 655 (disminución, valor de  $p=0,0002$ ), y para la cepa de referencia de *M. chimaera* (disminución, valor de  $p=0,0426$ ) y la cepa 655 (aumento, valor de  $p=0,0007$ ) (Figura 11).

#### **5.1.1. Variaciones intraespecie para *M. avium*.**

A las 48 horas, la viabilidad de las tres cepas fue significativamente diferente (valor de  $p=0,001$  para la prueba de Kruskal-Wallis); ordenándose de manera descendente como cepas de referencia, cepa 647 y cepa 717, con diferencias estadísticamente significativas entre las mismas (valor  $p < 0,05$  para la prueba de Wilcoxon). En lo que se refiere a la superficie cubierta, la cobertura de las cepas de referencia y 717 fue similar (valor  $p = 0,1345$  para la prueba de Wilcoxon), mientras que la superficie cubierta por la cepa 647 fue significativamente menor que la de referencia y la de la 717 (valor de  $p < 0,05$  para la prueba de Wilcoxon). La autofluorescencia de las tres cepas fue significativamente diferente (valor de  $p = 0,0003$  para la prueba de Kruskal-Wallis), ordenándose de manera descendente como sigue: cepa 647, cepa de referencia y cepa 717. No hubo diferencias significativas entre las cepas de referencia y las cepas CON (valor de  $p=0,7092$  para la prueba de Wilcoxon). La altura del biofilm de las tres cepas fue significativamente diferente (valor de  $p= 0,0001$  para la prueba de Kruskal-Wallis), siendo mayor la de la cepa de referencia seguida por las cepas 647 y 717.

A las 120 horas, la viabilidad de las tres cepas fue significativamente diferente (valor de  $p=0,0001$  para la prueba de Kruskal-Wallis), siendo la cepa 717 la que presentó menor

viabilidad (valor  $p < 0,001$ ); no hubo diferencias significativas entre la cepa de referencia y la cepa 647 (valor de  $p = 0,3472$ ). La superficie cubierta por las cepas de referencia y 707 fue similar (valor de  $p = 0,0001$  para la prueba de Wilcoxon); la superficie cubierta por la cepa de referencia fue significativamente mayor que la de las cepas clínicas (valor de  $p < 0,00001$  para la prueba de Wilcoxon), sin observarse diferencias significativas entre las cepas 717 y 647 (valor de  $p = 0,4688$ ). En lo que se refiere a la autofluorescencia, se observaron diferencias significativas entre las tres cepas (valor de  $p = 0,0001$  para la prueba de Kruskal-Wallis), siendo mayor para la cepa de referencia, seguida por las cepas 717 y 647. Por último, la altura del biofilm de las tres cepas fue significativamente diferente (valor de  $p = 0,0001$  para la prueba de Kruskal-Wallis), siguiendo el mismo orden de la autofluorescencia (cepa de referencia > cepa 717 > cepa 647).

A las 192 horas, se observó una viabilidad similar para las tres cepas (valor  $p = 0,1995$  para la prueba de Kruskal-Wallis), así como la superficie cubierta por las mismas (valor  $p = 0,2198$  para la prueba de Kruskal-Wallis). Se observaron diferencias significativas en la autofluorescencia de las tres cepas (valor de  $p = 0,0001$  para la prueba de Kruskal-Wallis; valor de  $p < 0,05$  para la prueba de Wilcoxon), siendo mayor en la cepa de referencia, la cepa 717 y, por último, la cepa 647. La altura del biofilm de las tres también fue estadísticamente significativa (valor de  $p = 0,0001$  para la prueba de Kruskal-Wallis, valor de  $p < 0,05$  para la prueba de Wilcoxon), mostrándose el siguiente orden: cepa de referencia > cepa 717 > cepa 647.

A las 264 horas, la viabilidad de las tres cepas fue significativamente diferente (valor de  $p = 0,0001$  para la prueba de Kruskal-Wallis), siendo más viable la cepa de referencia, seguida por las cepas 647 y 717; cada cepa fue estadísticamente diferente de las demás (valor de  $p < 0,05$  para la prueba de Wilcoxon). La superficie cubierta por la cepa de referencia y la 717 fue similar (valor de  $p = 0,0152$  para la prueba de Wilcoxon), siendo el área de superficie cubierta por la cepa 717 significativamente mayor que la de la 647 y la de referencia (valor de  $p < 0,05$  para la prueba de Wilcoxon); no hubo diferencias significativas entre la cepa de referencia y la cepa 647 (valor de  $p = 0,5642$ ). La altura del biofilm de las tres cepas fue significativamente diferente (valor de  $p = 0,0001$  para la prueba de Kruskal-Wallis), siendo mayor para la cepa de referencia, la cepa 717 y la cepa 647. La autofluorescencia de las tres cepas fue significativamente diferente (valor de  $p = 0,0001$  para

la prueba de Kruskal-Wallis), observándose mayor autofluorescencia en la cepa 717, la cepa de referencia y la cepa 647; cada cepa fue estadísticamente diferente de las demás (valor de  $p < 0,05$  para la prueba de Wilcoxon).

### **5.1.2. Variaciones intraespecie para *M. intracellulare*.**

A las 48 horas, la viabilidad de las tres cepas fue significativamente diferente (valor de  $p=0,0004$  para la prueba de Kruskal-Wallis), siendo mayor para la cepa de referencia, la cepa 505 y la cepa 657; encontrándose que la viabilidad de la cepa 657 fue significativamente menor que la del resto de cepas (valor  $p < 0,05$ ). No se observaron diferencias significativas entre la cepa de referencia y la cepa 505 (valor de  $p=0,1242$ ). También se encontraron diferencias significativas en la superficie por las cepas (valor de  $p=0,0001$  para la prueba de Kruskal-Wallis), siendo mayor para la cepa 505, cepa de referencia y cepa 657; cada cepa fue estadísticamente diferente de las demás (valor  $p < 0,05$  para la prueba de Wilcoxon). La autofluorescencia de las tres cepas fue significativamente diferente (valor  $p = 0,0001$  para la prueba de Kruskal-Wallis), siendo mayor para a cepa 657, la cepa de referencia y la cepa 505; cada cepa fue estadísticamente diferente de las demás (valor de  $p < 0,0001$  para la prueba de Wilcoxon). En cuanto a la altura del biofilm, se encontraron diferencias significativas entre las tres cepas (valor de  $p = 0,0001$  para la prueba de Kruskal-Wallis), reportándose el siguiente orden: cepa 657 > cepa de referencia > cepa 505; cada cepa fue estadísticamente diferente de las demás (valor de  $p < 0,001$  para la prueba de Wilcoxon).

A las 120 horas, la viabilidad de las tres cepas fue significativamente diferente (valor de  $p=0,0001$  para la prueba de Kruskal-Wallis), presentando mayor viabilidad la cepa de referencia, la cepa 505 y la cepa 657; la viabilidad de la cepa 657 fue significativamente mayor que la de las cepas de referencia y la 505 (valor de  $p < 0,0001$  para la prueba de Wilcoxon), y no se observaron diferencias significativas entre la cepa 505 y la cepa de referencia (valor de  $p = 0,0863$ ). El área de superficie cubierta por las cepas de referencia y 505 fue similar (valor de  $p = 0,0001$  para la prueba de Wilcoxon), en orden descendente: cepa 505, cepa de referencia y cepa 657. Cada cepa fue estadísticamente diferente de las demás (valor  $p < 0,01$  para la prueba de Wilcoxon). La autofluorescencia de las tres cepas fue significativamente diferente (valor  $p = 0,0001$  para la prueba de Kruskal-Wallis), ordenándose de manera descendente como cepa 657, cepa 505 y cepa de referencia; cada

cepa fue estadísticamente diferente de las demás (valor de  $p < 0,01$  para la prueba de Wilcoxon). La altura del biofilm de las tres cepas fue significativamente diferente (valor de  $p = 0,0001$  para la prueba de Kruskal-Wallis), siendo el orden cepa 657 > cepa de referencia > cepa 505; cada cepa fue estadísticamente diferente de las demás (valor de  $p < 0,01$  para la prueba de Wilcoxon).

A las 192 horas, la viabilidad de las tres cepas fue estadísticamente diferente (valor  $p = 0,0001$  para la prueba de Kruskal-Wallis), en orden descendente: cepa de referencia, cepa 505 y cepa 657; la viabilidad de la cepa 657 fue significativamente menor que la de las otras dos cepas (valor de  $p < 0,0001$  para la prueba de Wilcoxon), y no se observaron diferencias significativas entre la cepa 505 y la cepa de referencia (valor de  $p = 0,1354$ ). La superficie cubierta por las tres cepas fue significativamente diferente (valor de  $p = 0,0001$  para la prueba de Kruskal-Wallis), en orden descendente: cepa 505, cepa de referencia y cepa 657; cada cepa fue estadísticamente diferente de las demás (valor  $p < 0,001$  para la prueba de Wilcoxon). La autofluorescencia de las tres cepas fue significativamente diferente (valor  $p = 0,0001$  para la prueba de Kruskal-Wallis), siendo mayor para la cepa 657, la cepa de referencia y la cepa 505; cada cepa fue estadísticamente diferente de las demás (valor de  $p < 0,001$  para la prueba de Wilcoxon). La altura del biofilm de las tres cepas fue significativamente diferente (valor de  $p = 0,0001$  para la prueba de Kruskal-Wallis), en orden descendente: cepa 657, cepa 505 y cepa de referencia; la altura del biofilm de la cepa de referencia fue significativamente menor que la de las otras dos cepas (valor de  $p < 0,0001$  para la prueba de Wilcoxon), y no se encontraron diferencias significativas entre la cepa 657 y la cepa 505 (valor de  $p = 0,11896$ ).

A las 264 horas, la viabilidad de las tres cepas fue significativamente diferente (valor de  $p = 0,0001$  para la prueba de Kruskal-Wallis), en orden descendente: cepa de referencia, cepa 505 y cepa 657; cada cepa fue estadísticamente diferente de las demás (valor  $p < 0,001$  para la prueba de Wilcoxon). La superficie cubierta fue significativamente diferente (valor  $p = 0,0001$  para la prueba de Kruskal-Wallis), en orden descendente: cepa 505, cepa de referencia y cepa 657; cada cepa fue estadísticamente diferente de las demás (valor de  $p < 0,001$  para la prueba de Wilcoxon). La autofluorescencia de las tres cepas fue significativamente diferente (valor de  $p = 0,0001$  para la prueba de Kruskal-Wallis), siendo mayor para la cepa 657, seguida de la cepa de referencia y la cepa 505; cada cepa fue

estadísticamente diferente de las demás (valor de  $p < 0,001$  para la prueba de Wilcoxon). Por último, la altura del biofilm de las tres cepas fue significativamente diferente (valor de  $p = 0,0001$  para la prueba de Kruskal-Wallis), siendo más altas los biofilms de la cepa 657, seguida de las cepas 505 y cepa de referencia; cada cepa fue estadísticamente diferente de las demás (valor de  $p < 0,001$  para la prueba de Wilcoxon).

### **5.1.3. Variaciones intraespecie para *M. chimaera*.**

A las 48 horas, la viabilidad de las tres cepas fue significativamente diferente (valor de  $p=0,0001$  para la prueba de Kruskal-Wallis), ubicándose en orden descendente como cepa 655, cepa de referencia y cepa 575; la viabilidad de la cepa 655 fue significativamente mayor que la del resto de cepas (valor  $p < 0,0001$ ), y no se encontraron diferencias significativas entre la cepa de referencia y la cepa 575 (valor de  $p=0,2254$ ). La superficie cubierta por las cepas fue significativamente diferente (valor de  $p=0,0001$  para la prueba de Kruskal-Wallis), siendo la de la cepa 655 significativamente mayor que la de las cepas de referencia y la 575 (valor de  $p < 0,05$  para la prueba de Wilcoxon). No hubo diferencias significativas entre la cepa de referencia y la cepa 575 (valor de  $p=0,6256$ ). La autofluorescencia de las tres cepas fue significativamente diferente (valor de  $p=0,0001$  para la prueba de Kruskal-Wallis), en orden descendente: cepas de referencia, cepa 575 y cepa 655; cada cepa fue estadísticamente diferente de las demás (valor de  $p < 0,01$  para la prueba de Wilcoxon). No se observaron diferencias significativas en la altura del biofilm entre las tres cepas (valor de  $p = 0,963$  para la prueba de Kruskal-Wallis).

A las 120 horas, la viabilidad de las tres cepas fue significativamente diferente (valor de  $p=0,0001$  para la prueba de Kruskal-Wallis), en orden descendente: cepas 575, cepa de referencia y cepa 655; cada cepa fue estadísticamente diferente de las demás (valor  $p < 0,001$  para la prueba de Wilcoxon). La superficie cubierta por la cepa de referencia y 575 fue similar (valor  $p = 0,0001$  para la prueba de Wilcoxon), mientras que el área de superficie cubierta por la cepa 655 fue significativamente mayor que la de las cepas de referencia y la 575 (valor de  $p < 0,0001$  para la prueba de Wilcoxon); no hubo diferencias significativas entre la cepa 575 y la cepa de referencia (valor de  $p=0,1184$ ). La autofluorescencia de las tres cepas fue significativamente diferente (valor de  $p=0,0001$  para la prueba de Kruskal-Wallis), siendo mayor para la cepa de referencia, seguida de las cepas 575 y 655; la autofluorescencia de la cepa de referencia fue significativamente mayor que

la de la cepa 655 (valor de  $p = 0,0232$  para la prueba de Wilcoxon), y no hubo diferencias significativas entre la cepa 575 y la cepa 655, o entre la cepa 575 y la cepa de referencia (valor  $p > 0,15$ ). La altura del biofilm de las tres cepas fue significativamente diferente (valor  $p = 0,0001$  para la prueba de Kruskal-Wallis), la altura del biofilm de la cepa 655 fue significativamente mayor que la de las otras dos cepas (valor de  $p < 0,0001$  para la prueba de Wilcoxon); no hubo diferencias significativas entre la cepa 575 y la cepa de referencia (valor de  $p = 0,6492$ ).

A las 192 horas, la viabilidad de las tres cepas fue estadísticamente diferente (valor  $p = 0,0001$  para la prueba de Kruskal-Wallis), en orden descendente: cepa 655, cepa 575 y cepa de referencia; cada cepa fue estadísticamente diferente de las demás (valor de  $p < 0,0001$  para la prueba de Wilcoxon). La superficie cubierta por las tres cepas fue significativamente diferente (valor de  $p = 0,0001$  para la prueba de Kruskal-Wallis); la superficie cubierta por biofilm de la cepa de referencia fue significativamente menor que la de las otras dos cepas (valor de  $p < 0,0001$  para la prueba de Wilcoxon), y no se observaron diferencias significativas entre la cepa 575 y la cepa 655 (valor de  $p = 0,9411$ ). La autofluorescencia de las tres cepas fue significativamente diferente (valor de  $p = 0,0475$  para la prueba de Kruskal-Wallis); la autofluorescencia de la cepa de referencia fue significativamente mayor que la de la cepa 655 (valor de  $p = 0,0232$  para la prueba de Wilcoxon), sin encontrarse diferencias entre la cepa 575 y la cepa 655 o entre la cepa 575 y la cepa de referencia (valor  $p > 0,15$ ). La altura del biofilm de las tres cepas fue significativamente diferente (valor  $p = 0,0001$  para la prueba de Kruskal-Wallis); la altura del biofilm de la cepa 655 fue significativamente menor que la de las otras dos cepas (valor de  $p < 0,001$  para la prueba de Wilcoxon), sin encontrarse diferencias significativas entre la cepa 655 y la cepa de referencia (valor de  $p = 0,1958$ ).

A las 264 horas, la viabilidad de las tres cepas fue significativamente diferente (valor de  $p = 0,0031$  para la prueba de Kruskal-Wallis), en orden descendente: cepa 655, cepa 575 y cepa de referencia; la viabilidad de la cepa 655 fue significativamente mayor que la de las otras dos cepas estudiadas (valor de  $p < 0,05$  para la prueba de Wilcoxon), y no hubo diferencias significativas entre la cepa 575 y la cepa de referencia (valor de  $p = 0,2544$ ). El área de superficie cubierta por las cepas de referencia y 575 fue similar (valor de  $p = 0,0001$  para la prueba de Wilcoxon), la superficie cubierta por la cepa de referencia fue

significativamente menor que la de las otras dos cepas estudiadas (valor de  $p < 0,0001$  para la prueba de Wilcoxon), y no hubo diferencias significativas entre la cepa 575 y la cepa 655 (valor  $p=0,9411$ ). La autofluorescencia de las tres cepas no fue significativamente diferente (valor  $p=0,5166$  para la prueba de Kruskal-Wallis). La altura del biofilm de las tres cepas fue significativamente diferente (valor de  $p=0,0001$  para la prueba de Kruskal-Wallis), siendo la altura de la cepa 575 fue significativamente mayor que la de las otras dos cepas del estudio.

## **5.2. Sensibilidad frente a claritromicina de biofilm y bacterias planctónicas (CMI, CMB, CMIB, CMEB).**

Los resultados de la evaluación de la sensibilidad a la claritromicina por parte de bacterias planctónicas y sésiles de varios miembros del complejo *M. avium* se presentan en la Tabla 4. Se puede observar que la cepa 717 de *M. avium* presentó un valor de CMI mayor que la cepa de referencia y la cepa 647, mientras que el mayor valor de CMB lo presentó la cepa de referencia de *M. avium*. En el caso de *M. intracellulare*, los valores de CMI de todas las cepas fueron inferiores a  $1 \mu\text{g/mL}$ , mientras que el mayor valor de CMB fue el presentado por la cepa de referencia, seguida de la cepa 657 y la cepa 505. Por último, la cepa 655 de *M. chimaera* fue la que presentó el mayor valor de CMI, mientras que el mayor valor de CMB fue de la cepa clínica 675. Cuando se trata de las bacterias que pertenecen al biofilm, la que presenta el mayor valor de CMIB y de CMEB es la cepa de referencia, seguida por las cepas clínicas 717 y 647. Para las cepas de *M. intracellulare*, la cepa de referencia y la clínica 505 tienen valores de CMIB menores a  $1 \mu\text{g/mL}$ , mientras que la cepa 657 presentó un valor de CMIB mayor a  $1 \mu\text{g/mL}$ ; en lo que se refiere a los valores de CMEB, el mayor es para la cepa de referencia seguida de la cepa 657 y la cepa 505. Por último, los valores de CMIB de la cepa comercial y la cepa 655 de *M. chimaera* fueron de  $16 \mu\text{g/mL}$ , mientras que para la cepa 575 fue menor o igual a  $1 \mu\text{g/mL}$ ; mientras que los valores de CMEB fueron de  $32 \mu\text{g/mL}$  para la cepa 575,  $16 \mu\text{g/mL}$  para la cepa 655 y menor o igual a  $1 \mu\text{g/mL}$  para la cepa de referencia (Tabla 4).

**Tabla 4. Evaluación de la sensibilidad a la claritromicina de la cepas del complejo *M. avium*.**

<b>CEPA</b>	<b>CMI (µg/mL)</b>	<b>CMB (µg/mL)</b>	<b>CMIB (µg/mL)</b>	<b>CMEB (µg/mL)</b>
<i>M. avium</i> CECT 670	4	<256	16	<256
<i>M. avium</i> 717	8	8	8	8
<i>M. avium</i> 647	≤1	≤1	≤1	≤1
<i>M. intracellulare</i> 669	≤1	16	≤1	32
<i>M. intracellulare</i> 505	≤1	≤1	≤1	≤1
<i>M. intracellulare</i> 657	≤1	8	>1	16
<i>M. chimaera</i> DSM	≤1	≤1	16	≤1
<i>M. chimaera</i> 575	≤1	8	≤1	32
<i>M. chimaera</i> 655	8	≤1	16	16

CMI, concentración mínima inhibitoria; CMB, concentración mínima bactericida; CMIB, concentración mínima inhibitoria del biofilm; CMEB, concentración mínima de erradicación del biofilm.

### **5.3. Estudio de la concentración de prevención de formación de biofilms frente a claritromicina.**

En la Tabla 5 se encuentran los valores de CMI y de CPB de las cepas del complejo *M. avium* analizadas en este estudio, encontrándose que para todos los aislados clínicos del complejo *M. avium*, exceptuando la cepa 655 de *M. chimaera*, resultaron sensibles a la claritromicina.

Cuando se observan los valores de CPB, no se observa una tendencia o característica en común inter o intraespecie, aunque en líneas generales los valores de prevención del biofilm son superiores a los de CMI, lo que es indicativo de que la claritromicina es capaz de inhibir el crecimiento de bacterias planctónicas, pero es menos eficiente en la prevención de la formación del biofilm, e incluso en la eliminación de este cuando ya se ha instaurado y formado por completo.

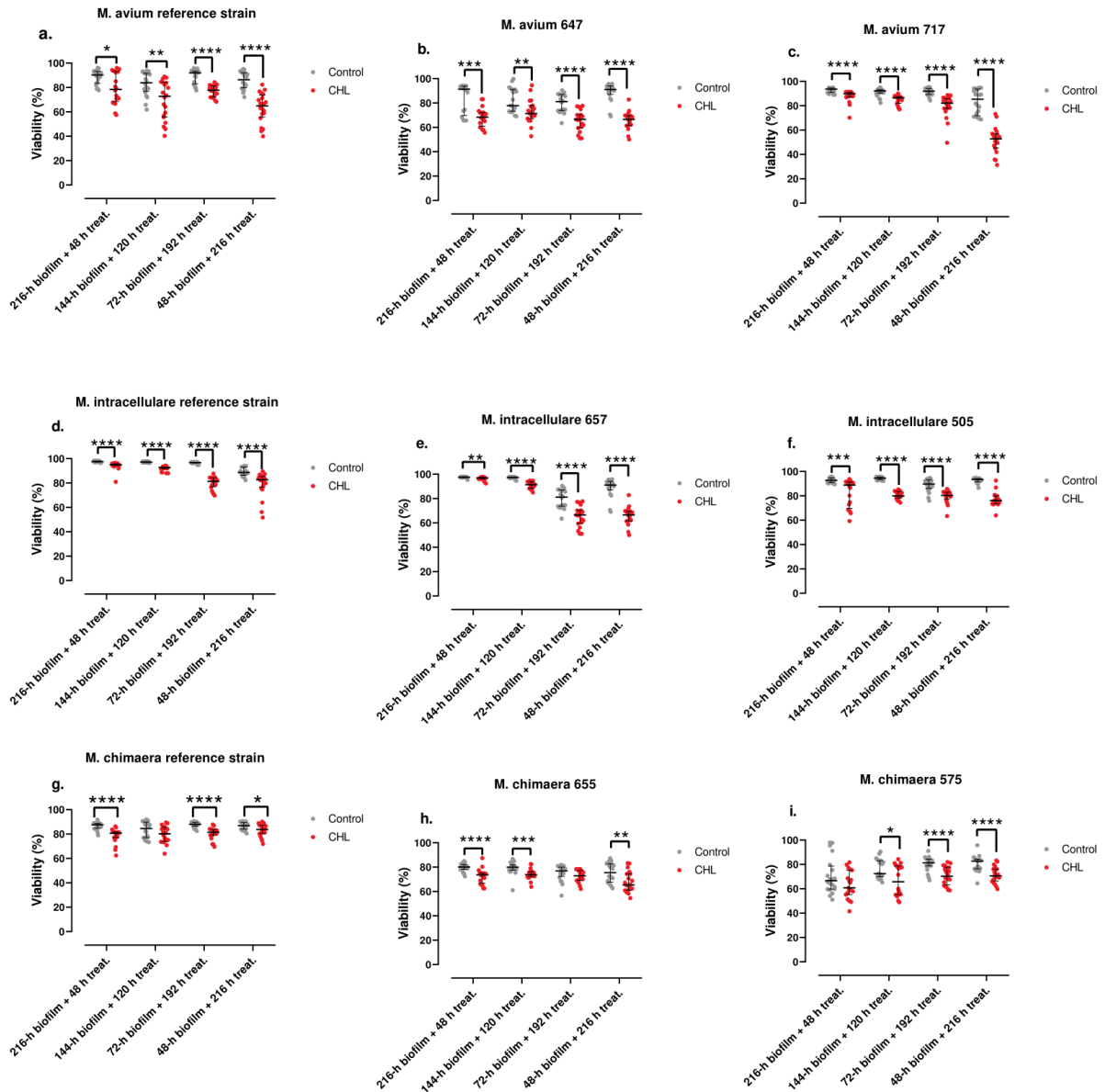
**Tabla 5. Comparación entre los valores de concentración mínima inhibitoria y de prevención de la formación del biofilm de las cepas del complejo *M. avium*.**

Cepa	CMI	CPB
<i>M. avium</i> ATCC 25291	4	16
<i>M. intracellulare</i> ATCC 13950	8	8
<i>M. chimaera</i> DSM 44623	≤1	1
<i>M. avium</i> 717	≤1	16
<i>M. avium</i> 647	≤1	16
<i>M. intracellulare</i> 505	≤1	8
<i>M. intracellulare</i> 657	≤1	4
<i>M. chimaera</i> 575	≤1	1
<i>M. chimaera</i> 655	8	16

CMI, concentración mínima inhibitoria; CPB, concentración de prevención del biofilm.

#### **5.4. Estudio del efecto de claritromicina en la estructura del biofilm mediante CLSM.**

Los efectos de la claritromicina en la estructura del biofilm se muestran en la Figura 12. La viabilidad de las bacterias contenidas en el biofilm de *M. avium* cepa 717 mostró una fuerte correlación negativa con el tiempo de tratamiento ( $\rho = -0,8211$ ; valor de  $p < 0,0001$ ), mientras que la de la cepa de referencia de *M. avium* presentó una correlación negativa débil con el tiempo de tratamiento ( $\rho = -0,3239$ ; valor de  $p = 0,0033$ ); por último, viabilidad de las bacterias contenidas en el biofilm de *M. avium* cepa 647 no mostró una correlación clara con el tiempo de tratamiento (valor de  $p = 0,0714$ ).



**Figura 12. Viabilidad del biofilm de tratado con claritromicina para cepas clínicas de *M. avium* (a,b,c), *M. intracellulare* (d,e,f) y *M. chimaera* (g,h,i).** Las barras representan el rango intercuartil. \*: p-value<0.05, \*\*: p-value<0.01, \*\*\*: p-value<0.001, \*\*\*\*: p-value<0.0001 para la prueba de Wilcoxon.

En el caso de *M. intracellulare*, la viabilidad de las bacterias contenidas en el biofilm de la cepa de referencia presentó una correlación positiva muy fuerte con el tiempo de tratamiento ( $\rho=-0,8090$ ; valor de  $p<0,0001$ ), la de la cepa 505 presentó una correlación negativa débil con el tiempo de tratamiento ( $\rho=-0,3045$ ; valor de  $p=0,0060$ ), y la de la cepa 657 mostró una correlación negativa muy fuerte con el tiempo de tratamiento ( $\rho=-0,9281$ ;

valor de  $p < 0,0001$ ). Por último, la viabilidad de las bacterias contenidas en el biofilm de la cepa de referencia de *M. chimaera* mostró una correlación positiva débil con el tiempo de tratamiento ( $\rho = 0,2783$ ; valor de  $p = 0,0124$ ), al igual que las de la cepa 575 ( $\rho = 0,2871$ ; valor de  $p = 0,0103$ ), pero no las de la cepa 655 para las cuales la correlación fue negativa y débil ( $\rho = -0,2271$ ; valor de  $p = 0,0428$ ).

## **6. DISCUSIÓN.**



### 6.1. Análisis estructural mediante CLSM.

El complejo *M. avium* es un grupo de micobacterias no tuberculosas que incluye varias especies, encontrándose principalmente 3 de ellas en muestras clínicas (*M. avium*, *M. intracellulare* y *M. chimaera*). Estas 3 especies han sido descritas como patógenos humanos, especialmente en el tracto respiratorio en pacientes con enfermedades subyacentes, así como enfermedad diseminada en pacientes inmunodeprimidos, especialmente pacientes con Sida (100). Las infecciones causadas por estos organismos son difíciles de diagnosticar, gracias a que en algunos casos pueden aparecer como colonizaciones o contaminaciones de fuentes ambientales, con lo que su aislamiento no implica necesariamente enfermedad. Debido a esto, se han publicado varias directrices que incluyen criterios específicos para el diagnóstico de infecciones del complejo *M. avium* (8,9). Muchas de estas infecciones, especialmente las pulmonares, se han considerado relacionadas con biofilms, capacidad que ha sido demostrada desde hace varios años para las micobacterias, y que se considera un factor patogénico esencial en el desarrollo de estas infecciones (91,92). Además, se ha demostrado que las bacterias sésiles presentan una mayor resistencia a los antibióticos que las planctónicas, lo que ha originado que el manejo de los pacientes infectados con miembros del complejo *M. avium* incluya tratamientos prolongados con combinaciones de varios antibióticos; sin embargo, en muchos casos dicha antibioterapia resulta ineficaz gracias a la resistencia conferida por la formación de biofilms (93,94,101).

Se ha demostrado que los miembros del complejo *M. avium* tiene la capacidad de formar biofilms *in vitro*, dependiente de la presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  a concentraciones de 1  $\mu\text{M}$ , y concentraciones de glucosa al 2% como fuente de carbono (75), lo que ha permitido desarrollar técnicas orientadas al estudio *in vitro* de estas estructuras, así como al desarrollo de métodos potencialmente destinados a disminuir la colonización y desarrollo de estas biofilms en superficies biomédicas (102); sin embargo, la gran mayoría de los estudios se han realizado con cepas de colección o cepas de referencia. En el presente estudio se evaluó la formación de biofilms por parte de cepas clínicas de diferente relevancia y de diferentes especies, con el objetivo de encontrar diferencias interespecie e intraespecie en la formación de biofilms por parte de diferentes miembros del complejo *M. avium*. Para ello se usaron las tinciones Nile Red© y BacLight© Live/Dead para la

evaluación de diversos parámetros del biofilm, tales como el porcentaje superficie cubierta, espesor, viabilidad y presencia de autofluorescencia, con y sin antibióticos, con la finalidad de determinar su importancia relativa en la resistencia al tratamiento y elucidar la existencia de patrones específicos de cada especie.

A pesar de que en este estudio se observaron diferencias para cada uno de los parámetros evaluados en cada una de las especies analizadas, no se ha logrado determinar ningún patrón específico de especie de relevancia clínica (Figura 11). En un estudio previo, Portell-Buj *et al.* (103) reportaron la formación de biofilms *in vitro* en aislados clínicos de MAC mediante el uso de un protocolo basado en la adherencia a placas de 96 pocillos y el método de cristal violeta. Los autores observaron diferencias no significativas entre *M. avium* y *M. intracellulare*, siendo las cepas de *M. avium* formadoras más fuertes que las de *M. intracellulare*, encontrando que el 82% de *M. avium* y el 62% de *M. intracellulare* formaron un biofilm de moderada a fuerte. Por el contrario, el 18% de *M. avium* y el 38% de *M. intracellulare* son productores débiles o no productores, respectivamente. Los resultados de este estudio corroboran que una proporción importante de aislados clínicos de MAC pueden producir biofilms, y debido a las diferencias de los biofilms dependientes de la especie, se hace necesario identificar a los aislados de MAC a nivel de especie, ya que permitiría un mejor manejo del paciente.

En el caso del presente estudio, no se han detectado estas diferencias, ni en las comparaciones interespecie ni en los análisis de los aislados pertenecientes a la misma especie. Aunque se necesitan más estudios para comprender la formación de biofilms por parte de MAC para determinar completamente sus implicaciones en los pacientes con infecciones causadas por MAC, se puede concluir de manera preliminar que la formación de biofilms depende de la cepa, ya que no se pueden detectar diferencias claras entre especies, al menos en este estudio (Figura 11). En este sentido, el estudio de Johansen *et al.*, empleando cepas de *M. avium* de diversas procedencias humanas y animales, tampoco encontró ninguna correlación entre la capacidad de formación de biofilm y diversas variables, tales como el perfil de RFLP, la sequencia de *hsp65*, la morfología de colonia o la presencia de genes de síntesis de glicopeptidolípidos (104).

## **6.2. Sensibilidad frente a claritromicina de biofilm y de las bacterias planctónicas (CMI, CMB, CMIB, CMEB).**

En las últimas décadas, las infecciones respiratorias producidas por MAC han aumentado significativamente, particularmente entre personas inmunocomprometidas y pacientes con enfermedades pulmonares, y se asume que este incremento se debería en parte a la capacidad de estas bacterias de formar biofilms (105,106). Se ha demostrado que las comunidades organizadas en biofilms muestran características diferentes en comparación con las formas planctónicas, como la persistencia y mayores niveles de resistencia a los antibióticos, reportándose que las concentraciones de antibióticos necesarias para erradicar los biofilms micobacterianas pueden ser mil veces mayores que las necesarias para inhibir las formas planctónicas (107). Debido al aumento de la resistencia a los antibióticos, estas infecciones respiratorias complicadas por MAC necesitan dosis más altas de antibióticos para mejorar el pronóstico del paciente, por lo que las pruebas de sensibilidad a los antibióticos utilizados más comúnmente podrían no ser útiles para aquellas infecciones crónicas por MAC en las que hay biofilms involucrados (108).

En el presente estudio se realizó una comparación del efecto de la claritromicina sobre especies del complejo *M. avium* en sus formas planctónica y sésil, usando cepas de referencia y aislados clínicos (Tabla 4). En líneas generales, los valores de CMI obtenidos son más bajos que los de CMIB, especialmente en los experimentos llevados a cabo para las especies *M. avium* y *M. chimaera*, siendo más evidente la diferencia en el caso de las cepas de referencia; sin embargo, en el caso de las cepas de *M. intracellulare*, no se observaron diferencias significativas entre los valores de CMI y CMIB (Tabla 4). Por otra parte, al comparar los valores de CMB con los de CMEB, no se observaron diferencias en el caso de las cepas de *M. avium*; pero en el caso de la cepa de referencia y la cepa 657 de *M. intracellulare*, y en todas las cepas de *M. chimaera*, las concentraciones de claritromicina necesarias para erradicar al biofilm fueron mayores que las que se requieren para causar la muerte de las especies en su forma planctónica (Tabla 4). Estos resultados están de acuerdo con el trabajo realizado por Falkinham (47) quien demostró que las células de *M. avium* cultivadas en biofilms de catéter son significativamente más resistentes a la claritromicina y la rifampicina que las células cultivadas en suspensión.

El punto de inflexión en la terapia antimicrobiana de las infecciones por *M. avium* se produjo en su momento con el desarrollo de dos nuevos macrólidos, claritromicina y azitromicina. Los ensayos clínicos controlados, los primeros realizados con cualquier agente entre pacientes con infección por *M. avium*, indicaron la alta eficacia de la claritromicina, ya sea en pacientes con SIDA que tenían una infección diseminada o en pacientes sin SIDA con enfermedad pulmonar localizada (109–111). La monoterapia con claritromicina dio como resultado la eliminación de la bacteriemia en casi todos los pacientes con infección diseminada, pero fue seguida inevitablemente por una recaída de la bacteriemia en los pacientes que sobrevivieron el tiempo suficiente para llegar a este evento. Las cepas sensibles a la claritromicina aisladas antes de la terapia contenían  $10^{-8}$  o  $10^{-9}$  mutantes resistentes, y las recaídas de bacteriemia fueron causadas casi con toda seguridad por la multiplicación de estos mutantes preexistentes (109). El CLSI ha determinado que una cepa de MAC es sensible a la claritromicina cuando su CMI es  $\leq 8,0$   $\mu\text{g/ml}$ , y se considera resistente cuando el valor de CMI es  $>32,0$   $\mu\text{g/ml}$ . Tomando como base estos valores de referencia, se considera que todas las cepas estudiadas en este trabajo son sensibles a la claritromicina en su forma planctónica, pero se convierten en resistentes cuando adoptan la forma de biofilm, en particular la cepa de referencia de *M. avium* y las cepas de referencia y 655 de *M. chimaera* (Tabla 4).

La claritromicina, al igual que el resto de los macrólidos, se une de forma reversible al dominio V del ARN ribosómico 23S, inhibiendo de esta forma la síntesis proteica al bloquear la elongación de las proteínas. La unión se realiza mediante la formación de puentes de hidrógeno entre diferentes radicales hidroxilo del macrólido y determinadas bases del ARNr, y por la unión débil entre la cladinosa y el dominio II del ARNr 23S. La afinidad varía según la molécula. Bloquean el orificio de entrada al canal por donde sale la proteína del ribosoma (112).

En el caso de *M. chimaera*, un miembro del complejo *M. avium*, que puede causar infecciones en personas después de una cirugía a corazón abierto debido a la contaminación de las unidades de tratamiento térmico en circulación extracorpórea, el diagnóstico puede resultar complicado, ya que el período de incubación puede ser bastante variable y los síntomas no son específicos. Además del tratamiento quirúrgico agresivo, la piedra angular del tratamiento es el tratamiento farmacológico combinado, que debe consistir en un

macrólido, una rifamicina, etambutol y amicacina, siendo el macrólido claritromicina o azitromicina (8,13). Se pueden utilizar múltiples agentes de segunda línea en caso de intolerancias o toxicidades. La susceptibilidad *in vitro* de estos agentes es similar a la actividad contra otras especies del complejo *M. avium* (113).

A pesar de la eficiencia demostrada de la claritromicina, de manera individual o en combinación con otros fármacos, en el tratamiento de las infecciones por miembros del complejo *M. avium*, no está claro si la terapia con dos fármacos (claritromicina y etambutol) para la enfermedad pulmonar por el complejo *M. avium* (MAC) contribuye al desarrollo de MAC resistente a macrólidos. En este sentido, Ito *et al.* (114) compararon la incidencia de MAC resistente a macrólidos entre pacientes tratados con terapia de dos medicamentos (claritromicina y etambutol) y la terapia estándar de tres medicamentos (claritromicina, etambutol y rifampicina) para la enfermedad pulmonar por MAC, por medio de la revisión retrospectiva de 147 pacientes con enfermedad pulmonar por MAC sin tratamiento previo que habían recibido terapia con dos medicamentos (n = 47) o terapia con tres medicamentos (n = 100) entre 1997 y 2016 en la Organización Hospitalaria Nacional, Hospital Tenryu, Hamamatsu, Japón. El riesgo de desarrollo de MAC resistente a macrólidos se evaluó calculando la tasa de incidencia acumulada mediante la prueba de Gray. Los autores encontraron que la mediana del período de seguimiento fue de 74,5 meses, y durante el período de seguimiento, uno de los 47 pacientes (2,1%) del grupo de dos fármacos desarrolló MAC resistente a macrólidos, en comparación con 12 de los 100 pacientes (12,0%) del grupo de tres fármacos. La tasa de incidencia acumulada de MAC resistente a macrólidos fue menor en el grupo de dos fármacos que en el grupo de tres fármacos (0,0023; intervalo de confianza del 95%, 0,002 a 0,107 versus 0,200; intervalo de confianza del 95%, 0,100 a 0,324, p=0,0593). Estos resultados sugieren que el tratamiento con dos fármacos con claritromicina y etambutol para la enfermedad pulmonar por MAC no conduce a una mayor incidencia de adquisición de resistencia a la claritromicina que el tratamiento estándar con tres fármacos.

Más recientemente, Zimenkov (115) realizó una revisión bibliográfica resumiendo los datos de los estudios sobre la determinación de la CMI de aislados clínicos del complejo *M. avium* utilizando el método de microdilución en caldo. En este trabajo se encontró una variación significativa en las distribuciones de CMI de diferentes estudios, posiblemente

debido a la reproducibilidad insuficiente de las pruebas fenotípicas y variación en los linajes de especies identificadas en diferentes laboratorios, que podrían tener diversa susceptibilidad intrínseca a los fármacos. Para la mayoría de los fármacos analizados, las CMI son demasiado altas, lo que podría socavar la eficacia del tratamiento. En el caso de la claritromicina, se analizaron en total los datos de CMI de claritromicina para 3458 cepas de *M. avium* y 1896 cepas de especies de *M. intracellulare*. Los aislados de *M. avium* se caracterizan por una amplia variedad de espectros de resistencia con una variedad de modos de distribución de 0,25 a 16 mg/L. Las distribuciones de CMI obtenidas utilizando placas SLOMYCO forman un grupo más compacto con un rango de 2 a 16 mg/L. Las discrepancias en los resultados pueden deberse a problemas con el método de medición de la CMI, la dependencia del pH del medio, o la heterogeneidad de la población de *M. avium* y de las características fenotípicas de los aislados entre diferentes regiones. Una tendencia similar fue observada en el caso del estudio de las muestras de *M. intracellulare*. En este caso, la eficacia terapéutica de los macrólidos puede atribuirse al aumento de la concentración del fármaco en los macrófagos y las lesiones pulmonares en comparación con el plasma, y a la acción sinérgica con otros fármacos (116). Por otro lado, la claritromicina no tiene acción bactericida contra las formas en reposo y la administración concomitante de rifampicina o rifabutina reduce drásticamente las concentraciones plasmáticas de claritromicina. Sobre la base de los datos de CMI, se podría concluir que los aislados del complejo MAC tienen al menos una susceptibilidad relativamente reducida a los macrólidos, lo que se debe a determinantes desconocidos (117). Esas micobacterias carecen del gen de resistencia más importante que se encuentra en un amplio espectro de microorganismos, el gen *erm*, que codifica la rRNA metiltransferasa, responsable de la resistencia inducible a los macrólidos en cepas del complejo *Mycobacterium abscessus* (118) y la resistencia de *M. tuberculosis* (119). Otros posibles mecanismos encontrados en otras especies bacterianas incluyen sustituciones en las proteínas ribosómicas L4 y L22, exportación de fármacos y permeabilidad reducida de la pared celular (115).

### **6.3. Estudio de la concentración de prevención de formación de biofilms de claritromicina.**

La capacidad de claritromicina de modificar la formación de biofilm por parte de los miembros del complejo *M. avium* ha sido observado por otros autores, como es el caso de

Carter *et al.* (120), quienes evaluaron la sensibilidad de los biofilms de cepas de *M. avium* aisladas a partir de pacientes con SIDA a claritromicina, azitromicina y moxifloxacino, encontrando que los valores de CMI para las para las bacterias del biofilm fueron los mismos que los de las bacterias planctónicas, lo que demuestra que las bacterias obtenidas del biofilm mantienen la misma sensibilidad a los antibióticos observada en las bacterias planctónicas. Además, los autores encontraron que claritromicina, pero no azitromicina y moxifloxacino, disminuyó en un 70% la capacidad de todas las cepas probadas de *M. avium* para formar biofilms ( $P < 0,01$ ); sin embargo, ninguno de los antibióticos probados tiene la capacidad de eliminar o destruir un biofilm que ya se ha formado. La observación de que claritromicina fue más efectiva que azitromicina para suprimir la formación de biofilms es bastante intrigante y podría explicar la actividad superior de claritromicina frente a los biofilms. Este efecto podría deberse a que claritromicina podría tener más actividad contra organismos en fase estacionaria que azitromicina. Sin embargo, no hay evidencia de que los macrólidos tengan actividad contra *M. avium* no replicantes. Aunque la diferencia en la sensibilidad podría explicarse por la capacidad de penetrar el biofilm, no existe evidencia actual que indique que claritromicina pueda penetrar los biofilms de *M. avium* con más eficacia que azitromicina.

#### **6.4. Estudio del efecto de claritromicina en la estructura del biofilm mediante CLSM.**

Al evaluar la formación del biofilm en presencia de claritromicina, se encontró que la viabilidad de las bacterias contenidas en el biofilm disminuía a medida que se incrementaba el tiempo de tratamiento, de manera significativa para *M. avium* 717, y de manera débil para la cepa de referencia de *M. avium*. El mismo comportamiento se encontró para las cepas de *M. intracellulare*, siendo la correlación negativa débil para la cepa 505 y fuerte para la cepa 657; y para las cepas de *M. chimaera*, siendo la correlación negativa débil en el caso de la cepa 655 (Figura 12). En este caso, no se encontró una característica o patrón común entre los diferentes aislados; mientras que en la mayoría de los aislados claritromicina presentó una mayor actividad contra los más biofilms más jóvenes con tratamiento prolongado que contra los biofilms más antiguos sometidos a un tratamiento corto con solo dos cepas, la cepa de referencia y la cepa 575, ambas de *M. chimaera*, mostraron una débil correlación positiva con el tiempo.

Los resultados imposibilitan conocer, al menos usando esta metodología, si el efecto observado se debe al tiempo de tratamiento o a la edad del biofilm, observándose que el porcentaje de viabilidad del biofilm de las cepas evaluadas no fue menos del 40%, incluso con los mayores tiempos de tratamiento con claritromicina, lo que sugiere que la edad del biofilm es un parámetro de extrema importancia en los mecanismos de resistencia de estos aislados, por lo que se hace necesario aplicar tratamientos prolongados, tal como lo indican las guías de tratamiento (8,9). Debido a que se observa un alto grado de resistencia a la claritromicina en las bacterias en biofilm, se piensa que la edad de este sería un parámetro de relevancia en la resistencia; sin embargo, si bien no puede ser considerado como el único factor determinante, ya que en el caso de *M. chimaera* este efecto no se observa en dos de sus cepas, sugiriendo que se la resistencia puede deberse a la acción sinérgica de múltiples factores.

Debido a los resultados observados en la resistencia del biofilm a la claritromicina por parte de los aislados del complejo *M. avium* en este y otros estudios, se han realizado esfuerzos para implementar tratamientos alternativos que de manera individual o conjunta con la antibioterapia contribuyan con la mejoría de los pacientes con infecciones generadas por MAC, y disminuyan el desarrollo de resistencia a los antibióticos. Normalmente, se recomienda un régimen de tres fármacos que contenga macrólidos en lugar de un régimen de dos fármacos como tratamiento estándar, y se recomienda azitromicina en lugar de claritromicina, tanto las directrices de 2007 (9) como en las de 2020 (8), con una duración del tratamiento de al menos un año después de la conversión del cultivo. Por otra parte, los estudios clínicos informan que el etambutol podría prevenir la resistencia a los macrólidos. Además, se ha estudiado el uso concomitante de aminoglucósidos, amicacina liposomal por inhalación, clofazimina, linezolid, bedaquilina y fluoroquinolona con modificación del tratamiento basado en las directrices. Sin embargo, el tratamiento a largo plazo de MAC sigue siendo un desafío debido a la interrupción de regímenes polimedicamentosos y la adquisición de resistencia a macrólidos, aunado al deficiente cumplimiento (en muchas ocasiones) de la terapia basada en las directrices para el tratamiento de MAC en todo el mundo, lo que daría lugar a la aparición de resistencia a los macrólidos (114).

Recientemente, Lin *et al.* (121) estudiaron el efecto inhibitorio *in vitro* de 17 agentes antimicrobianos contra 111 aislados clínicos de MAC, identificados como *M. intracellulare*, *M. avium*, *M. marseillense*, *M. colombiense*, *M. yongonense*, y dos aislados que no pudieron ser identificados a nivel de especie. Las especies MAC mostraron una resistencia relativamente baja a la claritromicina, amicacina, bedaquilina, rifabutina, estreptomina, y clofazimina (0-21,6%); mientras que las tasas de resistencia a isoniazida, rifampicina, linezolid, doxiciclina, y etionamida fueron muy altas (72,1-100%). Adicionalmente, *M. avium* presentó una mayor tasa de resistencia que *M. intracellulare* para el etambutol (92,3% vs 40,7%,  $P < 0,001$ ), amicacina (15,4% vs 1,2%,  $P = 0,049$ ), y cicloserina (69,2% vs 25,9%,  $P = 0,004$ ). Estos resultados apoyarían el uso de macrólidos, rifabutina y aminoglucósidos como régimen para la infección por MAC, y también demuestran las bajas tasas de resistencia a nuevas drogas como clofazimina, tedizolid, y bedaquilina, sugiriendo la posible implementación de estas drogas en el tratamiento de MAC.



## **7. CONCLUSIONES.**



1. La formación de los biofilms por parte de los miembros del complejo MAC depende de la cepa en estudio, sin que se observen diferencias evidentes entre las especies *M. avium*, *M. intracellulare* y *M. chimaera*.
2. Existen diferencias en los parámetros evaluados en cada una de las especies analizadas, sin que se logren establecer patrones específicos de especie o de relevancia clínica.
3. Los valores de CMI para *M. avium*, *M. intracellulare* y *M. chimaera* para la forma planctónica son inferiores a los valores de CMIB, indicando el incremento de la resistencia a los antibióticos en su forma sésil.
4. Los valores de CMEB de *M. intracellulare* y *M. chimaera* son superiores a los de la CMB, indicando un incremento de la resistencia a la claritromicina, siendo necesarias dosis superiores para conseguir la muerte de las bacterias del biofilm.
5. No se observan patrones específicos de los valores de CPB que indiquen una tendencia inter o intraespecie; en general, los valores CPB son superiores a los de CMI, demostrando que la claritromicina inhibe el crecimiento de bacterias planctónicas, pero es menos eficiente en la prevención de la formación del biofilm, o en la eliminación del mismo cuando ya se ha instaurado y formado por completo.
6. Se observó una correlación negativa entre la viabilidad de las bacterias contenidas en el biofilm tras ser tratadas con claritromicina en función del tiempo de tratamiento, dependiendo de la cepa, sin que sea posible establecer un patrón dependiente de la especie.
7. No es posible esclarecer si el efecto de la claritromicina en la formación del biofilm puede ser atribuido a la edad del biofilm o a la duración del tratamiento, aunque la edad del biofilm parece ser un factor fundamental para la resistencia a la claritromicina.



# REFERENCIAS



1. Wolinsky E. Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. *Am Rev Respir Dis.* enero de 1979;119(1):107-59.
2. Karl Bernhard Lehmann RON. Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik ... [Internet]. Lehmann; 1896 [citado 5 de marzo de 2024]. 208 p. Disponible en: <http://archive.org/details/atlasundgrundri00neumgoog>
3. Dorronsoro I, Torroba L. [Microbiology of tuberculosis]. *An Sist Sanit Navar.* 2007;30 Suppl 2:67-85.
4. Esteban J, Munoz-Egea MC. *Mycobacterium bovis* and Other Uncommon Members of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *Microbiol Spectr.* diciembre de 2016;4(6).
5. Tortoli E. Microbiological features and clinical relevance of new species of the genus *Mycobacterium*. *Clin Microbiol Rev.* octubre de 2014;27(4):727-52.
6. Lopez-Roa P, Aznar E, Cacho J, Cogollos-Agruna R, Domingo D, Garcia-Arata MI, et al. Epidemiology of Non-Tuberculous Mycobacteria isolated from clinical specimens in Madrid, Spain, from 2013 to 2017. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* junio de 2020;39(6):1089-94.
7. Sood G, Parrish N. Outbreaks of nontuberculous mycobacteria. *Curr Opin Infect Dis.* agosto de 2017;30(4):404-9.
8. Daley CL, Iaccarino JM, Lange C, Cambau E, Wallace RJ, Andrejak C, et al. Treatment of Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease: An Official ATS/ERS/ESCMID/IDSA Clinical Practice Guideline. *Clin Infect Dis.* 14 de agosto de 2020;71(4):905-13.
9. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 de febrero de 2007;175(4):367-416.
10. Daley CL. *Mycobacterium avium* Complex Disease. *Microbiol Spectr.* abril de 2017;5(2).
11. Tortoli E, Rindi L, Garcia MJ, Chiaradonna P, Dei R, Garzelli C, et al. Proposal to elevate the genetic variant MAC-A, included in the *Mycobacterium avium* complex, to species rank as *Mycobacterium chimaera* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* julio de 2004;54(Pt 4):1277-85.
12. Sax H, Bloemberg G, Hasse B, Sommerstein R, Kohler P, Achermann Y, et al. Prolonged Outbreak of *Mycobacterium chimaera* Infection After Open-Chest Heart Surgery. *Clin Infect Dis.* 1 de julio de 2015;61(1):67-75.

13. Griffith DE. Treatment of Mycobacterium avium Complex (MAC). *Semin Respir Crit Care Med.* junio de 2018;39(3):351-61.
14. Hoefsloot W, van Ingen J, Andrejak C, Angeby K, Bauriaud R, Bemer P, et al. The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: an NTM-NET collaborative study. *Eur Respir J.* diciembre de 2013;42(6):1604-13.
15. Wengenack NL, Brown-Elliott BA, Parrish NM, Salfinger M, Turenne CY, Wallace RJ, et al. This is giving me a complex: a practical attempt to streamline nontuberculous mycobacteria nomenclature for clinical purposes. *J Clin Microbiol.* 23 de febrero de 2024;e0153123.
16. Marras TK, Chedore P, Ying AM, Jamieson F. Isolation prevalence of pulmonary nontuberculous mycobacteria in Ontario, 1997-2003. *Thorax.* agosto de 2007;62(8):661-6.
17. Cassidy PM, Hedberg K, Saulson A, McNelly E, Winthrop KL. Nontuberculous mycobacterial disease prevalence and risk factors: a changing epidemiology. *Clin Infect Dis.* 15 de diciembre de 2009;49(12):e124-129.
18. Winthrop KL, McNelly E, Kendall B, Marshall-Olson A, Morris C, Cassidy M, et al. Pulmonary nontuberculous mycobacterial disease prevalence and clinical features: an emerging public health disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 de octubre de 2010;182(7):977-82.
19. Adjemian J, Olivier KN, Seitz AE, Holland SM, Prevots DR. Prevalence of nontuberculous mycobacterial lung disease in U.S. Medicare beneficiaries. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 de abril de 2012;185(8):881-6.
20. Strollo SE, Adjemian J, Adjemian MK, Prevots DR. The Burden of Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Disease in the United States. *Ann Am Thorac Soc.* octubre de 2015;12(10):1458-64.
21. Brode SK, Daley CL, Marras TK. The epidemiologic relationship between tuberculosis and non-tuberculous mycobacterial disease: a systematic review. *Int J Tuberc Lung Dis.* noviembre de 2014;18(11):1370-7.
22. Adjemian J, Daniel-Wayman S, Ricotta E, Prevots DR. Epidemiology of Nontuberculous Mycobacteriosis. *Semin Respir Crit Care Med.* junio de 2018;39(3):325-35.
23. Kaczmarkowska A, Didkowska A, Kwiecień E, Stefańska I, Rzewuska M, Anusz K. The Mycobacterium avium complex - an underestimated threat to humans and animals. *Ann Agric Environ Med.* 21 de marzo de 2022;29(1):22-7.
24. Falkinham JO. Ecology of Nontuberculous Mycobacteria. *Microorganisms.* 30 de octubre de 2021;9(11):2262.

25. Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, Bartlett JG, Campbell GD, Dean NC, et al. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clin Infect Dis.* 1 de marzo de 2007;44 Suppl 2(Suppl 2):S27-72.
26. Camarena Miñana JJ, Pellicer RG. [Atypical mycobacteria and pulmonary involvement in infectious diseases]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* diciembre de 2011;29 Suppl 5:66-75.
27. Brown-Elliott BA, Wallace Jr. RJ. Mycobacterium: Clinical and Laboratory Characteristics of Rapidly Growing Mycobacteria. En: *Manual of Clinical Microbiology* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2015 [citado 5 de marzo de 2024]. p. 595-612. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1128/9781555817381.ch32>
28. Martin I, Pfyffer GE, Parrish N, Carroll KC, Pfaller MA, Landry ML, et al. Mycobacterium: General Characteristics, Laboratory Detection, and Staining Procedures. En: *Manual of Clinical Microbiology*. 12.<sup>a</sup> ed. Washington, D.C.: ASM Press; 2019. p. 558-75.
29. Caulfield AJ, Richter E, Brown-Elliott BA, Wallace Jr. RJ, Wengenack NL. Mycobacterium: Laboratory Characteristics of Slowly Growing Mycobacteria Other than Mycobacterium tuberculosis. En: Carroll KC, Pfaller MA, Landry ML, Patel R, McAdam AJ, Richter SS, editores. *Manual of Clinical Microbiology*. 12.<sup>a</sup> ed. Washington, D.C.: ASM Press; 2019. p. 595-611.
30. Broncano-Lavado A, Barrado L, Lopez-Roa P, Cacho J, Domingo D, Hernandez S, et al. Clinical Evaluation of Nontuberculous Mycobacteria (NTM) Elite Agar, a New Medium for the Isolation of NTM: a Multicenter Study. *J Clin Microbiol.* 20 de abril de 2023;61(4):e0003623.
31. Alcaide F, Amlerová J, Bou G, Ceysens PJ, Coll P, Corcoran D, et al. How to: identify non-tuberculous Mycobacterium species using MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* junio de 2018;24(6):599-603.
32. Lee G, Lee KS, Moon JW, Koh WJ, Jeong BH, Jeong YJ, et al. Nodular bronchiectatic Mycobacterium avium complex pulmonary disease. Natural course on serial computed tomographic scans. *Ann Am Thorac Soc.* agosto de 2013;10(4):299-306.
33. Varghese G, Shepherd R, Watt P, Bruce JH. Fatal infection with Mycobacterium fortuitum associated with oesophageal achalasia. *Thorax.* febrero de 1988;43(2):151-2.
34. Mitchell JD, Bishop A, Cafaro A, Weyant MJ, Pomerantz M. Anatomic lung resection for nontuberculous mycobacterial disease. *Ann Thorac Surg.* junio de 2008;85(6):1887-92; discussion 1892-1893.
35. Yu JA, Weyant MJ, Mitchell JD. Surgical treatment of atypical mycobacterial infections. *Thorac Surg Clin.* agosto de 2012;22(3):277-85.

36. CLSI. Clinical & Laboratory Standards Institute. 2020 [citado 5 de marzo de 2024]. M24Ed3 - Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardia spp., and Other Aerobic Actinomycetes, 3rd Edition. Disponible en: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m24/>
37. CLSI. Clinical & Laboratory Standards Institute. 2023 [citado 5 de marzo de 2024]. M24SEd2E - Performance Standards for Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardia spp., and Other Aerobic Actinomycetes, 2nd Edition. Disponible en: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m24s/>
38. Thomson RM, Yew WW. When and how to treat pulmonary non-tuberculous mycobacterial diseases. *Respirology*. enero de 2009;14(1):12-26.
39. Rodrigues C, Jani J, Shenai S, Thakkar P, Siddiqi S, Mehta A. Drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis against second-line drugs using the Bactec MGIT 960 System. *Int J Tuberc Lung Dis*. diciembre de 2008;12(12):1449-55.
40. Alcaide F, Esteban J, Gonzalez-Martin J, Palacios JJ. Methods for determining the antimicrobial susceptibility of mycobacteria. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. octubre de 2017;35(8):529-35.
41. Walsh C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*. 17 de agosto de 2000;406(6797):775-81.
42. Brown-Elliott BA, Nash KA, Wallace RJ. Antimicrobial susceptibility testing, drug resistance mechanisms, and therapy of infections with nontuberculous mycobacteria. *Clin Microbiol Rev*. julio de 2012;25(3):545-82.
43. van Ingen J, Boeree MJ, van Soolingen D, Mouton JW. Resistance mechanisms and drug susceptibility testing of nontuberculous mycobacteria. *Drug Resist Updat*. junio de 2012;15(3):149-61.
44. Koh WJ, Jeong BH, Jeon K, Lee SY, Shin SJ. Therapeutic drug monitoring in the treatment of Mycobacterium avium complex lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 de octubre de 2012;186(8):797-802.
45. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*. 1995;49:711-45.
46. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*. febrero de 2004;2(2):95-108.
47. Falkinham JO. Growth in catheter biofilms and antibiotic resistance of Mycobacterium avium. *J Med Microbiol*. febrero de 2007;56(Pt 2):250-4.
48. Abisado RG, Benomar S, Klaus JR, Dandekar AA, Chandler JR. Bacterial Quorum Sensing and Microbial Community Interactions. *mBio*. 22 de mayo de 2018;9(3):e02331-17.

49. Li YH, Tian X. Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. *Sensors (Basel)*. 2012;12(3):2519-38.
50. Mukherjee S, Bassler BL. Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. *Nat Rev Microbiol*. junio de 2019;17(6):371-82.
51. Azimi S, Klementiev AD, Whiteley M, Diggle SP. Bacterial Quorum Sensing During Infection. *Annu Rev Microbiol*. 8 de septiembre de 2020;74:201-19.
52. Høiby N, Ciofu O, Johansen HK, Song Z jun, Moser C, Jensen PØ, et al. The clinical impact of bacterial biofilms. *Int J Oral Sci*. abril de 2011;3(2):55-65.
53. Nazar C J. Biofilms bacterianos. *Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello*. abril de 2007;67(1):161-72.
54. Bjarnsholt T, Alhede M, Alhede M, Eickhardt-Sørensen SR, Moser C, Kühl M, et al. The in vivo biofilm. *Trends Microbiol*. septiembre de 2013;21(9):466-74.
55. Veerachamy S, Yarlagadda T, Manivasagam G, Yarlagadda PK. Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: a review. *Proc Inst Mech Eng H*. octubre de 2014;228(10):1083-99.
56. Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, Jalil F, Imran M, Nawaz MA, et al. Bacterial biofilm and associated infections. *J Chin Med Assoc*. enero de 2018;81(1):7-11.
57. Wei Q, Ma LZ. Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Sci*. 18 de octubre de 2013;14(10):20983-1005.
58. Karygianni L, Ren Z, Koo H, Thurnheer T. Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. *Trends Microbiol*. agosto de 2020;28(8):668-81.
59. Mitchell KF, Zarnowski R, Sanchez H, Edward JA, Reinicke EL, Nett JE, et al. Community participation in biofilm matrix assembly and function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 31 de marzo de 2015;112(13):4092-7.
60. Tolker-Nielsen T. Biofilm Development. *Microbiol Spectr*. abril de 2015;3(2):MB-0001-2014.
61. Heindl JE, Wang Y, Heckel BC, Mohari B, Feirer N, Fuqua C. Mechanisms and regulation of surface interactions and biofilm formation in *Agrobacterium*. *Front Plant Sci*. 2014;5:176.
62. Sadekuzzaman M, Yang S, Mizan M f. r., Ha S d. Current and Recent Advanced Strategies for Combating Biofilms. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2015;14(4):491-509.

63. Kostakioti M, Hadjifrangiskou M, Hultgren SJ. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 1 de abril de 2013;3(4):a010306.
64. Belas R. Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria. *Trends Microbiol*. septiembre de 2014;22(9):517-27.
65. Karatan E, Watnick P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev*. junio de 2009;73(2):310-47.
66. Jakobsen TH, Tolker-Nielsen T, Givskov M. Bacterial Biofilm Control by Perturbation of Bacterial Signaling Processes. *Int J Mol Sci*. 13 de septiembre de 2017;18(9):1970.
67. Henke JM, Bassler BL. Bacterial social engagements. *Trends Cell Biol*. noviembre de 2004;14(11):648-56.
68. Novick RP. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol*. junio de 2003;48(6):1429-49.
69. Winzer K, Hardie KR, Burgess N, Doherty N, Kirke D, Holden MTG, et al. LuxS: its role in central metabolism and the in vitro synthesis of 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone. *Microbiology (Reading)*. abril de 2002;148(Pt 4):909-22.
70. Xavier KB, Bassler BL. LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Curr Opin Microbiol*. abril de 2003;6(2):191-7.
71. Lee MS, Morrison DA. Identification of a new regulator in *Streptococcus pneumoniae* linking quorum sensing to competence for genetic transformation. *J Bacteriol*. agosto de 1999;181(16):5004-16.
72. Merritt J, Qi F, Goodman SD, Anderson MH, Shi W. Mutation of luxS affects biofilm formation in *Streptococcus mutans*. *Infect Immun*. abril de 2003;71(4):1972-9.
73. Shepherd NE, Harrison RS, Fairlie DP. Targeting quorum sensing and competence stimulation for antimicrobial chemotherapy. *Curr Drug Targets*. octubre de 2012;13(11):1348-59.
74. Rabin N, Zheng Y, Opoku-Temeng C, Du Y, Bonsu E, Sintim HO. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Med Chem*. 2015;7(4):493-512.
75. Carter G, Wu M, Drummond DC, Bermudez LE. Characterization of biofilm formation by clinical isolates of *Mycobacterium avium*. *J Med Microbiol*. septiembre de 2003;52(Pt 9):747-52.
76. Ojha AK, Jacobs WR, Hatfull GF. Genetic dissection of mycobacterial biofilms. *Methods Mol Biol*. 2015;1285:215-26.

77. Vess RW, Anderson RL, Carr JH, Bond WW, Favero MS. The colonization of solid PVC surfaces and the acquisition of resistance to germicides by water micro-organisms. *J Appl Bacteriol.* febrero de 1993;74(2):215-21.
78. Ridgway HF, Rigby MG, Argo DG. Adhesion of a *Mycobacterium* sp. to cellulose diacetate membranes used in reverse osmosis. *Appl Environ Microbiol.* enero de 1984;47(1):61-7.
79. Zamora N, Esteban J, Kinnari TJ, Celdran A, Granizo JJ, Zafra C. In-vitro evaluation of the adhesion to polypropylene sutures of non-pigmented, rapidly growing mycobacteria. *Clin Microbiol Infect.* septiembre de 2007;13(9):902-7.
80. Esteban J, Martin-de-Hijas NZ, Kinnari TJ, Ayala G, Fernandez-Roblas R, Gadea I. Biofilm development by potentially pathogenic non-pigmented rapidly growing mycobacteria. *BMC Microbiol.* 17 de octubre de 2008;8:184.
81. Recht J, Kolter R. Glycopeptidolipid acetylation affects sliding motility and biofilm formation in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol.* octubre de 2001;183(19):5718-24.
82. Ojha AK, Baughn AD, Sambandan D, Hsu T, Trivelli X, Guerardel Y, et al. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. *Mol Microbiol.* julio de 2008;69(1):164-74.
83. Ojha A, Anand M, Bhatt A, Kremer L, Jacobs WR, Hatfull GF. GroEL1: a dedicated chaperone involved in mycolic acid biosynthesis during biofilm formation in mycobacteria. *Cell.* 2 de diciembre de 2005;123(5):861-73.
84. Muñoz-Egea MC, Garcia-Pedrazuela M, Mahillo I, Garcia MJ, Esteban J. Autofluorescence as a tool for structural analysis of biofilms formed by nonpigmented rapidly growing mycobacteria. *Appl Environ Microbiol.* febrero de 2013;79(3):1065-7.
85. Joshi P, Singh M, Bhargava A, Singh M, Mehrotra R. Autofluorescence--an important ancillary technique for the detection of *Mycobacterium tuberculosis*: revisited. *Diagn Cytopathol.* abril de 2013;41(4):330-4.
86. Williams MM, Yakrus MA, Arduino MJ, Cooksey RC, Crane CB, Banerjee SN, et al. Structural analysis of biofilm formation by rapidly and slowly growing nontuberculous mycobacteria. *Appl Environ Microbiol.* abril de 2009;75(7):2091-8.
87. Walker J, Moore G, Collins S, Parks S, Garvey MI, Lamagni T, et al. Microbiological problems and biofilms associated with *Mycobacterium chimaera* in heater-cooler units used for cardiopulmonary bypass. *J Hosp Infect.* julio de 2017;96(3):209-20.
88. Kohler P, Kuster SP, Bloemberg G, Schulthess B, Frank M, Tanner FC, et al. Healthcare-associated prosthetic heart valve, aortic vascular graft, and disseminated *Mycobacterium chimaera* infections subsequent to open heart surgery. *Eur Heart J.* 21 de octubre de 2015;36(40):2745-53.

89. Benwill JL, Wallace RJ. Mycobacterium abscessus: challenges in diagnosis and treatment. *Curr Opin Infect Dis*. diciembre de 2014;27(6):506-10.
90. Høiby N, Bjarnsholt T, Moser C, Jensen PØ, Kolpen M, Qvist T, et al. Diagnosis of biofilm infections in cystic fibrosis patients. *APMIS*. abril de 2017;125(4):339-43.
91. Fennelly KP, Ojano-Dirain C, Yang Q, Liu L, Lu L, Progulske-Fox A, et al. Biofilm Formation by Mycobacterium abscessus in a Lung Cavity. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 de marzo de 2016;193(6):692-3.
92. Qvist T, Eickhardt S, Kragh KN, Andersen CB, Iversen M, Høiby N, et al. Chronic pulmonary disease with Mycobacterium abscessus complex is a biofilm infection. *Eur Respir J*. diciembre de 2015;46(6):1823-6.
93. Muñoz-Egea MC, Akir A, Esteban J. Mycobacterium biofilms. *Biofilm*. diciembre de 2023;5:100107.
94. Esteban J, García-Coca M. Mycobacterium Biofilms. *Front Microbiol*. 2017;8:2651.
95. Muñoz-Egea MC, García-Pedrazuela M, Mahillo I, García MJ, Esteban J. Autofluorescence as a tool for structural analysis of biofilms formed by nonpigmented rapidly growing mycobacteria. *Appl Environ Microbiol*. febrero de 2013;79(3):1065-7.
96. Muñoz-Egea MC, García-Pedrazuela M, Mahillo I, Esteban J. Effect of ciprofloxacin in the ultrastructure and development of biofilms formed by rapidly growing mycobacteria. *BMC Microbiol*. 4 de febrero de 2015;15:18.
97. Hernandez C, Coppede JDS, Bertoni BW, França SDC, Pereira AMS. Flash microbiocide: A Rapid and Economic Method for Determination of MBC and MFC. *AJPS*. 2013;04(04):850-2.
98. Fernández-Olmos A, García-Castillo M, Maiz L, Lamas A, Baquero F, Cantón R. In vitro prevention of Pseudomonas aeruginosa early biofilm formation with antibiotics used in cystic fibrosis patients. *Int J Antimicrob Agents*. agosto de 2012;40(2):173-6.
99. Fish DN, Gotfried MH, Danziger LH, Rodvold KA. Penetration of clarithromycin into lung tissues from patients undergoing lung resection. *Antimicrob Agents Chemother*. abril de 1994;38(4):876-8.
100. Meier E, Pennington K, Gallo de Moraes A, Escalante P. Characteristics of Mycobacterium avium complex (MAC) pulmonary disease in previously treated lung cancer patients. *Respir Med Case Rep*. 2017;22:70-3.
101. Falkinham JO. Mycobacterium avium complex: Adherence as a way of life. *AIMS Microbiol*. 2018;4(3):428-38.
102. Pradal I, Esteban J, Mediero A, Garcia-Coca M, Aguilera-Correa JJ. Contact Effect of a Methylobacterium sp. Extract on Biofilm of a Mycobacterium chimaera Strain

- Isolated from a 3T Heater-Cooler System. *Antibiotics* (Basel). 3 de agosto de 2020;9(8).
103. Portell-Buj E, López-Gavín A, González-Martín J, Tudó G. In Vitro Biofilm Formation in *Mycobacterium avium-intracellulare* Complex. *Arch Bronconeumol* (Engl Ed). febrero de 2021;57(2):140-1.
  104. Johansen TB, Agdestein A, Olsen I, Nilsen SF, Holstad G, Djønne B. Biofilm formation by *Mycobacterium avium* isolates originating from humans, swine and birds. *BMC Microbiol*. 6 de agosto de 2009;9:159.
  105. Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol*. 11 de agosto de 2016;14(9):563-75.
  106. Nishiuchi Y, Iwamoto T, Maruyama F. Infection Sources of a Common Nontuberculous Mycobacterial Pathogen, *Mycobacterium avium* Complex. *Front Med* (Lausanne). 2017;4:27.
  107. Aung TT, Yam JKH, Lin S, Salleh SM, Givskov M, Liu S, et al. Biofilms of Pathogenic Nontuberculous Mycobacteria Targeted by New Therapeutic Approaches. *Antimicrob Agents Chemother*. enero de 2016;60(1):24-35.
  108. Kumar V, Sachan TK, Sharma P, Rawat KD. Ultrastructural morphologic changes in mycobacterial biofilm in different extreme condition. *Ultrastruct Pathol*. febrero de 2015;39(1):38-48.
  109. Burman WJ, Reves RR, Rietmeijer CA, Cohn DL. A retrospective comparison of clarithromycin versus rifampin in combination treatment for disseminated *Mycobacterium avium* complex disease in AIDS: clarithromycin decreases transfusion requirements. *Int J Tuberc Lung Dis*. abril de 1997;1(2):163-9.
  110. Esteban J, Ortiz-Perez A. Current treatment of atypical mycobacteriosis. *Expert Opin Pharmacother*. diciembre de 2009;10(17):2787-99.
  111. Esteban J, Garcia-Pedrazuela M, Munoz-Egea MC, Alcaide F. Current treatment of nontuberculous mycobacteriosis: an update. *Expert Opin Pharmacother*. mayo de 2012;13(7):967-86.
  112. Lenz KD, Klosterman KE, Mukundan H, Kubicek-Sutherland JZ. Macrolides: From Toxins to Therapeutics. *Toxins* (Basel). 12 de mayo de 2021;13(5):347.
  113. Mason M, Gregory E, Foster K, Klatt M, Zoubek S, Eid AJ. Pharmacologic Management of *Mycobacterium chimaera* Infections: A Primer for Clinicians. *Open Forum Infect Dis*. julio de 2022;9(7):ofac287.

114. Ito M, Koga Y, Hachisu Y, Murata K, Sunaga N, Maeno T, et al. Treatment strategies with alternative treatment options for patients with Mycobacterium avium complex pulmonary disease. *Respir Investig.* septiembre de 2022;60(5):613-24.
115. Zimenkov D. Variability of Mycobacterium avium Complex Isolates Drug Susceptibility Testing by Broth Microdilution. *Antibiotics (Basel).* 4 de diciembre de 2022;11(12):1756.
116. Bakker-Woudenberg IAJM, van Vianen W, van Soolingen D, Verbrugh HA, van Agtmael MA. Antimycobacterial agents differ with respect to their bacteriostatic versus bactericidal activities in relation to time of exposure, mycobacterial growth phase, and their use in combination. *Antimicrob Agents Chemother.* junio de 2005;49(6):2387-98.
117. Wallace RJ, Brown BA, Griffith DE, Girard W, Tanaka K. Reduced serum levels of clarithromycin in patients treated with multidrug regimens including rifampin or rifabutin for Mycobacterium avium-M. intracellulare infection. *J Infect Dis.* marzo de 1995;171(3):747-50.
118. Maurer FP, Rügger V, Ritter C, Bloemberg GV, Böttger EC. Acquisition of clarithromycin resistance mutations in the 23S rRNA gene of Mycobacterium abscessus in the presence of inducible erm(41). *J Antimicrob Chemother.* noviembre de 2012;67(11):2606-11.
119. Buriánková K, Doucet-Populaire F, Dorson O, Gondran A, Ghnassia JC, Weiser J, et al. Molecular basis of intrinsic macrolide resistance in the Mycobacterium tuberculosis complex. *Antimicrob Agents Chemother.* enero de 2004;48(1):143-50.
120. Carter G, Young LS, Bermudez LE. A subinhibitory concentration of clarithromycin inhibits Mycobacterium avium biofilm formation. *Antimicrob Agents Chemother.* diciembre de 2004;48(12):4907-10.
121. Lin S, Hua W, Wang S, Zhang Y, Chen X, Liu H, et al. In vitro assessment of 17 antimicrobial agents against clinical Mycobacterium avium complex isolates. *BMC Microbiol.* 8 de julio de 2022;22(1):175.

**ANEXOS: PUBLICACIONES  
RELACIONADAS CON LA  
PRESENTE TESIS DOCTORAL**

## Article

# Biofilm Development by *Mycobacterium avium* Complex Clinical Isolates: Effect of Clarithromycin in Ultrastructure

Arij Akir<sup>1</sup>, Abrar Senhaji-Kacha<sup>1,2</sup>, Maria Carmen Muñoz-Egea<sup>1,2</sup>, Jaime Esteban<sup>1,2,\*</sup>  
and John Jairo Aguilera-Correa<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Clinical Microbiology, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma de Madrid, 28040 Madrid, Spain; arij\_akir@yahoo.co.uk (A.A.); abrarsen7@gmail.com (A.S.-K.); mcme86@gmail.com (M.C.M.-E.); john\_j2a@hotmail.com (J.J.A.-C.)

<sup>2</sup> CIBERINFEC-CIBER de Enfermedades Infecciosas, 28029 Madrid, Spain

\* Correspondence: jestebanmoreno@gmail.com or jesteban@fdj.es

**Abstract:** Background: The *Mycobacterium avium* complex includes the commonest non-tuberculous mycobacteria associated with human infections. These infections have been associated with the production of biofilms in many cases, but there are only a few studies about biofilms produced by the species included in this group. Methods: Three collection strains (*M. avium* ATCC25291, *M. intracellulare* ATCC13950, and *M. chimaera* DSM756), three clinically significant strains (647, 657, and 655), and three clinically non-significant ones (717, 505, and 575) of each species were included. The clinical significance of the clinical isolates was established according to the internationally accepted criteria. The biofilm ultrastructure was studied by Confocal-Laser Scanning Microscopy by using BacLight Live–Dead and Nile Red stains. The viability, covered surface, height, and relative autofluorescence were measured in several images/strain. The effect of clarithromycin was studied by using the technique described by Muñoz-Egea et al. with modifications regarding incubation time. The study included clarithromycin in the culture medium at a concentration achievable in the lungs (11.3 mg/L), using one row of wells as the control without antibiotics. The bacterial viability inside the biofilm is expressed as a percentage of viable cells. The differences between the different parameters of the biofilm ultrastructure were analyzed by using the Kruskal–Wallis test. The correlation between bacterial viability in the biofilm and treatment time was evaluated by using Spearman’s rank correlation coefficient ( $\rho$ ). Results: The strains showed differences between them with all the studied parameters, but neither a species-specific pattern nor a clinical-significance-specific pattern were detected. For the effect of clarithromycin, the viability of the bacteria contained in the biofilm was inversely proportional to the exposure time of the biofilm ( $\rho > -0.3$ ;  $p$ -value  $< 0.05$ ), excluding two *M. chimaera* strains (*M. chimaera* DSM756 and 575), which showed a weak positive correlation with treatment time ( $0.2 < \rho < 0.39$ ;  $p$ -value  $< 0.05$ ). Curiously, despite a clarithromycin treatment of 216 h, the percentage of the biofilm viability of the strains evaluated here was not less than 40% at best (*M. avium* 717). Conclusions: All the *M. avium* complex strains studied can form biofilm in vitro, but the ultrastructural characteristics between them suggest that these are strain-specific characteristics unrelated to the species or the clinical significance. The clarithromycin effect on MAC species is biofilm-age/time-of-treatment-dependent and appears to be strain-specific while being independent of the clinical significance of the strain.



**Citation:** Akir, A.; Senhaji-Kacha, A.; Muñoz-Egea, M.C.; Esteban, J.; Aguilera-Correa, J.J. Biofilm Development by *Mycobacterium avium* Complex Clinical Isolates: Effect of Clarithromycin in Ultrastructure. *Antibiotics* **2024**, *13*, 263. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13030263>

Academic Editor: Marc Maresca

Received: 23 February 2024

Revised: 12 March 2024

Accepted: 14 March 2024

Published: 16 March 2024



**Copyright:** © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Keywords:** Biofilm; *Mycobacterium avium* complex; *Mycobacterium avium*; *Mycobacterium intracellulare*; *Mycobacterium chimaera*; clarithromycin; macrolides

## 1. Introduction

Non-tuberculous mycobacteria (NTM) include many species of the genus *Mycobacterium* that have been known since the first years after the discovery of *M. tuberculosis* [1]. Among these organisms, the *M. avium* complex (MAC) includes several species of NTM [2],

especially three: *M. avium*, *M. intracellulare*, and *M. chimaera*, which are considered the commonest NTM isolated throughout the world [3]. In a multicenter and multinational study by Hoefsloot et al., MAC was the commonest NTM isolated in almost all countries [3].

MAC species are also important because they are a cause of human infection, especially respiratory infections among patients with underlying diseases at the present moment [2,4]. It can also cause epidemic outbreaks, like those caused by *M. chimaera* related to the heating-cooling machines used in cardiac surgery [5,6]. These infections are currently considered biofilm-related infections, and this fact is of clinical importance because of the higher resistance against antibiotics of sessile bacteria compared with planktonic ones. However, despite these facts, there are only a few in vitro studies regarding biofilm formation by MAC [7–12], and most of them used only collection strains. Here we report a study about biofilm formation by the three most important species of MAC and the effect of clarithromycin, an antibiotic commonly used in these infections, on them, using not only collection strains but also clinical isolates of all of them.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Strains

During this study, the following strains were used: *M. avium* ATCC 25291 (type strain), *M. intracellulare* ATCC 13950 (type strain), and *M. chimaera* DSM 756 (type strain). Clinical strains of all these species were also included: *M. avium* (717 and 647), *M. intracellulare* (505 and 657), and *M. chimaera* (575 and 655). The clinical significance of the clinical isolates was established according to the ATS-ERS-IDSA-ESCMID criteria [4]. All the strains were kept frozen at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Before the experiments were performed, all the strains were defrosted, inoculated onto Middlebrook 7H10 agar plates, incubated at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 15 days, and checked for purity.

### 2.2. Biofilm Development

The studies of biofilm growth were performed by using a modification of the technique described by Muñoz-Egea et al. [13,14]. We used  $2 \times 4$  well plates with an uncoated hydrophobic surface (Ibidi GmbH, Martinsried, Germany) with a prolongation of the times for the study of biofilm development to 48, 120, 192, and 264 h. Four wells were stained with a Nile Red© stain (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), and the other four wells were stained with a Live/Dead BacLight© stain (Invitrogen, Waltham, MA, USA) according to the instructions provided by the manufacturers. Leica DM IRB microscopy (Leica, Wetzlar, Germany) was used for Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM). Each time we evaluated 4 parameters: the % of the covered surface, thickness, viability, and presence of autofluorescence. The last parameter was analyzed according to the following formulation:  $(\% \text{ autofluorescence of covered surface} / \% \text{ Nile Red covered surface}) \times 100$ . All the experiments were performed in triplicate.

### 2.3. Effect of Clarithromycin on Biofilm Ultrastructure

The same study described above was performed by including clarithromycin in the culture medium at a concentration of 11.3 mg/L at different time points, using one row of wells as the control without antibiotics. This concentration is the concentration of clarithromycin reached in the lungs when a patient is receiving this treatment [15]. After the treatment, each well was stained with a Live/Dead BacLight© stain. All the strains were tested in triplicate.

### 2.4. Clarithromycin Susceptibility of Planktonic and Sessile Bacteria

We studied the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) by using the recommended broth microdilution method [16] with one modification: In brief, two-fold dilutions of clarithromycin concentrations ranging from 0.5 to 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$  were added to cation-adjusted Müller–Hinton broth (Sigma Aldrich, St. Louis, MI, USA) (CAMHB) supplemented with oleic, albumin, dextrose, and catalase (OADC) to a final volume of 100  $\mu\text{L}$  per well. A

1-MacFarland suspension of bacteria was performed in CAMHB, and 100 microliters of this suspension was added to a Costar 96-well round-bottom polypropylene plate (Corning Inc., Corning, NY, USA) followed by static incubation at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> for at least 10 days. After incubation, MIC was determined by the naked eye as the well with the lowest concentration of clarithromycin where no bacterial growth was observed. We determined the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) by using the flash microbiocide method [17]. Briefly, 20 µL of each well from the MIC 96-well plate were mixed after 24 h incubation with 180 µL of CAMHB supplemented with OADC in a new 96-well plate. This plate was then incubated statically at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> for 10 days. After incubation, the MBC was determined by the naked eye as the well with the lowest concentration of clarithromycin where no bacterial growth was observed. The experiments were performed in triplicates.

The Minimal Biofilm Inhibitory Concentrations (MBICs) and minimal biofilm eradication concentrations were determined. For the study of the MBIC, biofilms were developed on untreated 96-well flat-bottom plates (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A bacterial suspension of 1 McFarland in sterile tap water of each strain was performed, and 150 µL of the suspension was inoculated in each well for 3 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> for the adherence of the bacterial cells. After incubation, each well was washed with 150 µL of sterile tap water, and 150 µL of Middlebrook 7H9 supplemented with OADC were inoculated in each well. The plate was then statically incubated at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> for 7 days. After biofilm growth, each well was washed with 150 µL of sterile phosphate buffer saline and filled with 200 µL of CAMHB supplemented with OADC containing concentrations of clarithromycin, ranging from 0.5 to 512 µg/mL. The plate was statically incubated at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> for another 10 days. After incubation, the MBIC was determined by the naked eye as the well with the lowest concentration of clarithromycin where no bacterial planktonic growth was observed. All the experiments were performed in triplicates.

### 2.5. Statistical Analysis

Stata Statistical Software Release 11.0 (StataCorp 2009) was used for statistical studies. The Shapiro–Wilk test was used to evaluate the normality of the data. The descriptive data are cited as the median and interquartile range if a non-normal distribution was calculated. A non-parametric Wilcoxon test was used to compare the differences between the different parameters evaluated in the biofilm structural study of two groups, while a non-parametric Kruskal–Wallis test was used to compare more than two groups. The correlation between the bacterial viability in the biofilm and the treatment time was evaluated by using Spearman’s rank correlation coefficient ( $\rho$ ). For absolute values of  $\rho$ , 0–0.19 is considered as very weak, 0.2–0.39 as weak, 0.40–0.59 as moderate, 0.6–0.79 as strong, and 0.8–1 as a very strong correlation.

## 3. Results

### 3.1. Strains

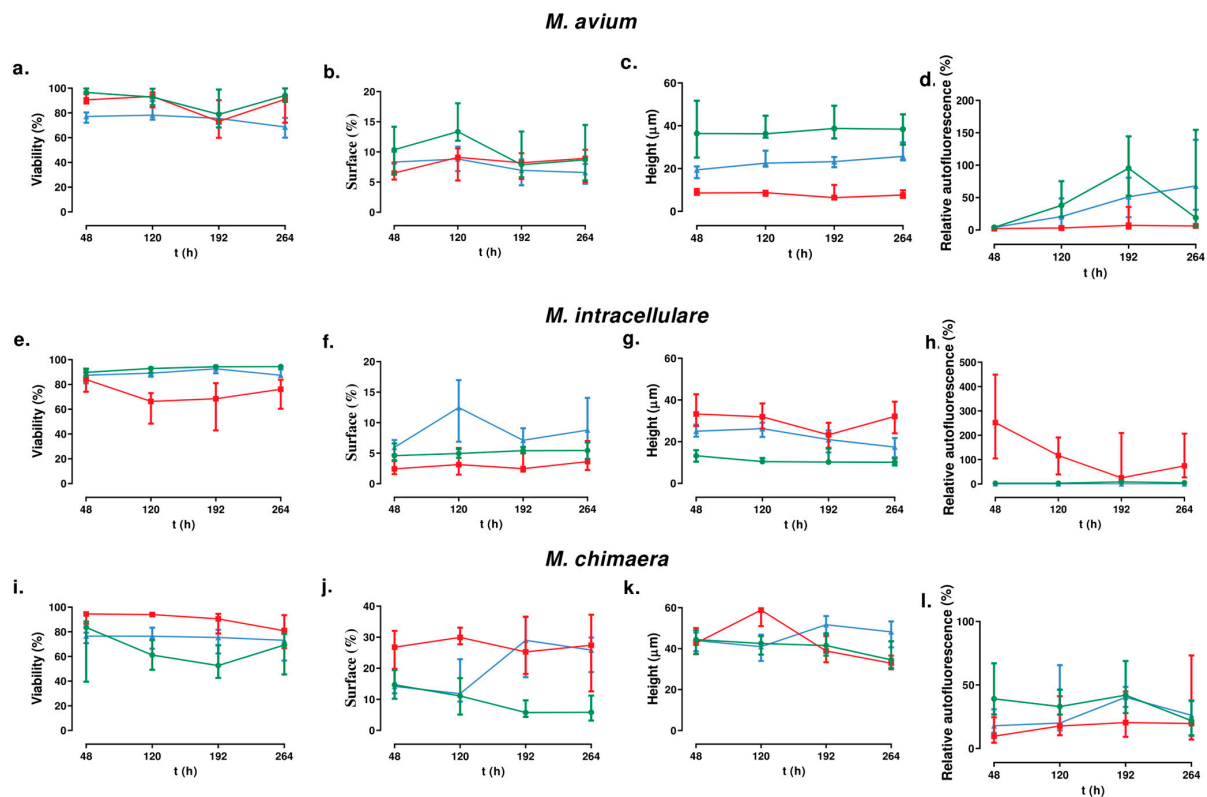
The clinical significance of the clinical isolates was established according to the ATSE-ERS-IDS-ESCMID criteria, whereby the strains *M. avium* 647, *M. intracellulare* 657, and *M. chimaera* 655 were considered clinically significant. The clinical strains *M. avium* 717, *M. intracellulare* 505, and *M. chimaera* 575 were found to be non-clinically significant.

### 3.2. Biofilm Forming Studies

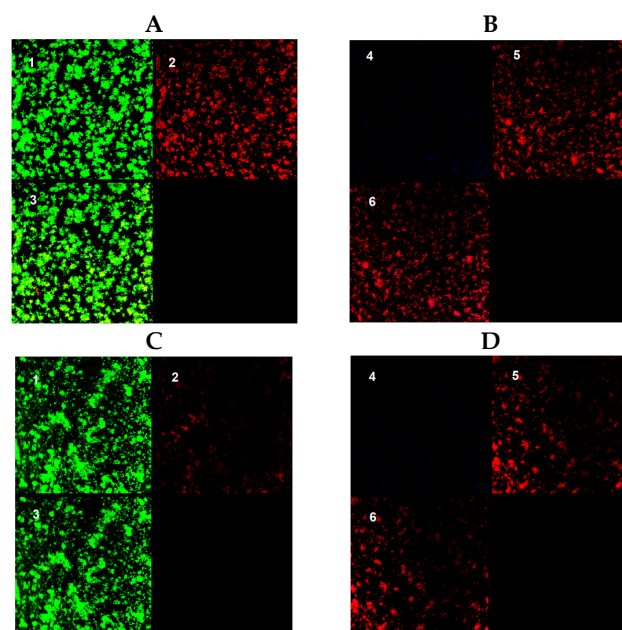
The results obtained are represented in Figure 1. Examples of the images are shown in Figure 2.

The time evaluation of the viability for the *M. avium* strains showed that no differences can be detected for the reference strain ( $p$ -value = 0.1212), but there are differences for the clinical strains ( $p$ -values = 0.0052 and 0.0018 for strains 647 and 717, respectively). For *M. intracellulare*, the variation was observed for the reference strain ( $p$ -value < 0.0001) and strain 657 ( $p$ -value = 0.0248) but not for strain 505. For *M. chimaera*, the variation showed

similar characteristics as *M. intracellulare* ( $p$ -values = 0.0227 for the reference strain and 0.0003 for strain 655, but no significance for strain 575).



**Figure 1.** Biofilm study for viability (a,e,i), surface (b,f,j), height (c,g,k), and relative autofluorescence (d,h,l). Green, blue, and red represent reference strains, non-clinically significant strains, and clinically significant strains of each strain, respectively. The error bars represent the interquartile range.



**Figure 2.** Images obtained for a 48 h biofilm of *M. avium* (A,B) and *M. intracellulare* (C,D). (A,C): BacLight© Live–Dead stain. (B,D): Autofluorescence and Nile Red stain. 1: Live bacteria; 2: dead bacteria; 3: merged Live–Dead bacteria; 4: autofluorescence; 5: Nile Red stained bacteria; 6: merged autofluorescence–Nile Red stained bacteria.

For the covered surface, we observed differences for the *M. avium* reference strain ( $p$ -value = 0.0202) and strain 717 ( $p$ -value = 0.0001), for *M. intracellulare* strains 657 ( $p$ -value = 0.0234) and 505 ( $p$ -value = 0.0042), and for the *M. chimaera* reference strain ( $p$ -value < 0.0001) and strain 575 ( $p$ -value = 0.0426).

Differences in the height evolution with time were observed for the *M. avium* clinical strain ( $p$ -value = 0.0913 and <0.0001 for an increase in height for strains 647 and 717, respectively), for a height decrease in the *M. intracellulare* reference strain and strain 505 ( $p$  < 0.0001 for both of them), and an increase in *M. chimaera* strain 575 ( $p$ -value = 0.0001) but a decrease in the *M. chimaera* reference strain ( $p$ -value = 0.0019) and strain 655 ( $p$ -value < 0.0001). No differences in height were detected for the other strains.

Differences in autofluorescence evolution were also detected for all the strains of *M. avium* ( $p$ -values = 0.0004 for the reference strain and <0.0001 for both clinical strains), for the *M. intracellulare* reference strain (increase,  $p$ -value = 0.0101) and strain 655 (decrease,  $p$ -value = 0.0002), and for the *M. chimaera* reference strain (decrease,  $p$ -value = 0.0426) and strain 655 (increase,  $p$ -value = 0.0007).

We also analyzed the intraspecies variations, with the following results:

### 3.2.1. For *M. avium*

At 48 h: The viability of the three strains was significantly different ( $p$ -value = 0.001 for the Kruskal–Wallis test). In descending order: the reference strains, strain 647, and strain 717. Each strain was statistically different from the others ( $p$ -value < 0.05 for the Wilcoxon test). The surface area covered by the reference and 717 strains was similar ( $p$ -value = 0.1345 for the Wilcoxon test). The surface area covered by strain 647 was significantly less than the reference and 717 strains ( $p$ -value < 0.05 for the Wilcoxon test). The autofluorescence of the three strains was significantly different ( $p$ -value = 0.0003 for the Kruskal–Wallis test). In descending order: strain 647, the reference strain, and strain 717. There were no significant differences between the reference and CON strains ( $p$ -value = 0.7092 for the Wilcoxon test). The biofilm height of the three strains was significantly different ( $p$ -value = 0.0001 for the Kruskal–Wallis test). In descending order: the reference strain, strain 647, and strain 717.

At 120 h: The viability of the three strains was significantly different ( $p$ -value = 0.0001 for the Kruskal–Wallis test). The viability of strain 717 was significantly lower than the rest of the strains ( $p$ -value < 0.001). There were no significant differences between the reference strain and strain 647 ( $p$ -value = 0.3472). The surface area covered by the reference and 707 strains was similar ( $p$ -value = 0.0001 for the Wilcoxon test). The surface area covered by the reference strain was significantly greater than that of the clinical strains ( $p$ -value < 0.00001 for the Wilcoxon test). There were no significant differences between strain 717 and strain 647 ( $p$ -value = 0.4688). The autofluorescence of the three strains was significantly different ( $p$ -value = 0.0001 for the Kruskal–Wallis test). In descending order, the highest was the reference strain, followed by strain 717 and strain 647. The biofilm height of the three strains was significantly different ( $p$ -value = 0.0001 for the Kruskal–Wallis test). In descending order, it was highest for the reference strain, followed by strain 717 and strain 647.

At 192 h: The viability of the three strains was similar ( $p$ -value = 0.1995 for the Kruskal–Wallis test), as well as the covered surface area of the three strains ( $p$ -value = 0.2198 for the Kruskal–Wallis test). The autofluorescence of the three strains was significantly different ( $p$ -value = 0.0001 for the Kruskal–Wallis test). In descending order, the highest value was detected for the reference strain, followed by strain 717 and strain 647, with each strain being statistically different from the others ( $p$ -value < 0.05 for the Wilcoxon test). The biofilm height of the three strains was significantly different ( $p$ -value = 0.0001 for the Kruskal–Wallis test). In descending order, it was highest for the reference strain, followed by strain 717 and strain 647. Again, the value obtained for each strain was statistically different from the others ( $p$ -value < 0.05 for the Wilcoxon test).

At 264 h: The viability of the three strains was significantly different ( $p$ -value = 0.0001 for the Kruskal–Wallis test). In descending order: the reference strain, strain 647, and strain

717. Each strain was statistically different from the others ( $p$ -value  $< 0.05$  for the Wilcoxon test). The surface area covered by the reference and 717 strains was similar ( $p$ -value = 0.0152 for the Wilcoxon test). The surface area covered by strain 717 was significantly greater than the 647 and the reference strains. ( $p$ -value  $< 0.05$  for the Wilcoxon test). There were no significant differences between the reference strain and strain 647 ( $p$ -value = 0.5642). The biofilm height of the three strains was significantly different ( $p$ -value = 0.0001 for the Kruskal–Wallis test). In descending order: the reference strain, strain 717, and strain 647. The autofluorescence of the three strains was significantly different ( $p$ -value = 0.0001 for the Kruskal–Wallis test). In descending order: strain 717, the reference strain, and strain 647. Each strain was statistically different from the others ( $p$ -value  $< 0.05$  for the Wilcoxon test).

### 3.2.2. For *M. intracellulare*

At 48 h: The viability of the three strains was significantly different ( $p$ -value = 0.0004 for the Kruskal–Wallis test). In descending order: the reference strain, strain 505, and strain 657. The viability of strain 657 was significantly lower than the rest of the strains ( $p$ -value  $< 0.05$ ). There were no significant differences between the reference strain and strain 505 ( $p$ -value = 0.1242). The covered surface of the strains was significantly different ( $p$ -value = 0.0001 for the Kruskal–Wallis test). In descending order: strain 505, the reference strain, and strain 657. Each strain was statistically different from the others ( $p$ -value  $< 0.05$  for the Wilcoxon test). The autofluorescence of the three strains was significantly different ( $p$ -value = 0.0001 for the Kruskal–Wallis test). In descending order: strain 657, the reference strain, and strain 505. Each strain was statistically different from the others ( $p$ -value  $< 0.0001$  for the Wilcoxon test). The biofilm height of the three strains was significantly different ( $p$ -value = 0.0001 for the Kruskal–Wallis test). In descending order: strain 657, the reference strain, and strain 505. Each strain was statistically different from the others ( $p$ -value  $< 0.001$  for the Wilcoxon test).

At 120 h: The viability of the three strains was significantly different ( $p$ -value = 0.0001 for the Kruskal–Wallis test). In descending order: the reference strain, strain 505, and strain 657. The viability of the 657 strain was significantly higher than the reference strains and 505 ( $p$ -value  $< 0.0001$  for the Wilcoxon test). There were no significant differences between strain 505 and the reference strain ( $p$ -value = 0.0863). The surface area covered by the reference and 505 strains was similar ( $p$ -value = 0.0001 for the Wilcoxon test). In descending order: strain 505, the reference strain, and strain 657. Each strain was statistically different from the others ( $p$ -value  $< 0.01$  for the Wilcoxon test). The autofluorescence of the three strains was significantly different ( $p$ -value = 0.0001 for the Kruskal–Wallis test). In descending order: strain 657, strain 505, and the reference strain. Each strain was statistically different from the others ( $p$ -value  $< 0.01$  for the Wilcoxon test). The biofilm height of the three strains was significantly different ( $p$ -value = 0.0001 for the Kruskal–Wallis test). In descending order: strain 657, the reference strain, and strain 505. Each strain was statistically different from the others ( $p$ -value  $< 0.01$  for the Wilcoxon test).

At 192 h: The viability of the three strains was statistically different ( $p$ -value = 0.0001 for the Kruskal–Wallis test). In descending order: the reference strain, strain 505, and strain 657. The viability of strain 657 was significantly lower than the other two strains ( $p$ -value  $< 0.0001$  for the Wilcoxon test). There were no significant differences between strain 505 and the reference strain ( $p$ -value = 0.1354). The surface area covered by the three strains was significantly different ( $p$ -value = 0.0001 for the Kruskal–Wallis test). In descending order: strain 505, the reference strain, and strain 657. Each strain was statistically different from the others ( $p$ -value  $< 0.001$  for the Wilcoxon test). The autofluorescence of the three strains was significantly different ( $p$ -value = 0.0001 for the Kruskal–Wallis test). In descending order: strain 657, the reference strain, and strain 505. Each strain was statistically different from the others ( $p$ -value  $< 0.001$  for the Wilcoxon test). The biofilm height of the three strains was significantly different ( $p$ -value = 0.0001 for the Kruskal–Wallis test). In descending order: strain 657, strain 505, and the reference strain. The biofilm height of the reference strain was significantly lower than the other two strains ( $p$ -value  $< 0.0001$  for the Wilcoxon test). There were no significant differences between strain 657 and strain 505 ( $p$ -value = 0.11896).

At 264 h: The viability of the three strains was significantly different ( $p$ -value = 0.0001 for the Kruskal–Wallis test). In descending order: the reference strain, strain 505, and strain 657. Each strain was statistically different from the others ( $p$ -value < 0.001 for the Wilcoxon test). The covered surface was significantly different ( $p$ -value = 0.0001 for the Kruskal–Wallis test). In descending order: strain 505, the reference strain, and strain 657. Each strain was statistically different from the others ( $p$ -value < 0.001 for the Wilcoxon test). The autofluorescence of the three strains was significantly different ( $p$ -value = 0.0001 for the Kruskal–Wallis test). In descending order: strain 657, the reference strain, and strain 505. Each strain was statistically different from the others ( $p$ -value < 0.001 for the Wilcoxon test). The biofilm height of the three strains was significantly different ( $p$ -value = 0.0001 for the Kruskal–Wallis test). In descending order: strain 657, strain 505, and the reference strain. Each strain was statistically different from the others ( $p$ -value < 0.001 for the Wilcoxon test).

### 3.2.3. For *M. chimaera*

At 48 h: The viability of the three strains was significantly different ( $p$ -value = 0.0001 for the Kruskal–Wallis test). In descending order: strain 655, the reference strain, and strain 575. The viability of strain 655 was significantly higher than the rest of the strains ( $p$ -value < 0.0001). There were no significant differences between the reference strain and strain 575 ( $p$ -value = 0.2254). The covered surface of the strains was significantly different ( $p$ -value = 0.0001 for the Kruskal–Wallis test). The surface area covered by strain 655 was significantly greater than the reference strains and 575 ( $p$ -value < 0.05 for the Wilcoxon test). There were no significant differences between the reference strain and strain 575 ( $p$ -value = 0.6256). The autofluorescence of the three strains was significantly different ( $p$ -value = 0.0001 for the Kruskal–Wallis test). In descending order: the reference strains, strain 575, and strain 655. Each strain was statistically different from the others ( $p$ -value < 0.01 for the Wilcoxon test). The biofilm height of the three strains was not significantly different ( $p$ -value = 0.963 for the Kruskal–Wallis test).

At 120 h: The viability of the three strains was significantly different ( $p$ -value = 0.0001 for the Kruskal–Wallis test). In descending order: strain 575, the reference strain, and strain 655. Each strain was statistically different from the others ( $p$ -value < 0.001 for the Wilcoxon test). The surface area covered by the reference and 575 strains was similar ( $p$ -value = 0.0001 for the Wilcoxon test). The surface area covered by strain 655 was significantly greater than the reference strain and 575 ( $p$ -value < 0.0001 for the Wilcoxon test). There were no significant differences between strain 575 and the reference strain ( $p$ -value = 0.1184). The autofluorescence of the three strains was significantly different ( $p$ -value = 0.0001 for the Kruskal–Wallis test). In descending order: the reference strains, strain 575, and strain 655. The autofluorescence of the reference strain was significantly higher than that of strain 655 ( $p$ -value = 0.0232 for the Wilcoxon test). There were no significant differences between strain 575 and strain 655 or between strain 575 and the reference strain ( $p$ -value > 0.15). The biofilm height of the three strains was significantly different ( $p$ -value = 0.0001 for the Kruskal–Wallis test). The biofilm height of strain 655 was significantly higher than the other two strains ( $p$ -value < 0.0001 for the Wilcoxon test). There were no significant differences between strain 575 and the reference strain ( $p$ -value = 0.6492).

At 192 h: The viability of the three strains was statistically different ( $p$ -value = 0.0001 for the Kruskal–Wallis test). In descending order: strain 655, strain 575, and the reference strain. Each strain was statistically different from the others ( $p$ -value < 0.0001 for the Wilcoxon test). The surface area covered by the three strains was significantly different ( $p$ -value = 0.0001 for the Kruskal–Wallis test). The surface covered by biofilm of the reference strain was significantly lower than the other two strains ( $p$ -value < 0.0001 for the Wilcoxon test). There were no significant differences between strain 575 and strain 655 ( $p$ -value = 0.9411). The autofluorescence of the three strains was significantly different ( $p$ -value = 0.0475 for the Kruskal–Wallis test). The autofluorescence of the reference strain was significantly higher than that of strain 655 ( $p$ -value = 0.0232 for the Wilcoxon test). There were no significant differences between strain 575 and strain 655 or between strain 575 and the reference strain ( $p$ -value > 0.15). The biofilm height of the three strains was

significantly different ( $p$ -value = 0.0001 for the Kruskal–Wallis test). The biofilm height of strain 655 was significantly lower than the other two strains ( $p$ -value < 0.001 for the Wilcoxon test). There were no significant differences between strain 655 and the reference strain ( $p$ -value = 0.1958).

At 264 h: The viability of the three strains was significantly different ( $p$ -value = 0.0031 for the Kruskal–Wallis test). In descending order: strain 655, strain 575, and the reference strain. The viability of strain 655 was significantly higher than the other two strains studied ( $p$ -value < 0.05 for the Wilcoxon test). There were no significant differences between strain 575 and the reference strain ( $p$ -value = 0.2544). The surface area covered by the reference and 575 strains was similar ( $p$ -value = 0.0001 for the Wilcoxon test). The surface area covered by the reference strain was significantly smaller than the other two strains studied ( $p$ -value < 0.0001 for the Wilcoxon test). There were no significant differences between strain 575 and strain 655 ( $p$ -value = 0.9411). The autofluorescence of the three strains was not significantly different ( $p$ -value = 0.5166 for the Kruskal–Wallis test). The biofilm height of the three strains was significantly different ( $p$ -value = 0.0001 for the Kruskal–Wallis test). The height of strain 575 was significantly greater than the other two strains studied ( $p$ -value < 0.0001 for the Wilcoxon test). There were no significant differences between strain 575 and strain 655 ( $p$ -value = 0.1858).

### 3.3. Antimicrobial Susceptibility of Planktonic and Sessile Bacteria

The results of susceptibility testing of all strains appear in Table 1.

**Table 1.** Susceptibility testing data for planktonic and sessile bacteria.

Strain	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )	MBC ( $\mu\text{g/mL}$ )	MBIC ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>M. avium</i> CECT 670	4	<256	16
<i>M. avium</i> 717	8	8	8
<i>M. avium</i> 647	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$
<i>M. intracellulare</i> 669	$\leq 1$	32	$\leq 1$
<i>M. intracellulare</i> 505	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$
<i>M. intracellulare</i> 657	$\leq 1$	32	$\leq 1$
<i>M. chimaera</i> DSM 756	$\leq 1$	32	16
<i>M. chimaera</i> 575	$\leq 1$	8	$\leq 1$
<i>M. chimaera</i> 655	8	16	$\leq 1$

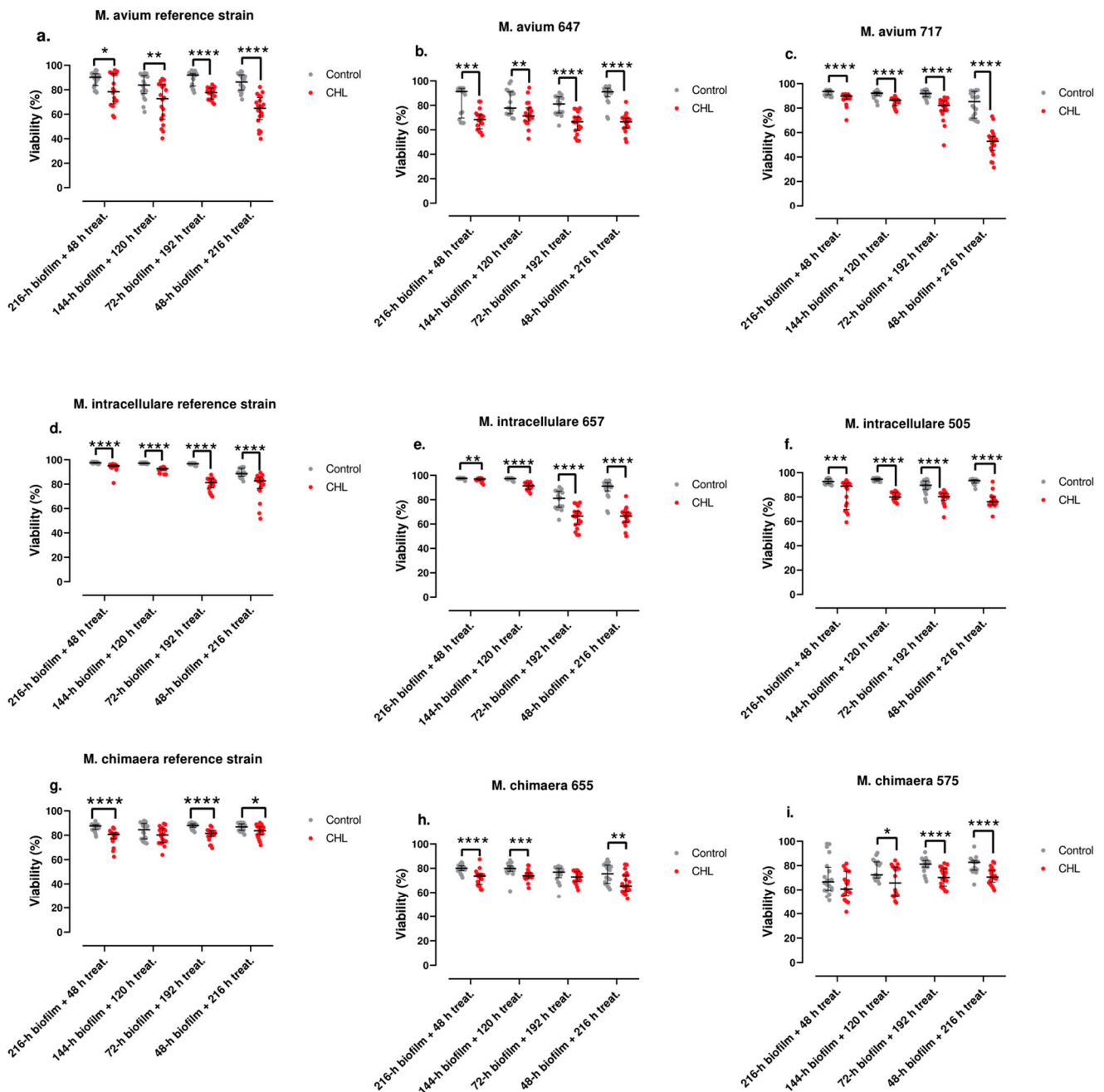
MIC: Minimal Inhibitory Concentration; MBC: Minimal Bactericidal Concentration; MBIC: Minimal Biofilm Inhibitory Concentration.

### 3.4. Effect of Clarithromycin in Biofilm Ultrastructure

The results of this study are shown in Figure 3.

The viability of the bacteria contained in the biofilm of *M. avium* strain 717 showed a strong negative correlation with treatment time ( $\rho = -0.8211$ ;  $p$ -value < 0.0001). The viability of the bacteria contained in the biofilm of the *M. avium* reference strain showed a weak negative correlation with treatment time ( $\rho = -0.3239$ ;  $p$ -value = 0.0033). The viability of the bacteria contained in the biofilm of *M. avium* strain 647 did not show a clear correlation with treatment time ( $p$ -value = 0.0714). The viability of the bacteria contained in the biofilm of the *M. intracellulare* reference strain showed a very strong positive correlation with treatment time ( $\rho = -0.8090$ ;  $p$ -value < 0.0001). The viability of the bacteria contained in the biofilm of *M. intracellulare* strain 505 showed a weak negative correlation with treatment time ( $\rho = -0.3045$ ;  $p$ -value = 0.0060). The viability of the bacteria contained in the biofilm of *M. intracellulare* strain 657 showed a very strong negative correlation with treatment time ( $\rho = -0.9281$ ;  $p$ -value < 0.0001). The viability of the bacteria contained in the biofilm of the *M. chimaera* reference strain showed a weak positive correlation with treatment time ( $\rho = 0.2783$ ;  $p$ -value = 0.0124). The viability of the bacteria contained in the

biofilm of *M. chimaera* strain 575 showed a weak positive correlation with treatment time ( $\rho = 0.2871$ ;  $p$ -value = 0.0103). The viability of the bacteria contained in the biofilm of *M. chimaera* strain 655 showed a weak negative correlation with treatment time ( $\rho = -0.2271$ ;  $p$ -value = 0.0428).



**Figure 3.** Biofilm viability treated with clarithromycin for *M. avium* (a–c), *M. intracellulare* (d–f), and *M. chimaera* (g–i) clinical strains. The bars represent the interquartile range. \*:  $p$ -value < 0.05, \*\*:  $p$ -value < 0.01, \*\*\*:  $p$ -value < 0.001, and \*\*\*\*:  $p$ -value < 0.0001 for Wilcoxon test.

#### 4. Discussion

The *M. avium* complex is a group of non-tuberculous mycobacteria that includes mainly three species (*M. avium*, *M. intracellulare*, and *M. chimaera*) that have been described as human pathogens [18,19], especially in the respiratory tract in patients with underlying

diseases, as well as disseminated diseases in immunosuppressed patients, especially AIDs patients [20].

The infections caused by these organisms are difficult to diagnose because in some cases they can appear as colonizations or contaminations from environmental sources. For this purpose, several guidelines have been published that include specific criteria for the diagnosis of *M. avium* complex infections. Many of these infections (especially lung ones) have been considered as biofilm-related ones. The ability to develop biofilms by these mycobacteria was proved several years ago, and this property is now considered an essential pathogenic factor for these infections [11,21–23]. Moreover, because sessile bacteria appear to be more resistant to antibiotics than planktonic ones, therapy for these patients must be influenced by this finding [24], and prolonged treatment with a combination of different antimicrobials is mandatory. However, despite these recommendations, in some cases treatment failures appear, and these failures could be related to the existence of biofilms in the patient [20]. Previous studies have shown that the *M. avium* complex can form biofilm in vitro [9,10], and some techniques have been tested, aiming at minimizing the colonization and subsequent development of biofilms in biomedical surfaces [25]. However, most of these studies have been performed with collection strains. In this study, we tested clinical strains not only of different species but of different clinical relevance, so our results are of special interest because of the potential differences that can appear.

The main aim of this study was to characterize biofilm formation by using Nile Red® stains and Live/Dead BacLight® stains with a previously described protocol to analyze several parameters (the % of the covered surface, thickness, viability, and presence of autofluorescence) with and without antibiotics to determine their relative importance in treatment resistance and looking to see if there are species-specific patterns. In our study, we found many differences in the different parameters between the different species. However, the obtained values do have neither a species-specific nor a clinical significance-specific pattern, a similar result than appear in other studies with other characteristics [26]. Other studies relating to biofilm formation for *M. avium* and *M. intracellulare* clinical strains found *M. avium* to produce stronger biofilm than *M. intracellulare* [7], but we have not detected this difference when all the strains of the same species were analyzed together. Although more studies are needed to understand MAC biofilm formation to determine more specific treatments for patients with MAC-related infections, we can conclude that biofilm formation is strain-dependent, as no clear differences between species can be detected.

Experiments were also carried out on the nine clinical isolates treated with clarithromycin by using the Live/Dead BacLight® stain to differentiate the live and dead cells from the biofilm and also determine the MIC, MBC, and MBIC of these strains. In these experiments, again we do not find any common pattern among the different isolates, while most isolates showed higher activity against younger biofilms + prolonged treatment than against older ones + short treatment, with only two strains (both of them *M. chimaera*, DSM756 and strain 575) showing only a weak positive correlation with time. In this study, it is difficult to know with this methodology if the effect is due to the treatment time or the age of the biofilm, but the percentage of the biofilm viability of the strains evaluated was not less than 40% at best, even with the highest time of the clarithromycin treatment, which suggests that biofilm is an extremely important parameter in the resistance of these organisms and the need for prolonged treatments, as recommended in the guidelines [4]. The high degree of resistance against clarithromycin in the static studies suggests that the age of the biofilm could be the parameter of the highest importance in the results. However, the finding of almost a lack of effect in two of the *M. chimaera* strains at different times suggests that other parameters probably influence the effect of the antibiotic in the biofilms, and the differences between this species and the other ones from the complex need further studies with more clinical strains. *Mycobacterium avium* complex strains, when appearing as biofilms attached to other surfaces, show more resistance against clarithromycin than in conventional studies using planktonic cells against clarithromycin and also rifampin [27].

This increased resistance has also been demonstrated in other species of mycobacteria by using a similar methodology [13] and could be one explanation for the problems in the treatment of the infections caused by these organisms.

In conclusion, the biofilm-forming ability in *M. avium* complexes appears to be a strain-specific property that does not depend on the species or any other characteristic. The effect of antibiotic therapy with clarithromycin is also strain-specific, and the treatment of older biofilms seems to have less effect than that of the treatment of younger biofilms.

**Author Contributions:** Conceptualization, J.E. and J.J.A.-C.; methodology, A.A., J.E., M.C.M.-E. and J.J.A.-C.; software, A.S.-K. and J.J.A.-C.; validation, J.E., M.C.M.-E. and J.J.A.-C.; formal analysis, J.J.A.-C., J.E. and A.A.; investigation, A.A. and A.S.-K.; resources, J.E. and A.A.; data curation, A.A. and J.J.A.-C.; writing—original draft preparation, A.A., A.S.-K. and J.E.; writing—review and editing, A.A., A.S.-K., J.J.A.-C. and J.E.; visualization, A.A., A.S.-K. and J.E.; supervision, J.E. and J.J.A.-C.; project administration, J.E.; funding acquisition, J.E. and A.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** The present study was funded by a grant by Instituto de Salud Carlos III through the project PI18/01068 (co-funded by the European Regional Development Fund. ERDF, a way to build Europe) and by a grant from the Libyan Government. A.A. was also funded by a grant from the Libyan Government, and A.S.K. was also funded by a grant from the CIBERINFEC (CB21/13/00043).

**Data Availability Statement:** Data are contained within the article.

**Acknowledgments:** We wish to acknowledge María del Mar González García-Parreño and Juana Serrano-López from IIS- Fundación Jimenez Diaz for their help with the use of the Confocal Laser Scanning microscope.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## References

1. Wolinsky, E. Nontuberculous Mycobacteria and Associated Diseases. *Am. Rev. Respir. Dis.* **1979**, *119*, 107–159. [[PubMed](#)]
2. Daley, C.L. *Mycobacterium avium* Complex Disease. *Microbiol. Spectr.* **2017**, *5*, 663–701. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Hoefsloot, W.; van Ingen, J.; Andrejak, C.; Angeby, K.; Bauriaud, R.; Bemer, P.; Beylis, N.; Boeree, M.J.; Cacho, J.; Chihota, V.; et al. The Geographic Diversity of Nontuberculous Mycobacteria Isolated from Pulmonary Samples: An NTM-NET Collaborative Study. *Eur. Respir. J.* **2013**, *42*, 1604–1613. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Daley, C.L.; Iaccarino, J.M.; Lange, C.; Cambau, E.; Wallace, R.J.; Andrejak, C.; Böttger, E.C.; Brozek, J.; Griffith, D.E.; Guglielmetti, L.; et al. Treatment of Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease: An Official ATS/ERS/ESCMID/IDSA Clinical Practice Guideline. *Clin. Infect. Dis.* **2020**, *71*, e1–e36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Kasperbauer, S.H.; Daley, C.L. *Mycobacterium chimaera* Infections Related to the Heater-Cooler Unit Outbreak: A Guide to Diagnosis and Management. *Clin. Infect. Dis.* **2019**, *68*, 1244–1250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Marra, A.R.; Diekema, D.J.; Edmond, M.B. *Mycobacterium chimaera* Infections Associated with Contaminated Heater-Cooler Devices for Cardiac Surgery: Outbreak Management. *Clin. Infect. Dis.* **2017**, *65*, 669–674. [[CrossRef](#)]
7. Portell-Buj, E.; López-Gavín, A.; González-Martín, J.; Tudó, G. In Vitro Biofilm Formation in *Mycobacterium avium-intracellulare* Complex. *Arch. Bronconeumol.* **2021**, *57*, 140–141. [[CrossRef](#)]
8. Portell-Buj, E.; González-Criollo, C.; López-Gavín, A.; Fernández-Pittol, M.; Busquets, M.A.; Estelrich, J.; Garrigó, M.; Rubio, M.; Tudó, G.; Gonzalez-Martin, J. Activity of Antibiotics and Potential Antibiofilm Agents against Biofilm-Producing *Mycobacterium avium-intracellulare* Complex Causing Chronic Pulmonary Infections. *Antibiotics* **2022**, *11*, 589. [[CrossRef](#)]
9. Carter, G.; Wu, M.; Drummond, D.C.; Bermudez, L.E. Characterization of Biofilm Formation by Clinical Isolates of *Mycobacterium avium*. *J. Med. Microbiol.* **2003**, *52*, 747–752. [[CrossRef](#)]
10. Carter, G.; Young, L.S.; Bermudez, L.E. A Subinhibitory Concentration of Clarithromycin Inhibits *Mycobacterium avium* Biofilm Formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 4907–4910. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Keefe, B.F.; Leestemaker-Palmer, A.; Bermudez, L.E. *Mycobacterium avium* subsp. *jominissuis* (MAH) Microaggregate Induction of Host Innate Immunity Is Linked to Biofilm Formation. *Microb. Pathog.* **2021**, *157*, 104977. [[CrossRef](#)]
12. Yamazaki, Y.; Danelishvili, L.; Wu, M.; Hidaka, E.; Katsuyama, T.; Stang, B.; Petrofsky, M.; Bildfell, R.; Bermudez, L.E. The Ability to Form Biofilm Influences *Mycobacterium avium* Invasion and Translocation of Bronchial Epithelial Cells. *Cell Microbiol.* **2006**, *8*, 806–814. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Muñoz-Egea, M.-C.; García-Pedrazuela, M.; Mahillo, I.; Esteban, J. Effect of Ciprofloxacin in the Ultrastructure and Development of Biofilms Formed by Rapidly Growing Mycobacteria. *BMC Microbiol.* **2015**, *15*, 18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Muñoz-Egea, M.-C.; Garcia-Pedrazuela, M.; Mahillo, I.; Garcia, M.J.; Esteban, J. Autofluorescence as a Tool for Structural Analysis of Biofilms Formed by Nonpigmented Rapidly Growing Mycobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *79*, 1065–1067. [[CrossRef](#)]

15. Fish, D.N.; Gotfried, M.H.; Danziger, L.H.; Rodvold, K.A. Penetration of Clarithromycin into Lung Tissues from Patients Undergoing Lung Resection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, *38*, 876–878. [[CrossRef](#)]
16. Woods, G.L.; Brown-Elliott, B.A.; Conville, P.S.; Desmond, E.P.; Hall, G.S.; Lin, G.; Pfyffer, G.E.; Ridderhof, J.C.; Siddiqi, S.H.; Wallace, R.J.; et al. *Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes*, 2nd ed.; CLSI Standards: Guidelines for Health Care Excellence; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2011; ISBN 978-1-56238-746-4.
17. Hernandez, C.; Coppede, J.d.S.; Bertoni, B.W.; França, S.d.C.; Pereira, A.M.S. *Flash Microbiocide*: A Rapid and Economic Method for Determination of MBC and MFC. *Am. J. Plant Sci.* **2013**, *4*, 850. [[CrossRef](#)]
18. Tortoli, E. Microbiological Features and Clinical Relevance of New Species of the Genus *Mycobacterium*. *Clin. Microbiol. Rev.* **2014**, *27*, 727–752. [[CrossRef](#)]
19. Tortoli, E.; Rindi, L.; Garcia, M.J.; Chiaradonna, P.; Dei, R.; Garzelli, C.; Kroppenstedt, R.M.; Lari, N.; Mattei, R.; Mariottini, A.; et al. Proposal to Elevate the Genetic Variant MAC-A, Included in the *Mycobacterium avium* Complex, to Species Rank as *Mycobacterium chimaera* Sp. Nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2004**, *54*, 1277–1285. [[CrossRef](#)]
20. Meier, E.; Pennington, K.; Gallo de Moraes, A.; Escalante, P. Characteristics of *Mycobacterium avium* Complex (MAC) Pulmonary Disease in Previously Treated Lung Cancer Patients. *Respir. Med. Case Rep.* **2017**, *22*, 70–73. [[CrossRef](#)]
21. Fennelly, K.P.; Ojano-Dirain, C.; Yang, Q.; Liu, L.; Lu, L.; Progulske-Fox, A.; Wang, G.P.; Antonelli, P.; Schultz, G. Biofilm Formation by *Mycobacterium abscessus* in a Lung Cavity. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2016**, *193*, 692–693. [[CrossRef](#)]
22. Walker, J.; Moore, G.; Collins, S.; Parks, S.; Garvey, M.I.; Lamagni, T.; Smith, G.; Dawkin, L.; Goldenberg, S.; Chand, M. Microbiological Problems and Biofilms Associated with *Mycobacterium chimaera* in Heater-Cooler Units Used for Cardiopulmonary Bypass. *J. Hosp. Infect.* **2017**, *96*, 209–220. [[CrossRef](#)]
23. Falkinham, J.O. *Mycobacterium avium* Complex: Adherence as a Way of Life. *AIMS Microbiol.* **2018**, *4*, 428–438. [[CrossRef](#)]
24. Esteban, J.; García-Coca, M. *Mycobacterium* Biofilms. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 2651. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Pradal, I.; Esteban, J.; Mediero, A.; García-Coca, M.; Aguilera-Correa, J.J. Contact Effect of a *Methylobacterium* Sp. Extract on Biofilm of a *Mycobacterium Chimaera* Strain Isolated from a 3T Heater-Cooler System. *Antibiotics* **2020**, *9*, 474. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Johansen, T.B.; Agdestein, A.; Olsen, I.; Nilsen, S.F.; Holstad, G.; Dønne, B. Biofilm Formation by *Mycobacterium Avium* Isolates Originating from Humans, Swine and Birds. *BMC Microbiology* **2009**, *9*, 159. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Xiang, X.; Deng, W.; Liu, M.; Xie, J. *Mycobacterium* Biofilms: Factors Involved in Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies against Biofilm-Relevant Pathogens. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **2014**, *24*, 269–279. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



## Brief report

Abrar Senhaji-Kacha<sup>1,2\*</sup>   
Arij Akir<sup>1\*</sup>   
Antonio Broncano-Lavado<sup>1</sup>   
Jaime Esteban<sup>1,2</sup>

# Biofilm prevention concentration of clarithromycin against clinically relevant species of nontuberculous mycobacteria

<sup>1</sup>Department of Clinical Microbiology, IIS-Fundación Jiménez Díaz, UAM, Madrid, Spain.  
<sup>2</sup>CIBERINFEC-CIBER of Infectious Diseases, Madrid, Spain.

### Article history

Received: 2 February 2024; Revision Requested: 8 March 2024; Revision Received: 1 April 2024; Accepted: 5 April 2024; Published: 11 April 2024

## ABSTRACT

**Introduction.** *Mycobacterium avium* complex (MAC) and *Mycobacterium abscessus* are a group of nontuberculous mycobacteria (NTM) that have been described as human pathogens. Their ability to develop biofilms in tissues and medical devices is one of the most important pathogenicity factors, with important implications in diagnosis and treatment. Macrolides are usually considered one of the bases of this treatment.

**Methods.** Here we have studied the biofilm prevention concentration (BPC) of 16 strains (n=16) with clarithromycin to avoid the biofilm development by these NTM.

**Results.** In this study, all *M. abscessus* strains have similar BPC, while MAC strains showed different values. For MAC the concentrations ranged between 1-16 mg/L, while for *M. abscessus* the concentration was 32 mg/L for all strains except one that was 64 mg/L.

**Conclusions.** These results open the possibility of using macrolides for the prevention of biofilm development in patients with a risk of developing NTM disease.

**Keywords:** nontuberculous mycobacteria, BPC, MIC, biofilm prevention, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium avium*, clarithromycin.

## Eficacia de la claritromicina contra el biofilm de especies clínicamente relevantes de micobacterias no tuberculosas

## RESUMEN

**Introducción.** *Mycobacterium avium* complex (MAC) y

*Mycobacterium abscessus* son un grupo de micobacterias no tuberculosas (NTM) que han sido descritas como patógenos humanos. Entre los factores de patogenicidad más importantes se encuentra su capacidad para desarrollar biopelículas en tejidos y dispositivos médicos, con importantes implicaciones en el diagnóstico y tratamiento. Los macrólidos suelen considerarse una de las bases de este tratamiento.

**Métodos.** En este estudio hemos estudiado la concentración para la prevención de biopelículas (BPC) de 16 cepas (n=16) con claritromicina para varias de estas NTM.

**Resultados.** Todas las cepas de *M. abscessus* tienen BPC similares, mientras que las cepas de MAC mostraron valores diferentes. Para MAC las concentraciones presentaron un rango entre 1-16 mg/L, mientras que para *M. abscessus* la concentración fue de 32 mg/L para todas las cepas excepto una, que fue de 64 mg/L.

**Conclusiones.** Estos resultados abren la posibilidad de utilizar macrólidos para la prevención del desarrollo de biopelículas en pacientes con riesgo de desarrollar enfermedad por NTM.

**Palabras clave:** micobacterias no tuberculosas, BPC, CMI, prevención de biopelículas, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium avium*, claritromicina.

## INTRODUCTION

Nontuberculous mycobacteria (NTM) include the majority of the species of the genus *Mycobacterium*, including human pathogens such as *Mycobacterium abscessus* and *M. avium* complex. The *Mycobacterium avium* complex (MAC) includes three species that are a cause of human infections (*Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium chimaera*), and are considered the commonest NTM isolated in humans throughout the world [1]. Infections caused by MAC are usually respiratory infections among patients with different comorbidities, while they can cause many different syndromes, including disseminated disease [2].

Correspondence:  
Jaime Esteban, MD, PhD.  
Department of Clinical Microbiology, IIS-Fundación Jiménez Díaz.  
Av. Reyes Católicos, 2. 28040-Madrid, Spain.  
E-mail: jestedbanmoreno@gmail.com; jestedban@fjd.es

\*These authors contributed equally to this manuscript and must be considered as first authors.

On the other hand, *Mycobacterium abscessus* is included among rapidly growing mycobacteria and is found with increasing frequency as an opportunistic human pathogen [3]. Although its taxonomy remains under debate, a widespread taxonomic classification divided this species into three subspecies: *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *bolletii*, and *M. abscessus* subsp. *massiliense* [4]. Infections caused by these species are usually chronic and associated with immunological deficiencies, such as cystic fibrosis (CF), in which morbidity and mortality are associated with both infections and unusual immune responses [5].

NTM infections are currently considered biofilm-related infections, and this fact is of clinical importance because of the higher resistance against antibiotics of sessile bacteria compared with that of planktonic ones [6]. Therefore, avoiding biofilm formation could be extremely important for the management of the patients because it potentially can avoid the development of the disease or, at least, facilitate their treatment.

This study aimed to know the biofilm prevention concentration (BPC) of clarithromycin (an antibiotic that is considered a keystone in the treatment of NTM diseases) and compare it with the minimal inhibitory concentration of planktonic cells and antimicrobial susceptibility testing using *M. avium* complex and *M. abscessus* collection and clinical strains ( $n=16$ ) isolated from patients with and without respiratory disease.

## MATERIAL AND METHODS

**Bacterial strains.** A total of 16 strains ( $n=16$ ) were used in this study. MAC strains used in this study were a total of nine including three type strains and two clinical strains of each species. *M. abscessus* strains used in this study were a total of seven including two type strains and five clinical strains (Table 1). The strains 330 and 624 showed a rough phenotype, while the strains 368, 611, and 531 have a smooth phenotype. The clinical significance of the clinical strains was determined according to the ATS-ERS-IDS-ESCMID criteria [2], being clinically significant the strains *M. avium* 647, *M. intracellulare* 657, *M. chimaera* 655, and all the clinical strains of *M. abscessus*.

All strains were maintained at  $-80^{\circ}\text{C}$  and defrosted before performing the experiments, inoculated onto Middlebrook 7H10 agar (Difco™) plates supplemented with 10% Middlebrook OADC enrichment and 0.4% glycerol and incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 10-15 days. After 24h plates were checked for purity.

**Antimicrobial susceptibility of planktonic bacteria.** The studied clinical strains were tested for antimicrobial susceptibility using the CLSI recommendations for broth microdilution [7] and were interpreted following CLSI and [7] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) criteria [8]. Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of planktonic bacteria was obtained for each strain against clarithromycin (CHL) (Sigma-Aldrich, MA, USA) with a range of 1-256 mg/L. MAC strains were incubated for 10 days and *M. abscessus* strains were incubated for 5 days, all of them at  $37^{\circ}\text{C}$  with

5%  $\text{CO}_2$ . After incubation, MIC values were read with the naked eye according to the CLSI/EUCAST recommendations. A positive control with bacteria without antibiotic and a negative control without microorganisms were included for each strain. This test was performed in triplicate for all strains.

**Biofilm susceptibility assay.** Susceptibility in biofilm was determined as proposed by Fernández-Olmos *et al.* with minor modifications [9]. Biofilm formation for all strains was reached by suspending the strains to  $0.5 \pm 2$  McFarland in liquid Middlebrook medium and 75  $\mu\text{L}$  of each strain was placed onto a 96-well plate (ThermoFisher Scientific, MA, USA). Then, clarithromycin was added to the wells using concentrations between 0.25 and 256 mg/L and 75  $\mu\text{L}$  of CHL serial dilutions to the 96-well plate to study a wide range of concentrations. The plates were incubated for 5 days for the *M. abscessus* strains and 10-15 days incubation for the MAC strains. After incubation, Biofilm Preventive Concentration (BPC) was determined by lack of biofilm formation by visual inspection using an inverted microscopy (Leica, LEITZ DM IL) and by measuring the plates in a spectrophotometer (TECAN, Switzerland) at  $\text{OD}_{595}$  nm. Positive controls with all ATCC strains were used in all the experiments. All strains were tested in triplicate. EUCAST criteria for MICs were adopted for BPCs.

## RESULTS AND DISCUSSION

MICs and BPCs obtained for the *M. abscessus* strains and the MAC clinical strains are shown in Table 1. Interestingly, all but one *M. abscessus* strains showed identical BPC, while MAC isolates showed more variable concentrations, having all *M. avium* strains at the same concentration.

Biofilms are selective environments, placing demands on planktonic microbial cells. A pre-existing microbial biofilm may stimulate, inhibit, or have no effect on the adherence of a particular microbial species or type [10]. For instance, early studies of adherence relied upon having a surface covered with protein (e.g., bovine serum albumin). Without a conditioned surface a particular microorganism would not be able to adhere and form a biofilm [11]. In contrast, *M. avium* is capable of forming new biofilm thanks to its hydrophobic surface that can adhere to all types of surfaces [12].

Biofilm formation and surface adherence is an essential pathogenic factor for the *M. avium* complex because without adherence or biofilm formation cells would be washed away by any flowing force [13]. *M. avium* usually colonizes the respiratory tract of patients with chronic pulmonary disease which can evolve to an infection that is difficult to eradicate. Therefore, it is credible that biofilm formation might have a substantial effect on the maintenance of the infection. On the other hand, *M. abscessus* disease is considered a biofilm-related one, and this mycobacterium has been found forming biofilms in the lung tissue of patients with *M. abscessus* disease [14]. Moreover, many *in vitro* studies have shown that the biofilms formed by this species have an increased resistance against many antibiotics, including macrolides [15].

Table 1		Minimum inhibitory and biofilm prevention concentration of Mycobacteria clinical strains.		
Strain	MIC (mg/L)	BPC (mg/L)	Number of dilutions between MIC and BPC	
<i>M. avium</i> ATCC 25291	4	16	2	
<i>M. intracellulare</i> ATCC 13950	8	8	0	
<i>M. chimaera</i> DSM 44623	≤1	1	≥ 1	
<i>M. avium</i> 717	≤1	16	> 4	
<i>M. avium</i> 647	≤1	16	> 4	
<i>M. intracellulare</i> 505	≤1	8	> 3	
<i>M. intracellulare</i> 657	≤1	4	> 2	
<i>M. chimaera</i> 575	≤1	1	≥ 1	
<i>M. chimaera</i> 655	8	16	1	
<i>M. abscessus</i> DSM 44196 rough	2	32	4	
<i>M. abscessus</i> DSM 44196 smooth	2	32	4	
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> 330	1	32	5	
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> 368	4	32	3	
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i> 624	1	32	5	
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i> 611	0.25	64	8	
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> 531	≥16	32	0	

MIC, minimum inhibitory concentration; BPC, biofilm prevention concentration.

Active antibiotics against either planktonic cells or early attached cells might serve as a prevention method against biofilm formation and development. This can be confirmed with this study where the strains of all the species showed low BPCs for clarithromycin, and by the study of Carter et al, where sub-inhibitory concentrations of macrolides can inhibit partially the biofilm formation of several *M. avium* strains [16]. However, in our study, we looked for the concentration that inhibits completely the development of a biofilm, and this is a possible explanation of our results. Interestingly, MAC isolates showed different values, probably related to the differences detected in biofilm development among all these strains [17], differences that are not detected among *M. abscessus* strains, which are more uniform in biofilm development, as previously described [18]. The latter one is, in fact, very different from MAC, so we expected differences in the detection of BPC between both groups that were confirmed in the study. Former studies that showed the preventive value of macrolides against MAC infection in the first years of the AIDS pandemic [19] can be now explained (at least partially) for this property, because by avoiding biofilm formation we can potentially avoid the disease, and so improving the quality of life of the patients.

The main limitation of our study is the low number of tested strains. Future studies with a large sample size are needed as are studies that test other antibiotics that can be used in the treatment of nontuberculous mycobacteria. Another limitation is the lack of bovine serum in our culture medium, which can be a conditioning factor for biofilm development for mycobacteria. However, we have previously used this

medium in previous studies with these species of mycobacteria with good results [17,18].

These results suggest the importance of developing an early aggressive treatment to prevent biofilm formation in this type of bacteria and open a possibility of preventive measures for these patients that potentially can change their management and outcome. However, how implementing this possibility is a matter for further research, because many issues (dosages, time, type of patients) need to be determined before introducing this type of prophylaxis in common clinical practice.

## FUNDING

This study has been funded by Instituto de Salud Carlos III through the project PI18/01068 (co-funded by European Regional Development Fund. ERDF, a way to build Europe) and CIBERINFEC (CB21/13/00043). AA is funded by the Libyan Government.

## CONFLICTS OF INTEREST

The author declares no conflicts of interest

## REFERENCES

1. Daley CL. *Mycobacterium avium* Complex Disease. Schlossberg D, editor. Microbiol Spectr. 2017 Apr;5(2). doi/10.1128/microbiolspec.TNMI7-0045-2017

2. Daley CL, Iaccarino JM, Lange C, et al. Treatment of Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease: An Official ATS/ERS/ESCMID/IDSA Clinical Practice Guideline. *Clinical Infectious Diseases*. 71(4):905-13. <https://academic.oup.com/cid/article/71/4/905/5892833>
3. Esteban J, Navas E. Treatment of infections caused by nontuberculous mycobacteria. *Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed)*. 2018;36(9):586-92.
4. Leao SC, Tortoli E, Euzéby JP, et al. Proposal that *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* be united and reclassified as *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* comb. nov., designation of *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* subsp. nov. and emended description of *Mycobacterium abscessus*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2011;61(Pt 9):2311-3.
5. Broncano-Lavado A, Senhaji-Kacha A, Santamaria-Corral G, et al. Alternatives to Antibiotics against *Mycobacterium abscessus*. *Antibiotics (Basel)*. 2022;11(10):1322.
6. Siddam AD, Zaslow SJ, Wang Y, et al. Characterization of Biofilm Formation by *Mycobacterium chimaera* on Medical Device Materials. *Front Microbiol*. 2020;11:586657.
7. CLSI. Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardiae, and other aerobic actinomycetes. 3rd ed. CLSI Standard M24. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
8. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 2.0. EUCAST; 2012. <http://www.eucast.org>
9. Fernández-Olmos A, García-Castillo M, Maiz L, et al. In vitro prevention of *Pseudomonas aeruginosa* early biofilm formation with antibiotics used in cystic fibrosis patients. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;40(2):173-6.
10. Falkinham JO. *Mycobacterium avium* complex: Adherence as a way of life. *AIMS Microbiol*. 2018;4(3):428-38.
11. Mullis SN, Falkinham JO. Adherence and biofilm formation of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* and *Mycobacterium abscessus* to household plumbing materials. *J Appl Microbiol*. 2013;115(3):908-14.
12. Wallace RJ, Iakhiaeva E, Williams MD, et al. Absence of *Mycobacterium intracellulare* and presence of *Mycobacterium chimaera* in household water and biofilm samples of patients in the United States with *Mycobacterium avium* complex respiratory disease. *J Clin Microbiol*. 2013;51(6):1747-52.
13. Carter G, Wu M, Drummond DC, et al. Characterization of biofilm formation by clinical isolates of *Mycobacterium avium*. *J Med Microbiol*. 2003;52(Pt 9):747-52.
14. Qvist T, Eickhardt S, Kragh KN, et al. Chronic pulmonary disease with *Mycobacterium abscessus* complex is a biofilm infection. *Eur Respir J*. 2015;46(6):1823-6.
15. Flores V da C, Siqueira FDS, Mizdal CR, et al. Antibiofilm effect of antimicrobials used in the therapy of mycobacteriosis. *Microb Pathog*. 2016;99:229-35.
16. Carter G, Young LS, Bermudez LE. A subinhibitory concentration of clarithromycin inhibits *Mycobacterium avium* biofilm formation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48 (12): 4907-10.
17. Akir A, Senhaji-Kacha A, Muñoz-Egea MC, Esteban J, Aguilera-Correa JJ. Biofilm development by *Mycobacterium avium* complex clinical isolates. Effect of clarithromycin in ultrastructure. *Antibiotics (Basel)*. 2024. 13 (3): 263..
18. Martín de Hijas NZ, García-Almeida D, Ayala G, Fernandez-Roblas R, Gadea I, Celdrán A, Gómez-Barrena E, Esteban J. Biofilm development by clinical strains of non-pigmented rapidly growing mycobacteria. *Clinical Microbiology and Infection*. 2009. 15 (10): 931-936.
19. Pierce M, Crampton S, Henry D, et al. A randomized trial of clarithromycin as prophylaxis against disseminated *Mycobacterium avium* complex infection in patients with advanced acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med*. 1996;335(6):384-91.



## Mycobacterium biofilms

Maria-Carmen Muñoz-Egea<sup>a,b</sup>, Arij Akir<sup>a</sup>, Jaime Esteban<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Clinical Microbiology, IIS-Fundación Jiménez Díaz, UAM, Av. Reyes Católicos 2, 28040, Madrid, Spain

<sup>b</sup> CIBERINFEC - CIBER de Enfermedades Infecciosas, Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Mycobacterium  
Biofilm  
Nontuberculous mycobacteria  
Treatment  
Mycobacteriosis

### ABSTRACT

The genus *Mycobacterium* includes some of the deadliest pathogens of History (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*), but most of the species within the genus are environmental microorganisms. Because some of these nontuberculous mycobacteria (NTM) species can be human pathogens, the study of these mycobacterial biofilms has increased during the last decades, and the interest in this issue increased as well as the growing number of patients with diseases caused by NTM. Different molecular mechanisms have been described, being especially well known the importance of glycopeptidolipids. Moreover, the knowledge of the extracellular matrix has shown important differences with other microorganisms, especially because of the presence of lipidic molecules as a key component of this structure. The clinical importance of mycobacterial biofilms has been described for many chronic diseases, especially lung diseases and implant-related ones, both *in vitro* and *in vivo*, and even in patients. Moreover, the biofilm-producing capacity has been proven also in *M. tuberculosis*, while its importance is not well understood. Biofilm studies have also shown the increasing resistance of mycobacteria in sessile form, and the importance of this resistance in the management of the patients is beyond doubt, being surgery necessary in some cases to cure the patients. Diagnosis of mycobacterial diseases is still based on culture-based techniques designed for the detection of *M. tuberculosis*. Molecular biology-based methods are also broadly used but again designed for tuberculosis diagnosis. Antimicrobial susceptibility testing is also well developed for tuberculosis, but only some species of NTM have standardized techniques for this purpose. New tools or approaches are necessary to treat these patients, whose importance is increasing, as the number of potential hosts is also increasing throughout the world.

### 1. Introduction

Over 200 nontuberculous mycobacteria (NTM) species have been described, with only a few species causing serious and often opportunistic infections in humans (Table 1) [1]. Compared with *Mycobacterium tuberculosis*, NTM has lower virulence, but they can be the cause of infections in humans, especially those with some underlying factors [2–4]. NTM are considered environmental microorganisms that can be found in different environments, mostly water-related, but also in soil, dust particles, and aerosols. This is because they can grow in a wide range of temperatures, pH, salinity, and oxygen tension [2]. Water-related NTM isolates have been described in sources such as drinking water, dental aerosols, cooling water distribution systems, and even in hospital bronchoscopes, and the filters used to wash them [5,6]. However, the distribution of the different mycobacteria in these sources is not uniform, and they can be affected by many environmental circumstances, such as the presence of different disinfectants [7]. Several studies have

noted temporal differences in the isolation of NTM in human samples [8] or between different countries [9]. Thus, it has been shown that these differences may partly determine the frequency and manifestations of NTM lung disease in each geographic location [9]. These differences probably originate from the presence of these mycobacteria in environmental samples, which have been described as the main source of the different infections.

In these natural environments, NTM are usually found in biofilms, especially polymicrobial ones [10], where mycobacteria develop different relationships with other microorganisms, including eukaryotic cells such as free-living amoebae. The ability to form biofilms is probably the most important pathogenic factor in many NTM infections, being the essential life form of most *Mycobacterium* species, and has important implications in all aspects of the NTM diseases [11] because these structures may protect pathogenic mycobacterial species from the host immune system and could help bacteria persist during treatment [12].

\* Corresponding author. Dept. of Clinical Microbiology, IIS-Fundacion Jimenez Diaz, UAM. Av. Reyes Católicos 2, 28040, Madrid, Spain.

E-mail address: [jestebanmoreno@gmail.com](mailto:jestebanmoreno@gmail.com) (J. Esteban).

<https://doi.org/10.1016/j.biofilm.2023.100107>

Received 30 November 2022; Received in revised form 1 February 2023; Accepted 6 February 2023

Available online 7 February 2023

2590-2075/© 2023 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

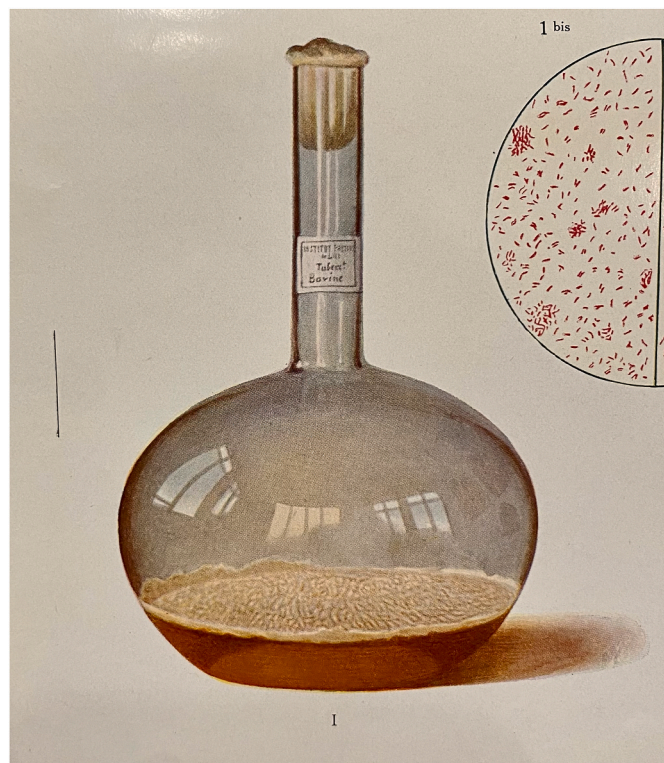
**Table 1**  
Mycobacterial species of importance in human pathology.

Rapidly Growing Mycobacteria		Slowly Growing Mycobacteria	
Not pigmented	Pigmented	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex	Non-tuberculous <i>Mycobacterium</i>
<i>Mycobacterium abscessus</i>	<i>Mycobacterium bacteriemicum</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium kansasii</i>
<i>Mycobacterium chelonae</i>	<i>Mycobacterium celeriflavum</i>	<i>Mycobacterium bovis</i> sp. <i>bovis</i>	<i>Mycobacterium avium</i>
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	<i>Mycobacterium cosmeticum</i>	<i>Mycobacterium bovis</i> BCG	<i>Mycobacterium intracellulare</i>
<i>Mycobacterium porcinum</i>	<i>Mycobacterium neoaurum</i>	<i>Mycobacterium bovis</i> sp. <i>caprae</i>	<i>Mycobacterium chimera</i>
<i>Mycobacterium fortuitum</i> group		<i>Mycobacterium africanum</i>	<i>Mycobacterium lentiflavum</i>
<i>Mycobacterium mucogenicum</i> group		<i>Mycobacterium microti</i>	<i>Mycobacterium marinum</i>
<i>Mycobacterium smegmatis</i> group			<i>Mycobacterium xenopi</i>

## 2. Biofilm formation and composition

Both pathogenic and nonpathogenic species of mycobacteria can form biofilms because this ability is not essentially a virulence mechanism and has been considered the essential form of microbial life [13, 14]. They have been described in the early years of bacteriology, although with a different name since the structures are quite similar to those described today as tuberculosis biofilms [15], and which can be found in the old descriptions of *Mycobacterium tuberculosis* cultures (Fig. 1) [16].

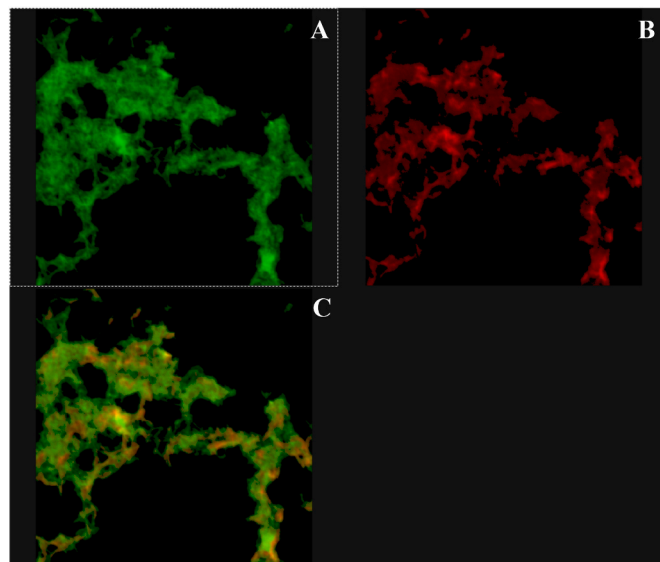
Biofilm development usually begins with bacterial adherence to a surface. Adherence of mycobacteria to inorganic surfaces could be not only a species characteristic but a strain-dependent one, according to the study by Zamora et al. [17]. In this study, performed with rapidly growing mycobacteria and suture filaments of polypropylene, many



**Fig. 1.** Drawing of biofilm-like structures in liquid cultures [16].

clinical and collection strains were tested, looking for differences in the number of CFUs adhering to the filaments. There are clear differences between species and even between strains, with important differences between the clinical and the collection ones. The study concludes that some species seem to adhere more effectively than others, especially the most pathogenic ones (with the notable exception of *M. abscessus*) [17].

Most of the pathogenic factors of the genus *Mycobacterium* are found in the cell wall. It is unique because it includes different lipid molecules such as trehalose dimycolate (cord factor). Different species of mycobacteria can develop cords, which are considered classically a pathogenic expression, and structures like cords have been described in some mycobacterial biofilms (Fig. 2) [18,19]. Other molecules involved in biofilm development have been described, such as glycopeptidolipids (GPLs) [20–24], type III polyketide synthases [25], ESX-1 secretion system [26], GroEL1 chaperone [27], FabG4 [28], Peptidyl-prolyl isomerase [29], FAS-II components [30], protein kinase PknF [31] and many others in different mycobacterial species, most of them rapidly growing [32–34]. Most of these molecules and systems are involved in the mycolic acid synthesis and the metabolism of different components of the mycobacterial cell wall. Some of these components, such as GPLs, short-chain mycolic acids, monomeromycolyl diacylglycerol, and others, play an important role in biofilm formation. Thus, for example, a mycobacterial mutant lacking GroEL1 failed to develop complex architecture and was also defective in mycolic acid production. This suggests that GroEL1 has a specific role in the synthesis of the C<sub>56</sub>–C<sub>68</sub> mycolic acids and that its absence has striking consequences for the development of mature biofilms [27]. These components confer a hydrophobic character to the mycobacterial cell surface that facilitates cell-cell interaction [12]. Nevertheless, the best-known molecules involved in the development of mycobacterial biofilms are the GPLs [35]. These molecules have been described in many different species, including pathogenic rapidly growing mycobacteria (like *M. abscessus*) [36] or slowly growing ones (like the *M. avium* complex) [23]. There are differences between the GPLs that have been described in the different species, all of them with a common lipopeptide core but with differences in glycosylation methylation or acetylation [35]. GPLs have been related not only to biofilm formation but also to sliding motility [22] or the smooth or rough colony phenotype [20], despite these relationships are not clear in all strains, at least among rapidly growing mycobacteria [37, 38]. In fact, according to these studies, the colony phenotype should not be used to assess the clinical significance of a strain in human specimens



**Fig. 2.** Cording inside *M. abscessus* biofilm (CLSM, Backlight® Live/Dead Stain). A): Live bacteria; B) Dead bacteria; C) Combined image.

[38]. Moreover, the rough colony in *M. abscessus* is usually associated with high pathogenicity, but among the *M. avium* complex, it is the smooth phenotype that appears more pathogenic [39].

Biofilms are usually surrounded by an extracellular matrix (ECM) that contributes to their structural integrity and protection of the bacterial community. It is required for cell aggregation, adhesion to surfaces, retention of water, and nutrient provision. It also serves as a physical barrier, allowing bacteria a significant degree of resistance to water treatment, disinfectants, and antibiotics [40,41]. ECM can be as diverse as biofilms, containing polysaccharides, exopolysaccharides, lipids, proteins, and sometimes even nucleic acids [12,42–44]. Some bacteria, such as mycobacteria, do not fit this mold. They are capable of forming robust biofilms but do not produce exopolysaccharides as part of biofilm formation. Scrutiny of mycobacterial genomes suggests that they do not possess the capability for exopolysaccharide production [45]. Carbohydrates are the main components of the ECM of *M. tuberculosis* and *M. chelonae* biofilms [43,46]. Glucose was the predominant sugar present in the ECM of *M. chelonae*, and its relative abundance decreased in established biofilms [43]. In *M. tuberculosis* biofilms the ECM is primarily composed of polysaccharides, with cellulose being a key component [46]. eDNA has been identified in biofilms of *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, and *M. chelonae*, and plays an important structural role in promoting adhesion to surfaces and facilitating bacterial aggregation, as DNase-treated biofilms become less structurally strong and more vulnerable to antibiotics [43,47–50]. Different models of *M. tuberculosis* biofilm formation have been proposed to study the factors that regulate biofilm formation. It has been proven that the ECM of *M. tuberculosis* biofilms includes a large number of lipid molecules (mainly keto-mycolic acids), whereas leukocyte lysate-induced and thiol-reductive stress-induced biofilms possess polysaccharides as the main component of the ECM [12]. A better understanding of the ECM of biofilms will facilitate the development of a shorter treatment regimen.

In natural polymicrobial biofilms, mycobacteria establish different relationships with different microorganisms. Recently, several studies have demonstrated the ability of *M. abscessus* and *P. aeruginosa* to coexist in an *in vivo* model of polymicrobial biofilms, where they can establish a competitive relationship [51–53]. In these studies, *P. aeruginosa* limits the growth of *M. abscessus*, and this species can be found in the bottom of these biofilms [51], and the changes caused by antibiotics if *P. aeruginosa* can affect the growth of mycobacteria, with differences related to the presence of human cells [52,53]. This ability could have important implications in the development of infections caused by these organisms and in the selection of the best available treatment for these patients [53]. The interaction of *P. aeruginosa* and mycobacteria has also been studied with other species *in vivo* in cell cultures, like the *M. avium* complex. In this recent study, *P. aeruginosa* was seen to multiply more rapidly when cells were previously infected *in vitro* with *M. avium* complex or *M. tuberculosis* and induced IL-1 $\beta$  production. The stimulation of *P. aeruginosa* by mycobacteria provides evidence to explain their common clinical association [54]. In this sense, mycobacterial control strategies may be useful in reducing *P. aeruginosa* colonization in these types of patients [55].

### 3. Clinical relevance

NTM are usually considered opportunistic pathogens, as opposed to *M. tuberculosis* complex or *M. leprae*. They are capable of causing a wide variety of infections such as lymphadenitis and infections of the lungs, skin, soft tissues, bursae, joints, tendon sheaths, and bones [2], and many of these mycobacterial diseases (including tuberculosis) have been described as biofilm-related diseases [15,56]. Among immunocompetent patients, respiratory disease is the most frequent one. Most cases of lung infection in these cases are associated with some predisposing condition such as cystic fibrosis, the presence of bullae, past tuberculosis scars, bronchiectasis, and other chronic lung diseases [57,58]. In soft

tissues, bursae, joints, tendon sheaths, and bones are often associated with trauma or surgical procedures [2]. Other syndromes are usually related to the presence of different types of implants, like catheter-related bacteremia [59], or are associated with different medical procedures, such as aesthetic surgery [60,61], in many cases appearing as outbreaks [62,63].

Chronic lung infections are probably the most common diseases that can be caused by NTM in humans. Some specific hosts, such as patients with cystic fibrosis, appear to be more susceptible to these infections. Among these patients, two different forms have been described: cavitary disease and fibronodular disease [64]. Cavitary disease (Fig. 3) usually appears in patients with previous underlying conditions such as bullae or other cavitary diseases. In these patients, the mycobacterial strain first colonizes the cavity and then develops a disease that is difficult to differentiate from tuberculosis. Fibronodular disease (Fig. 4) appears in patients with chronic bronchiectasis or cystic fibrosis. In these cases, the mycobacteria are probably able to colonize the bronchial tree with other pathogens, like *P. aeruginosa*, and to develop disease through an unknown process that involves the complex relationships that can exist between the different pathogens [65]. Since NTM can colonize the respiratory tract without causing infection, diagnostic protocols have been developed considering this fact, trying to avoid undesired side effects from treatments that are not necessary.

Classically, the acquisition of NTM from environmental sources has been considered the main route of contagion. Water systems have been considered the most probable source in these cases, and some outbreaks related to an identified environmental source have been described [62, 63,66]. Different molecular biology techniques have been described as useful for the identification of these outbreaks [8,67,68]. However, the recent development of new molecular tools based on whole genome sequencing has suggested the possibility of interhuman transmission of some strains [69,70]. These reports open new possibilities for the knowledge of the actual epidemiology of these microorganisms, and to establish new control methods that allow us to avoid the contagion and development of these diseases among susceptible hosts.

Other types of infection that can be considered biofilm-related are some outbreaks related to environmental sources. This source is usually related to water, or the aqueous environment (colonized humidifiers, heater-cooler devices, imperfect disinfection, hospital water sources, etc.) [7]. The number of outbreaks related to NTM outbreaks is increasing because of heightened awareness and better diagnostic tests for species-level identification of mycobacteria [62,71]. Most of these outbreaks involve a limited number of patients with a common source, although there is increasing evidence that transmission in this patient population can occur through either direct or indirect patient-to-patient spread [62]. An outbreak of special interest because of the high number of patients (and countries) involved was the outbreak of *M. chimaera* [72,73]. This outbreak was due to the contamination of heat cooling systems used in cardiac surgery at the point where these devices are



Fig. 3. Cavitary disease caused by *M. kansasii* (CT-Scan).



Fig. 4. Fibronodular disease caused by *M. abscessus* (Thoracic X-ray).

produced, and then all the contaminated machines were delivered to many different places [74]. *M. chimaera* spread through aerosols and infected many patients in different countries. Biofilms formed by this species present on the machines are considered to be the key pathogenic factor in this outbreak [72,73].

The presence of a foreign body or biomaterial is also a risk factor for some infections caused by NTM. Many different syndromes of biomaterial-related infections caused by NTM have been described, including catheter-related bacteremia and endocarditis [59], prosthetic joint infection [75,76], peritonitis associated with peritoneal dialysis [77], post-surgical infections [78], augmentation mammoplasty [79] and others. In all these cases, removal of the biomaterial is essential to cure the patients [80,81], because the antibiotic treatment alone is not able to eradicate the biofilm. In some cases, not only NTM, but *M. tuberculosis* complex may be the cause of these biomaterial-associated infections [75], probably because these species are also able to form a biofilm. However, the role of biofilm in pulmonary tuberculosis (or other infections without any relation to implants or biomaterials) is still less defined, and the importance of the clinical evolution of the disease and the management of the patients is not well established [56].

#### 4. Diagnosis

The management of mycobacterial infections must necessarily take into account the isolated species and their *in vitro* sensitivity when appropriate, as well as the characteristics of the patient. Hence the importance of a good clinical and microbiological diagnosis [58]. The clinical diagnosis will depend on the signs and symptoms of the patient, which are influenced by the species of mycobacteria and location. Thus, for example, the clinical diagnosis of pulmonary tuberculosis is suspected in patients with relevant clinical manifestations, such as persistent and productive cough, hemoptysis, fever, weight loss, and an epidemiological link with tuberculosis. Clinical observations can also be confirmed by chest x-ray findings and other tests [82].

The microbiological diagnosis of tuberculosis and the rest of mycobacteriosis has traditionally been based, and probably will continue to be so in the future, on direct examination and culture. Microscopy, although relatively insensitive, remains the only diagnostic test capable of providing a rapid response (first 24 h) for many laboratories, regardless of their budget and sophistication, especially in many countries where tuberculosis is highly endemic. In addition, it gives us an assessment of the degree of infectivity of the patient with pulmonary

tuberculosis because it can be quantified.

In the recent decades, an important set of new culture-based techniques have appeared that can generate a rapid and complete results. It has gone through the use of radiometric and non-radiometric liquid culture systems for isolation and antimicrobial susceptibility studies, the application of chromatographic techniques and the development of nucleic acid-based techniques for rapid identification of the isolated mycobacteria, and detection of *M. tuberculosis* complex directly in clinical samples. More recently molecular typing for monitoring strains of interest and, finally, DNA sequencing and MALDI-TOF MS for identification has been integrated in the mycobacteriology laboratory for their routine use [83]. It is important to emphasize that the use of the different techniques is not advisable for all the cases and patients, and the interpretation of their results must be prudent and the clinical and radiological data must be taken into account [84]. Most of these methods have been developed for the diagnosis of tuberculosis and the isolation of *M. tuberculosis* complex species. However, most NTM can also be isolated with these systems, and criteria for the interpretation of the microbiological results have been developed for a clear interpretation of the isolation of these environmental species [58]. In the present moment, some specific media for NTM have been developed and have been used, not only for clinical samples, but for environmental ones [85–87]. These later samples are of special interest, because NTM grow in them as part of polymicrobial biofilms, and because the slow growing of all species (compared with other bacteria) the isolation of them can be problematic. Of interest, sonication techniques (developed for implants with biofilm-related infections) have been able to isolate some NTM from implant-related infections if special culture media are used or if conventional bacteriology cultures prolong their incubation [88,89].

Each laboratory must define the techniques to be used according to its possibilities and epidemiological characteristics of its area. Moreover, microbiology laboratory excellence will not be effective if there is no close collaboration between the laboratory and clinicians. A sample received in good condition and with all the necessary information will allow the laboratory to select the best available techniques for mycobacterial diagnosis.

#### 5. Susceptibility testing

A critical feature of tuberculosis diagnosis is identifying susceptibility to first- and second-line antibiotics quickly and accurately for efficient treatment. While MDR-TB cases are resistant at least to the first-line drugs isoniazid (INH) and rifampicin (RIF), XDR-TB cases are resistant to INH, RIF, any fluoroquinolone, and at least one of the second-line injectable drugs (amikacin, kanamycin, and capreomycin) [90,91]. Detection of drug-resistant MTB is often performed using the accurate but slow culture-based drug sensitivity testing (DST). Standardized antibiotic susceptibility testing procedures require eight to 12 weeks to determine resistance on solid culture media, and using automated liquid culture systems have been proved faster and with better sensitivity. However, even with liquid cultures, it takes two to four weeks to obtain antimicrobial susceptibility of a *M. tuberculosis* strain. In response to the relative time to generate a DST phenotypic result, faster nucleic acid amplification tests have been developed that are able to detect critical resistance mutations even in clinical samples. For example, the Cepheid GeneXpert MTB/RIF assay (Cepheid, USA) detects mutations associated with RIF resistance, while the Hain MTBDR Plus (Hain, Germany) and Abbott RealTime MTB RIF/INH (Abbott, USA) detects mutations associated with RIF and INH resistance, all of them in clinical samples [92,93].

On the other hand, NTM species show significant heterogeneity in their susceptibility to standard *anti*-TB drugs. Susceptibility studies in NTM are limited to a few species where these methods have been standardized, including the MAC, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium marinum*, and non-pigmented rapidly growing mycobacteria of clinical significance. There is a standardization of sensitivity studies for

these organisms, where microdilution is established as the reference technique for these studies [94].

## 6. Treatment

The treatment of these diseases must consider the presence of biofilm as a fact that needs specific approaches to cure patients. These infections are often recalcitrant to treatment and require long-term multidrug therapy [58,95], and in many cases, the rate of failures is high [96]. Some of these infections (endocarditis, meningitis, endovascular prosthesis-related bacteremia) have a high mortality rate, so adequate treatment is mandatory. Along with implant removal, long periods of treatment (usually with antibiotic combinations) are usually necessary.

One of the most important problems encountered in *Mycobacterium* biofilms is antibiotic and antimicrobial resistance. Sessile bacteria usually need higher antibiotic concentrations to be killed than planktonic forms, and this is also true for mycobacteria. *In vitro* biofilms of mycobacteria are more persistent against antibiotics than their single-cell planktonic counterparts in several *in vitro* studies [15,97]. Different mechanisms have been proposed to explain this resistance [98,99], but probably their relative importance of them is different. In the study of Ortiz-Perez et al., antibiotic penetration in the biofilm of rapidly growing mycobacteria seems to have a minor importance in the resistance of the biofilm [100], but in the study by Greendyke and Byrd, the alteration of the metabolic state seems to be the determinant mechanism for the antimicrobial resistance among sessile bacteria [99]. The relative importance of other mechanisms, such as activation of resistance mechanisms (efflux pumps, inducible methylases) or any other, is still to be investigated.

New approaches are needed to cure patients with biofilm-related mycobacterial diseases. One approach is the use of molecules with an antibiofilm effect (usually with activity against the extracellular matrix), such as N-acetylcysteine (NAC) and Tween 80, which demonstrated a synergistic effect with antibiotics [101].

Another approach is the use of some microorganisms (e.g. *Methylobacterium* sp.) that have the property of inhibiting mycobacterial biofilms. This property can be demonstrated using not only live cells but also dead cells and even the crude extract of the bacteria in several *in vitro* studies with different NTM species [102,103]. *Methylobacterium* extract even can be used to pre-treat surfaces to prevent biofilm development by *M. chimaera* (and probably other NTM) [104]. Further research could lead to the study of proteins and other molecules that appear in the *Methylobacterium* sp. extract and that can be tested as antibiofilm agents [104].

Other approaches for the treatment of mycobacterial biofilms include nanoparticles, phototherapy, phage therapy, vaccines, antimicrobial peptides, and new antibiotics. All of these approaches (and those described above) must be tested not only *in vitro*, but in experimental *in vivo* studies and, recently, in clinical practice [105–111]. These possibilities, together with the development of new antibiotics active against mycobacterial biofilms, are necessary because of the high degrees of resistance of many of the NTM, and the problems that appear with the treatment of some species, like *M. abscessus*, that is considered nowadays an emerging species with many treatment problems [112].

## 7. Conclusions

A majority of the species of the genus *Mycobacterium* (probably almost all of them) can form biofilms, both *in vitro* and, probably, *in vivo*. These structures are probably the main form of life for all environmental NTM, and probably are important in the life cycle of *M. tuberculosis* and other members of its complex. The importance of mycobacterial biofilms in modern medicine is beyond doubt, is considered nowadays as the key pathogenic factor for most NTM diseases, and probably could have a role in the pathogenesis of tuberculosis, too. The presence of these structures is also of crucial importance in the management of patients because of

the resistance of the sessile bacteria against most antibiotics. Trying to overcome this problem, some strategies have been developed and others are under research. The growing importance of these microorganisms in modern medicine made these efforts more important than before, because we need more tools to fight against these emerging pathogens.

## CRedit authorship contribution statement

**Maria-Carmen Muñoz-Egea:** Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Resources, Software, Supervision, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Arij Akir:** Data curation, Investigation, Methodology, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Jaime Esteban:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Project administration, Resources, Software, Supervision, Validation, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing.

## Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Data availability

No data was used for the research described in the article.

## References

- [1] Matsumoto Y, Kinjo T, Motooka D, Nabeya D, Jung N, Uechi K, et al. Comprehensive subspecies identification of 175 nontuberculous mycobacteria species based on 7547 genomic profiles. *Emerg Microbes Infect* 9 de julio de 2019;8(1):1043–53.
- [2] Falkinham JO. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* abril de 1996;9(2):177–215.
- [3] Wolinsky E. Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. *Am Rev Respir Dis.* enero de 1979;119(1):107–59.
- [4] Esteban J, García-Pedraza M, Muñoz-Egea MC, Alcaide F. Current treatment of nontuberculous mycobacteriosis: an update. *Expert Opin Pharmacother* mayo de 2012;13(7):967–86.
- [5] Falkinham JO. Hospital water filters as a source of *Mycobacterium avium* complex. *J Med Microbiol* octubre de 2010;59(Pt 10):1198–202.
- [6] Castellano Realpe OJ, Gutiérrez JC, Sierra DA, Pazmiño Martínez LA, Prado Palacios YY, Echeverría G, et al. Dental unit waterlines in quito and caracas contaminated with nontuberculous mycobacteria: a potential health risk in dental practice. *Int J Environ Res Public Health* 31 de marzo de 2020;17(7):E2348.
- [7] Falkinham JO. Nontuberculous mycobacteria in the environment. *Tuberc Edinb Scotl* 28 de septiembre de 2022;137:102267.
- [8] Lopez-Roa P, Aznar E, Cacho J, Cogollos-Agruna R, Domingo D, García-Arata MI, et al. Epidemiology of non-tuberculous mycobacteria isolated from clinical specimens in madrid, Spain, from 2013 to 2017. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* junio de 2020;39(6):1089–94.
- [9] Hoefsloot W, van Ingen J, Andrejak C, Angeby K, Bauriaud R, Bemer P, et al. The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: an NTM-NET collaborative study. *Eur Respir J* diciembre de 2013;42(6):1604–13.
- [10] Johansen MD, Herrmann JL, Kremer L. Non-tuberculous mycobacteria and the rise of *Mycobacterium abscessus*. *Nat Rev Microbiol* julio de 2020;18(7):392–407.
- [11] Faria S, Joao I, Jordao L. General overview on nontuberculous mycobacteria, biofilms, and human infection. *J Pathog* 2015;809014. 2015.
- [12] Chakraborty P, Kumar A. The extracellular matrix of mycobacterial biofilms: could we shorten the treatment of mycobacterial infections? *Microb Cell Graz Austria* 18 de enero de 2019;6(2):105–22.
- [13] Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 1995;49:711–45.
- [14] Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol.* febrero de 2004;2(2):95–108.
- [15] Basaraba RJ, Ojha AK. Mycobacterial biofilms: revisiting tuberculosis bacilli in extracellular necrotizing lesions. *Microbiol Spectr* junio de 2017;5(3).
- [16] Calmette A. L' Infection Bacillaire Et La Tuberculose chez l'homme et chez les animaux. 4.<sup>th</sup> ed. Paris: Masson et Cie.; 1924.
- [17] Zamora N, Esteban J, Kinnari TJ, Celdrán A, Granizo JJ, Zafra C. In-vitro evaluation of the adhesion to polypropylene sutures of non-pigmented, rapidly growing mycobacteria. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* septiembre de 2007;13(9):902–7.

- [18] Hall-Stoodley L, Brun OS, Polshyna G, Barker LP. Mycobacterium marinum biofilm formation reveals cording morphology. *FEMS Microbiol Lett* abril de 2006;257(1):43–9.
- [19] Williams MM, Yakrus MA, Arduino MJ, Cooksey RC, Crane CB, Banerjee SN, et al. Structural analysis of biofilm formation by rapidly and slowly growing nontuberculous mycobacteria. *Appl Environ Microbiol* abril de 2009;75(7):2091–8.
- [20] Howard ST, Rhoades E, Recht J, Pang X, Alsop A, Kolter R, et al. Spontaneous reversion of Mycobacterium abscessus from a smooth to a rough morphotype is associated with reduced expression of glycopeptidolipid and reacquisition of an invasive phenotype. *Microbiol Read Engl* junio de 2006;152(Pt 6):1581–90.
- [21] Recht J, Martínez A, Torello S, Kolter R. Genetic analysis of sliding motility in Mycobacterium smegmatis. *J Bacteriol* agosto de 2000;182(15):4348–51.
- [22] Recht J, Kolter R. Glycopeptidolipid acetylation affects sliding motility and biofilm formation in Mycobacterium smegmatis. *J Bacteriol* octubre de 2001;183(19):5718–24.
- [23] Carter G, Wu M, Drummond DC, Bermudez LE. Characterization of biofilm formation by clinical isolates of Mycobacterium avium. *J Med Microbiol* septiembre de 2003;52(Pt 9):747–52.
- [24] Yamazaki Y, Danelishvili L, Wu M, Macnab M, Bermudez LE. Mycobacterium avium genes associated with the ability to form a biofilm. *Appl Environ Microbiol* enero de 2006;72(1):819–25.
- [25] Parvez A, Giri S, Giri GR, Kumari M, Bisht R, Saxena P. Novel type III polyketide synthases biosynthesize methylated polyketides in Mycobacterium marinum. *Sci Rep* 25 de abril de 2018;8(1):6529.
- [26] Lai LY, Lin TL, Chen YY, Hsieh PF, Wang JT. Role of the Mycobacterium marinum ESX-1 secretion system in sliding motility and biofilm formation. *Front Microbiol* 2018;9:1160.
- [27] Ojha A, Anand M, Bhatt A, Kremer L, Jacobs WR, Hatfull GF. GroEL1: a dedicated chaperone involved in mycolic acid biosynthesis during biofilm formation in mycobacteria. *Cell* 2 de diciembre de 2005;123(5):861–73.
- [28] Sharma A, Vashist J, Shrivastava R. Mycobacterium fortuitum fabG4 knockdown studies: implication as pellicle and biofilm specific drug target. *J Basic Microbiol* 2022;23. de junio de.
- [29] Kumar A, Alam A, Grover S, Pandey S, Tripathi D, Kumari M, et al. Peptidyl-prolyl isomerase-B is involved in Mycobacterium tuberculosis biofilm formation and a generic target for drug repurposing-based intervention. *NPJ Biofilms Microbiomes* 2019;5(1):3.
- [30] Sharma A, Vashist J, Shrivastava R. Knockdown of the Type-II Fatty acid synthase gene hadC in mycobacterium fortuitum does not affect its growth, biofilm formation, and survival under stress. *Int J Mycobacteriology* 2022;11(2):159–66.
- [31] Gopalaswamy R, Narayanan S, Jacobs WR, Av-Gay Y. Mycobacterium smegmatis biofilm formation and sliding motility are affected by the serine/threonine protein kinase PknF. *FEMS Microbiol Lett*. enero de 2008;278(1):121–7.
- [32] Laencina L, Dubois V, Le Moigne V, Viljoen A, Majlessi L, Pritchard J, et al. Identification of genes required for Mycobacterium abscessus growth in vivo with a prominent role of the ESX-4 locus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 30 de enero de 2018;115(5):E1002–11.
- [33] Ripoll F, Pasek S, Schenowitz C, Dossat C, Barbe V, Rottman M, et al. Non mycobacterial virulence genes in the genome of the emerging pathogen Mycobacterium abscessus. *PLoS One* 19 de junio de 2009;4(6):e5660.
- [34] Dubois V, Pawlik A, Borjes A, Le Moigne V, Sismeiro O, Legendre R, et al. Mycobacterium abscessus virulence traits unraveled by transcriptomic profiling in amoeba and macrophages. *PLoS Pathog* 8 de noviembre de 2019;15(11):e1008069.
- [35] Schorey JS, Sweet L. The mycobacterial glycopeptidolipids: structure, function, and their role in pathogenesis. *Glycobiology* noviembre de 2008;18(11):832–41.
- [36] Howard ST, Byrd TF. The rapidly growing mycobacteria: saprophytes and parasites. *Microbes Infect* diciembre de 2000;2(15):1845–53.
- [37] Esteban J, Martin-de-Hijas NZ, Kinnari TJ, Ayala G, Fernandez-Roblas R, Gadea I. Biofilm development by potentially pathogenic non-pigmented rapidly growing mycobacteria. *BMC Microbiol* octubre de 2008;8:184.
- [38] Martin-de-Hijas NZ, Garcia-Almeida D, Ayala G, Fernandez-Roblas R, Gadea I, Celdran A, et al. Biofilm development by clinical strains of non-pigmented rapidly growing mycobacteria. *Clin Microbiol Infect* octubre de 2009;15(10):931–6.
- [39] Kam JY, Hortle E, Krogman E, Warner SE, Wright K, Luo K, et al. Rough and smooth variants of Mycobacterium abscessus are differentially controlled by host immunity during chronic infection of adult zebrafish. *Nat Commun* 17 de febrero de 2022;13:952.
- [40] Aung TT, Yam JKH, Lin S, Salleh SM, Givskov M, Liu S, et al. Biofilms of pathogenic nontuberculous mycobacteria targeted by new therapeutic approaches. *Antimicrob Agents Chemother* enero de 2016;60(1):24–35.
- [41] Aung TT, Chor WHJ, Yam JKH, Givskov M, Yang L, Beuerman RW. Discovery of novel antimycobacterial drug therapy in biofilm of pathogenic nontuberculous mycobacterial keratitis. *Ocul Surf* octubre de 2017;15(4):770–83.
- [42] Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* enero de 2005;13(1):20–6.
- [43] Vega-Dominguez P, Peterson E, Pan M, Di Maio A, Singh S, Umapathy S, et al. Biofilms of the non-tuberculous Mycobacterium chelonae form an extracellular matrix and display distinct expression patterns. *Cell Surf Amst Neth* diciembre de 2020;6:100043.
- [44] Dokic A, Peterson E, Arrieta-Ortiz ML, Pan M, Di Maio A, Baliga N, et al. Mycobacterium abscessus biofilms produce an extracellular matrix and have a distinct mycolic acid profile. *Cell Surf* 6 de abril de 2021;7:100051.
- [45] Zambrano MM, Kolter R. Mycobacterial biofilms: a greasy way to hold it together. *Cell* 2 de diciembre de 2005;123(5):762–4.
- [46] Trivedi A, Mavi PS, Bhatt D, Kumar A. Thiol reductive stress induces cellulose-anchored biofilm formation in Mycobacterium tuberculosis. *Nat Commun* 25 de abril de 2016;7:11392.
- [47] Rose SJ, Babrak LM, Bermudez LE. Mycobacterium avium possesses extracellular DNA that contributes to biofilm formation, structural integrity, and tolerance to antibiotics. *PLoS One* 2015;10(5):e0128772.
- [48] Rose SJ, Bermudez LE. Identification of bicarbonate as a trigger and genes involved with extracellular DNA export in mycobacterial biofilms. *mBio*. 6 de diciembre de 2016;7(6):e01597-16.
- [49] Toyofuku M, Inaba T, Kiyokawa T, Obana N, Yawata Y, Nomura N. Environmental factors that shape biofilm formation. *Biosci Biotechnol Biochem* 2016;80(1):7–12.
- [50] Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 22 de febrero de 2002;295(5559):1487.
- [51] Rodriguez-Sevilla G, Garcia-Coca M, Romera-Garcia D, Aguilera-Correa JJ, Mahillo-Fernandez I, Esteban J, et al. Non-Tuberculous Mycobacteria multispecies biofilms in cystic fibrosis: development of an in vitro Mycobacterium abscessus and Pseudomonas aeruginosa dual species biofilm model. *Int J Med Microbiol*. abril de 2018;308(3):413–23.
- [52] Rodriguez-Sevilla G, Rigauts C, Vandeplassche E, Ostyn L, Mahillo-Fernandez I, Esteban J, et al. Influence of three-dimensional lung epithelial cells and interspecies interactions on antibiotic efficacy against Mycobacterium abscessus and Pseudomonas aeruginosa. *Pathog Dis*. junio de 2018;76(4):fty034.
- [53] Rodríguez-Sevilla G, Crabbé A, García-Coca M, Aguilera-Correa JJ, Esteban J, Pérez-Jorge C. Antimicrobial treatment provides a competitive advantage to Mycobacterium abscessus in a dual-species biofilm with Pseudomonas aeruginosa. *Antimicrob Agents Chemother* noviembre de 2019;63(11):e01547-19.
- [54] Henkle E, Brunton AE, Aksamit TR, Winthrop KL. Isolation of Pseudomonas aeruginosa after nontuberculous mycobacteria. *Int J Tuberc Lung Dis Off J Int Union Tuberc Lung Dis*. 1 de mayo de 2022;26(5):460–2.
- [55] Carazo-Fernández L, González-Cortés C, López-Medrano R, Díez-Tascón C, Marcos-Benavides MF, Rivero-Lezcano OM. Mycobacterium avium complex infected cells promote growth of the pathogen Pseudomonas aeruginosa. *Microb Pathog*. mayo de 2022;166:105549.
- [56] Chakraborty P, Bajeli S, Kaushal D, Radotra BD, Kumar A. Biofilm formation in the lung contributes to virulence and drug tolerance of Mycobacterium tuberculosis. *Nat Commun*. 11 de marzo de 2021;12(1):1606.
- [57] Griffith DE, Girard WM, Wallace RJ. Clinical features of pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria. An analysis of 154 patients. *Am Rev Respir Dis*. mayo de 1993;147(5):1271–8.
- [58] Daley CL, Iaccarino JM, Lange C, Cambau E, Wallace RJ, Andrejak C, et al. Treatment of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease: an official ATS/ERS/ESCMID/IDSA clinical practice guideline. *Clin Infect Dis*. agosto de 2020;71(4):905–13.
- [59] El Helou G, Viola GM, Hachem R, Han XY, Raad II. Rapidly growing mycobacterial bloodstream infections. *Lancet Infect Dis*. febrero de 2013;13(2):166–74.
- [60] Wallace RJ, Swenson JM, Silcox VA, Good RC, Tschen JA, Stone MS. Spectrum of disease due to rapidly growing mycobacteria. *Rev Infect Dis* 1983;5(4):657–79.
- [61] Franco-Paredes C, Marcos LA, Heno-Martínez AF, Rodríguez-Morales AJ, Villamil-Gómez WE, Gotuzzo E, et al. Cutaneous mycobacterial infections. *Clin Microbiol Rev*. enero de 2018;32(1):e00069-18.
- [62] Sood G, Parrish N. Outbreaks of nontuberculous mycobacteria. *Curr Opin Infect Dis*. agosto de 2017;30(4):404–9.
- [63] Wallace RJ, Brown BA, Griffith DE. Nosocomial outbreaks/pseudo-outbreaks caused by nontuberculous mycobacteria. *Annu Rev Microbiol* 1998;52:453–90.
- [64] Fennelly KP, Ojano-Dirain C, Yang Q, Liu L, Lu L, Progulsk-Fox A, et al. Biofilm Formation by Mycobacterium abscessus in a lung cavity. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 de marzo de 2016;193(6):692–3.
- [65] Gannon AD, Darch SE. Same game, different players: emerging pathogens of the CF lung. *mBio*. 12 de enero de 2021;12(1):e01217-e01220.
- [66] D'Antonio S, Rogliani P, Paone G, Altieri A, Alma MG, Cazzola M, et al. An unusual outbreak of nontuberculous mycobacteria in hospital respiratory wards: association with nontuberculous mycobacterial colonization of hospital water supply network. *Int J Mycobacteriology*. junio de 2016;5(2):244–7.
- [67] Burns DN, Wallace RJ, Schultz ME, Zhang YS, Zubairi SQ, Pang YJ, et al. Nosocomial outbreak of respiratory tract colonization with Mycobacterium fortuitum: demonstration of the usefulness of pulsed-field gel electrophoresis in an epidemiologic investigation. *Am Rev Respir Dis*. noviembre de 1991;144(5):1153–9.
- [68] Garcia-Pedrazuela M, Frutos JM, Muñoz-Egea MC, Alcaide F, Tortola T, Vitoria A, et al. Polyclonality among clinical strains of non-pigmented rapidly growing mycobacteria: phenotypic and genotypic differences and their potential implications. *Clin Microbiol Infect*. abril de 2015;21(4):348.e1–4.
- [69] Bryant JM, Grogono DM, Rodríguez-Rincon D, Everall I, Brown KP, Moreno P, et al. Emergence and spread of a human-transmissible multidrug-resistant nontuberculous mycobacterium. *Science*. 11 de noviembre de 2016;354(6313):751–7.
- [70] Fujiwara K, Yoshida M, Murase Y, Aono A, Furuuchi K, Tanaka Y, et al. Potential cross-transmission of Mycobacterium abscessus among non-cystic fibrosis patients at a tertiary hospital in Japan. *Microbiol Spectr*. 29 de junio de 2022;10(3):e0009722.

- [71] Hammer-Dedet F, Dupont C, Evrevin M, Jumas-Bilak E, Romano-Bertrand S. Improved detection of non-tuberculous mycobacteria in hospital water samples. *Infect Dis Now*. agosto de 2021;51(5):488–91.
- [72] Schreiber PW, Kohl TA, Kuster SP, Niemann S, Sax H. The global outbreak of *Mycobacterium chimaera* infections in cardiac surgery—a systematic review of whole-genome sequencing studies and joint analysis. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. noviembre de 2021;27(11):1613–20.
- [73] Diekema DJ. MYCOBACTERIUM *chimaera* infections after cardiovascular surgery: lessons from a global outbreak. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2019;130:136–44.
- [74] Sommerstein R, Schreiber PW, Diekema DJ, Edmond MB, Hasse B, Marschall J, et al. *Mycobacterium chimaera* outbreak associated with heater-cooler devices: piecing the puzzle together. *Infect Control Hosp Epidemiol*. enero de 2017;38(1):103–8.
- [75] Uhel F, Corvaisier G, Poinsignon Y, Chirouze C, Beraud G, Grossi O, et al. *Mycobacterium tuberculosis* prosthetic joint infections: a case series and literature review. *J Infect*. enero de 2019;78(1):27–34.
- [76] Santoso A, Phatama KY, Rhatomy S, Budhiparama NC. Prosthetic joint infection of the hip and knee due to *Mycobacterium* species: a systematic review. *World J Orthop*. 18 de mayo de 2022;13(5):503–14.
- [77] Song Y, Wu J, Yan H, Chen J. Peritoneal dialysis-associated nontuberculous mycobacterium peritonitis: a systematic review of reported cases. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. abril de 2012;27(4):1639–44.
- [78] Celdran A, Esteban J, Manas J, Granizo JJ. Wound infections due to *Mycobacterium fortuitum* after polypropylene mesh inguinal hernia repair. *J Hosp Infect*. agosto de 2007;66(4):374–7.
- [79] Boettcher AK, Bengtson BP, Farber ST, Ford RD. Breast infections with atypical mycobacteria following reduction mammoplasty. *Aesthetic Surg J* 2010;30(4):542–8.
- [80] Wang SX, Yang CJ, Chen YC, Lay CJ, Tsai CC. Septic arthritis caused by *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium abscessus* in a prosthetic knee joint: case report and review of literature. *Intern Med Tokyo Jpn* 2011;50(19):2227–32.
- [81] Mulhall AM, Hebbeler-Clark RS. Native pulmonic valve endocarditis due to *Mycobacterium fortuitum*: a case report and literature review. *Case Rep Infect Dis* 2015;274819. 2015.
- [82] Dheda K, Barry CE, Maartens G. Tuberculosis. *Lancet Lond Engl*. 19 de marzo de 2016;387(10024):1211–26.
- [83] Caulfield AJ, Wengenack NL. Diagnosis of active tuberculosis disease: from microscopy to molecular techniques. *J Clin Tuberc Mycobact Dis*. agosto de 2016;4:33–43.
- [84] Williamson DA, Basu I, Bower J, Freeman JT, Henderson G, Roberts SA. An evaluation of the Xpert MTB/RIF assay and detection of false-positive rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. octubre de 2012;74(2):207–9.
- [85] Alexander KJ, Furlong JL, Baron JL, Rihs JD, Stephenson D, Perry JD, et al. Evaluation of a new culture medium for isolation of nontuberculous mycobacteria from environmental water samples. *PLoS One* 2021;16(3):e0247166.
- [86] Brown-Elliott BA, Molina S, Fly T, Njie O, Stribley P, Stephenson D, et al. Evaluation of a novel rapidly-growing mycobacteria medium for isolation of *Mycobacterium abscessus* complex from respiratory specimens from patients with bronchiectasis. *Heliyon*. octubre de 2019;5(10):e02684.
- [87] Plongla R, Preece CL, Perry JD, Gilligan PH. Evaluation of RGM medium for isolation of nontuberculous mycobacteria from respiratory samples from patients with cystic fibrosis in the United States. *J Clin Microbiol*. mayo de 2017;55(5):1469–77.
- [88] Esteban J, Gadea I, Perez-Jorge C, Sandoval E, Garcia-Canete J, Fernandez-Roblas R, et al. Diagnosis of spacer-associated infection using quantitative cultures from sonicated antibiotics-loaded spacers: implications for the clinical outcome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. febrero de 2016;35(2):207–13.
- [89] Esteban J, Gomez-Barrena E, Cordero J, Martin-de-Hijas NZ, Kinnari TJ, Fernandez-Roblas R. Evaluation of quantitative analysis of cultures from sonicated retrieved orthopedic implants in diagnosis of orthopedic infection. *J Clin Microbiol*. febrero de 2008;46(2):488–92.
- [90] Shah NS, Wright A, Bai GH, Barrera L, Boulahbal F, Martín-Casabona N, et al. Worldwide emergence of extensively drug-resistant tuberculosis. *Emerg Infect Dis*. marzo de 2007;13(3):380–7.
- [91] Zignol M, Hosseini MS, Wright A, Weezenbeek CL van, Nunn P, Watt CJ, et al. Global incidence of multidrug-resistant tuberculosis. *J Infect Dis*. 15 de agosto de 2006;194(4):479–85.
- [92] [Internet] Policy statement: automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: xpert MTB/RIF system. Geneva: World Health Organization; 2011 [accessed at January, 30th, 2023]. (WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK304235/>.
- [93] Kostera J, Leckie G, Abravaya K, Wang H. Performance of the Abbott RealTime MTB RIF/INH resistance assay when used to test *Mycobacterium tuberculosis* specimens from Bangladesh. *Infect Drug Resist* 2018;11:695–9.
- [94] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Susceptibility testing of mycobacteria, nocardia spp., and other aerobic actinomycetes. In: CLSI standard M24. 3. third ed. Wayne, Pennsylvania, USA: Clinical Laboratory Standards Institute; 2018.
- [95] Chakraborty P, Bajeli S, Kaushal D, Radotra BD, Kumar A. Biofilm formation in the lung contributes to virulence and drug tolerance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Commun*. 11 de marzo de 2021;12(1):1606.
- [96] Ku JH, Henkle E, Aksamit TR, Barker A, Brunton AE, Winthrop KL, et al. Treatment of nontuberculous mycobacterial (NTM) pulmonary infection in the US bronchiectasis and NTM registry: treatment patterns, adverse events, and adherence to American thoracic society/infectious disease society of America treatment guidelines. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 13 de enero de 2023;76(2):338–41.
- [97] Muñoz-Egea MC, García-Pedrazuela M, Esteban J. [In vitro susceptibility of rapidly growing mycobacteria biofilms against different antimicrobials]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. febrero de 2015;33(2):136–7.
- [98] Ortiz-Pérez A, Martín-de-Hijas N, Alonso-Rodríguez N, Molina-Manso D, Fernández-Roblas R, Esteban J. Importance of antibiotic penetration in the antimicrobial resistance of biofilm formed by non-pigmented rapidly growing mycobacteria against amikacin, ciprofloxacin and clarithromycin. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. febrero de 2011;29(2):79–84.
- [99] Greendyke R, Byrd TF. Differential antibiotic susceptibility of *Mycobacterium abscessus* variants in biofilms and macrophages compared to that of planktonic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. junio de 2008;52(6):2019–26.
- [100] Ortiz-Pérez A, Martín-de-Hijas N, Alonso-Rodríguez N, Molina-Manso D, Fernández-Roblas R, Esteban J. Importance of antibiotic penetration in the antimicrobial resistance of biofilm formed by non-pigmented rapidly growing mycobacteria against amikacin, ciprofloxacin and clarithromycin. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. febrero de 2011;29(2):79–84.
- [101] Muñoz-Egea MC, García-Pedrazuela M, Mahillo-Fernandez I, Esteban J. Effect of antibiotics and antibiofilm agents in the ultrastructure and development of biofilms developed by nonpigmented rapidly growing mycobacteria. *Microb Drug Resist Larchmt N*. enero de 2016;22(1):1–6.
- [102] Muñoz Egea MC, Ji P, Pruden A, Falkinham Iii JO. Inhibition of adherence of *Mycobacterium avium* to plumbing surface biofilms of *Methylobacterium* spp. *Pathog Basel Switz*. 14 de septiembre de 2017;6(3):E42.
- [103] García-Coca M, Rodríguez-Sevilla G, Pérez-Domingo A, Aguilera-Correa JJ, Esteban J, Muñoz-Egea MC. Inhibition of *Mycobacterium abscessus*, *M. chelonae*, and *M. Fortuitum* biofilms by *Methylobacterium* sp. *J antibiot tokyo*. enero de 2020;73(1):40–7.
- [104] Pradal I, Esteban J, Mediero A, García-Coca M, Aguilera-Correa JJ. Contact effect of a *Methylobacterium* sp. extract on biofilm of a *Mycobacterium chimaera* strain isolated from a 3T heater-cooler system. *Antibiot Basel Switz*. 3 de agosto de 2020;9(8):E474.
- [105] Slavin YN, Ivanova K, Tang WL, Tzanov T, Li SD, Bach H. Targeting intracellular mycobacteria using nanosized niosomes loaded with antibacterial agents. *Nanomater Basel Switz*. 1 de agosto de 2021;11(8). 1984.
- [106] Senhaji-Kacha A, Esteban J, García-Quintanilla M. Considerations for phage therapy against *Mycobacterium abscessus*. *Front Microbiol* 2020;11:609017.
- [107] Gordillo-Galeano A, Ospina-Giraldo LF, Mora-Huertas CE. Lipid nanoparticles with improved biopharmaceutical attributes for tuberculosis treatment. *Int J Pharm*. 1 de marzo de 2021;596:120321.
- [108] Broncano-Lavado A, Senhaji-Kacha A, Santamaría-Corral G, Esteban J, García-Quintanilla M. Alternatives to antibiotics against *Mycobacterium abscessus*. *Antibiotics*. octubre de 2022;11(10):1322.
- [109] Little JS, Dedrick RM, Freeman KG, Cristinziano M, Smith BE, Benson CA, et al. Bacteriophage treatment of disseminated cutaneous *Mycobacterium chelonae* infection. *Nat Commun*. 3 de mayo de 2022;13(1):2313.
- [110] Caimmi D, Martoç N, Trioleyre D, Guinet C, Godreuil S, Daniel T, et al. Positive effect of liposomal amikacin for inhalation on *Mycobacterium abscessus* in cystic fibrosis patients. *Open Forum Infect Dis*. marzo de 2018;5(3):ofy034.
- [111] Griffith DE, Eagle G, Thomson R, Aksamit TR, Hasegawa N, Morimoto K, et al. Amikacin liposome inhalation suspension for treatment-refractory lung disease caused by *Mycobacterium avium* complex (convert). A prospective, open-label, randomized study. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 de diciembre de 2018;198(12):1559–69.
- [112] Nessar R, Cambau E, Reytrat JM, Murray A, Gicquel B. *Mycobacterium abscessus*: a new antibiotic nightmare. *J Antimicrob Chemother*. abril de 2012;67(4):810–8.