

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
Departamento de Medicina



**TESIS DOCTORAL**

**Micobacterias no pigmentadas de crecimiento rápido:  
evaluación de la patogenia de diferentes morfologías de  
colonia y nuevas estrategias para el tratamiento de  
biopelículas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Marta García Coca**

Directores

**Jaime Esteban Moreno**  
**María del Carmen Muñoz Egea**  
**María Luisa Gómez-Lus Centelles**

Madrid  
Ed. electrónica 2019

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**



**MICOBACTERIAS NO PIGMENTADAS DE  
CRECIMIENTO RÁPIDO: EVALUACIÓN DE LA  
PATOGENIA DE DIFERENTES MORFOLOGÍAS DE  
COLONIA Y NUEVAS ESTRATEGIAS PARA EL  
TRATAMIENTO DE BIOPELÍCULAS**

**TESIS DOCTORAL**

**Autora**

Marta García Coca

**Directores**

Dr. Jaime Esteban Moreno

Dra. María del Carmen Muñoz Egea

Dra. María Luisa Gómez-Lus Centelles

**Tutora**

María Dolores Folgueira López

Madrid, 2019



**MICOBACTERIAS NO PIGMENTADAS  
DE CRECIMIENTO RÁPIDO:  
EVALUACIÓN DE LA PATOGENIA DE  
DIFERENTES MORFOLOGÍAS DE  
COLONIA Y NUEVAS ESTRATEGIAS  
PARA EL TRATAMIENTO DE  
BIOPELÍCULAS**

Tesis Doctoral presentada por:

**MARTA GARCÍA COCA**

Directores de la Tesis:

**Dr. JAIME ESTEBAN MORENO**

**Dra. MARÍA DEL CARMEN MUÑOZ EGEA**

**Dra. MARÍA LUISA GÓMEZ-LUS CENTELLES**

**Universidad Complutense de Madrid**

**Facultad de Medicina**

**Departamento de Medicina**

**Doctorado en Investigación en Ciencias Médico-Quirúrgicas**



## AGRADECIMIENTOS

Una vez alcanzada esta meta, me gustaría hacer partícipes de este logro a todas las personas que han contribuido, de una manera u otra, a que haya podido llegar a conseguirlo.

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a mis directores de tesis. A Jaime Esteban por su tiempo, su dedicación, sus consejos, por transmitirme la ilusión por la investigación y por poner este proyecto en mis manos. A María del Carmen Muñoz Egea, por ayudarme a recorrer este camino y por su rapidez y disponibilidad para contestar mis dudas. A M.<sup>a</sup> Luisa Gómez-Lus, por darme la oportunidad de llevar a cabo este trabajo bajo su dirección y por haberme guiado en esta etapa. También a mi tutora M.<sup>a</sup> Dolores Folgueira por toda su colaboración.

El desarrollo de esta tesis doctoral está conectado con mi etapa como residente en la Fundación Jiménez Díaz. Por tanto, todo el personal del laboratorio de Microbiología y Parasitología ha influido de manera muy positiva en ella. Gracias a todos por hacerme crecer profesionalmente y descubrir la Microbiología como mi vocación. Quiero agradecer a Ignacio Gadea su gran capacidad de enseñanza, de despertar mi curiosidad microbiológica y su tiempo para resolver todas mis dudas aún con sus múltiples ocupaciones. A Ricardo Fernández Roblas, por guiarme desde mis primeros pasos como residente de primer año hasta sus valiosos consejos al final de la residencia. A Javier Zapardiel, por todas las guardias compartidas. A Concepción Pérez-Jorge, por su dedicación como tutora y por enseñarme lo importantes que son la constancia y el esfuerzo. Y, cómo no, a mis compañeras de residencia, por haber compartido el día a día y por su amistad. Gracias a mis residentes mayores (Marta, Iris, Laura y Chela) por

acogerme extraordinariamente desde mis primeros días, por todo lo que he aprendido de ellas y por haber disfrutado muchos momentos juntas (tanto dentro como fuera del laboratorio), junto con Cuca, Moncho y María. A mis residentes pequeñas (Alicia y Llanos) por haberme permitido transmitirles lo que yo iba aprendiendo y por los buenos momentos. A John, por su gran ayuda y paciencia, por encontrar siempre soluciones y por enseñarme a ver que las cosas no son tan complicadas si se miran de la manera adecuada. A David, por nuestros inicios juntos en el mundo de la *Galleria mellonella*. A todos los técnicos de laboratorio del Departamento, porque de todos ellos he aprendido. Y también a Curra, por sus enseñanzas de microscopía confocal y sus consejos.

Uno de los experimentos de esta tesis ha sido posible gracias a mi estancia en la Clínica Universidad de Navarra, en Pamplona. Me gustaría agradecer a José Luis del Pozo la oportunidad de pasar un mes en el Servicio de Microbiología y tanto a él como a todo el Servicio la gran acogida desde el primer día, haciéndome sentir como una más. Gracias a Gabi, a Mirian y a José Leiva todas sus enseñanzas sobre cultivo celular; y a Arantxa todo el tiempo invertido en colaborar en mis experimentos. Fue un mes muy productivo gracias a la contribución de todos ellos y descubrir el encanto de Pamplona no tuvo precio. Gracias también a la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica por la beca concedida para realizar esta estancia.

En la parte familiar, tienen un papel muy importante mis padres. Gracias por vivir mis años de residencia y doctorado con mi misma ilusión, por apoyarme y por guiarme desde pequeña. Sin su cariño, implicación y consejos, no habría llegado hasta aquí. También a mis abuelos, que, aunque no pueden vivir este momento, me enseñaron los valores del trabajo y el esfuerzo que tan útiles me han sido estos años.

Gracias a Alex, por seguir paso a paso mis progresos, por confiar en mí y hacer así que yo ganara confianza en mí misma, por la ayuda incondicional y por la implicación en mis proyectos. Gracias por el camino recorrido y por el que nos queda por recorrer.

A mis amigos (del colegio, de la Universidad y de Casla), gracias por ir creciendo juntos, por la confianza y por estar siempre.

Todos formáis parte de este trabajo, ¡gracias!



## ÍNDICE

RESUMEN .....	1
ABSTRACT.....	13
1.INTRODUCCIÓN .....	25
1.1. Género <i>Mycobacterium</i> .....	27
1.1.1. Pared celular de las micobacterias.....	28
1.2. Clasificación de micobacterias .....	30
1.3. Micobacterias no pigmentadas de crecimiento rápido (MNPCR) .....	32
1.3.1. Epidemiología.....	32
1.3.2. Patogenia.....	34
1.3.3. Morfología de colonia y patogenicidad .....	37
1.3.4. Diagnóstico .....	38
1.3.4.1. Diagnóstico microbiológico .....	38
1.3.4.2. Diagnóstico histopatológico.....	40
1.3.4.3. Diagnóstico por imagen .....	41
1.3.4.4. Criterios ATS/IDSA.....	41
1.3.4.5. Otras pruebas diagnósticas.....	43
1.3.5. Sensibilidad <i>in vitro</i> y tratamiento.....	44
1.4. Biopelículas.....	46
1.4.1. Biopelículas micobacterianas. ....	50
1.5. <i>Methylobacterium spp.</i> .....	52
1.5.1. <i>Methylobacterium spp.</i> y su relación con las micobacterias.....	53
2.HIPÓTESIS.....	55
3.OBJETIVOS .....	59
4.MATERIAL Y MÉTODOS.....	63
4.1. Evaluación de la patogenia de <i>M. abscessus</i> , <i>M. chelonae</i> y <i>M. fortuitum</i> según la morfología de colonia lisa/ rugosa.....	65
4.1.1. Modelo <i>in vitro</i> por fagocitosis en macrófagos. ....	66
4.1.2. Modelo <i>in vivo</i> con larvas de <i>Galleria mellonella</i> .....	67
4.2. Evaluación del efecto de <i>Methylobacterium sp.</i> sobre biopelículas de <i>M.</i> <i>abscessus</i> , <i>M. chelonae</i> y <i>M. fortuitum</i> .....	69
4.2.1. Evaluación mediante microscopía confocal láser de barrido.....	70

4.2.2. Evaluación mediante recuento bacteriano utilizando el método de Calgary modificado.....	73
4.3. Evaluación del efecto de <i>Methylobacterium sp.</i> combinado con claritromicina sobre biopelículas de <i>M. abscessus</i> , <i>M. chelonae</i> y <i>M. fortuitum</i> .....	76
4.3.1. Evaluación mediante microscopía confocal láser de barrido.....	77
4.3.2. Evaluación mediante recuento bacteriano utilizando el método de Calgary modificado.....	77
5.RESULTADOS.....	79
5.1. Evaluación de la patogenicidad de <i>M. abscessus</i> , <i>M. chelonae</i> y <i>M. fortuitum</i> según la morfología de colonia lisa/ rugosa.....	81
5.1.1. Modelo <i>in vitro</i> por fagocitosis en macrófagos. ....	81
5.1.2. Modelo <i>in vivo</i> con larvas de <i>Galleria mellonella</i> .....	83
5.2. Evaluación del efecto de <i>Methylobacterium sp.</i> sobre biopelículas de <i>M. abscessus</i> , <i>M. chelonae</i> y <i>M. fortuitum</i> .....	87
5.2.1. Evaluación mediante microscopía confocal láser de barrido.....	87
5.2.1.1. Efecto de <i>Methylobacterium sp.</i> sobre biopelículas de <i>M. abscessus</i> .....	87
5.2.1.2. Efecto de <i>Methylobacterium sp.</i> sobre biopelículas de <i>M. chelonae</i> .....	92
5.2.1.3. Efecto de <i>Methylobacterium sp.</i> sobre biopelículas de <i>M. fortuitum</i> .....	97
5.2.2. Evaluación mediante recuento bacteriano utilizando el método de Calgary modificado.....	100
5.3. Evaluación del efecto de <i>Methylobacterium sp.</i> combinado con claritromicina sobre biopelículas de <i>M. abscessus</i> , <i>M. chelonae</i> y <i>M. fortuitum</i> .....	104
5.3.1. Evaluación mediante microscopía confocal láser de barrido.....	104
5.3.1.1. Efecto de <i>Methylobacterium sp.</i> combinado con claritromicina sobre biopelículas de <i>M. abscessus</i> .....	104
5.3.1.2. Efecto de <i>Methylobacterium sp.</i> combinado con claritromicina sobre biopelículas de <i>M. chelonae</i> .....	107
5.3.1.3. Efecto de <i>Methylobacterium sp.</i> combinado con claritromicina sobre biopelículas de <i>M. fortuitum</i> .....	110

5.3.2. Evaluación mediante recuento bacteriano utilizando el método de Calgary modificado.....	114
6.DISCUSIÓN .....	119
6.1. Evaluación de la patogenia de <i>M. abscessus</i> , <i>M. chelonae</i> y <i>M. fortuitum</i> según la morfología de colonia lisa/ rugosa.....	121
6.2. Evaluación del efecto de <i>Methylobacterium sp.</i> sobre biopelículas de <i>M. abscessus</i> , <i>M. chelonae</i> y <i>M. fortuitum</i> .....	124
6.3. Evaluación del efecto de <i>Methylobacterium sp.</i> combinado con claritromicina sobre biopelículas de <i>M. abscessus</i> , <i>M. chelonae</i> y <i>M. fortuitum</i> .....	129
7.CONCLUSIONES .....	133
8.BIBLIOGRAFÍA .....	139
9.ANEXOS .....	165



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la estructura de la pared celular micobacteriana.....	29
Figura 2. Colonias de <i>M. abscessus</i> con morfología lisa (A) y con morfología rugosa (B).....	37
Figura 3. Tinciones específicas para micobacterias: Ziehl-Neelsen (A) y auramina-rodamina (B).....	38
Figura 4. Sistema GenoType basado en la hibridación mediante sonda de cada especie micobacteriana.....	40
Figura 5. Detalle histopatológico de foliculitis por micobacterias.....	41
Figura 6. Etapas de formación de una biopelícula.....	48
Figura 7. Biopelícula de <i>M. abscessus</i> de 96 horas teñida con Nile Red®.....	50
Figura 8. Cultivo de <i>Methylobacterium sp.</i> en agar R2A. ....	53
Figura 9. Esquema del procedimiento para la evaluación de la patogenicidad de MNPCR en macrófagos.....	67
Figura 10. Larvas de <i>G. mellonella</i> (A). Inyección en propodio (B). ....	69
Figura 11. Esquema del procedimiento para el estudio del efecto de <i>Methylobacterium sp.</i> sobre biopelículas de MNPCR mediante microscopía confocal láser de barrido. ....	71
Figura 12. Detalle de placa de 96 pocillos con proyecciones (MBEC™Biofilm Inoculator) utilizada en el método de Calgary.....	74
Figura 13. Esquema del procedimiento para el estudio del efecto de <i>Methylobacterium sp.</i> sobre biopelículas de MNPCR mediante método de Calgary modificado (parte 1). 75	
Figura 14. Esquema del procedimiento para el estudio del efecto de <i>Methylobacterium sp.</i> sobre biopelículas de MNPCR mediante método de Calgary modificado (parte 2). 76	
Figura 15. Representación del recuento de colonias (expresado en log UFC/10 <sup>4</sup> células) de micobacterias fagocitadas por los macrófagos J-774A.1.....	81
Figura 16. Tinción de Ziehl-Neelsen de un macrófago con micobacterias fagocitadas. 82	
Figura 17. Porcentaje de supervivencia, puntuación de actividad, puntuación de melanización y puntuación de formación de pupa de larvas de <i>Galleria mellonella</i> sometidas a infección con <i>M. abscessus</i> , <i>M. chelonae</i> y <i>M. fortuitum</i> .....	86
Figura 18. Efecto de <i>Methylobacterium sp.</i> (vivo, autoclavado y un extracto obtenido por sonicación) en diferentes parámetros de la biopelícula de <i>M. abscessus</i> .....	88

Figura 19. Efecto de <i>Methylobacterium</i> sp. en diferentes tiempos sobre biopelículas de <i>M. abscessus</i> usando <i>Methylobacterium</i> sp. vivo, autoclavado y un extracto de <i>Methylobacterium</i> sp (Tinción Nile Red®).....	90
Figura 20. Efecto de <i>Methylobacterium</i> sp. (autoclavado y extracto) en diferentes parámetros de la biopelícula de <i>M. chelonae</i> . .....	93
Figura 21. Efecto de <i>Methylobacterium</i> sp. en diferentes tiempos sobre biopelículas de <i>M. chelonae</i> usando <i>Methylobacterium</i> sp. autoclavado y extracto bacteriano. (Tinción Nile Red®). .....	94
Figura 22. Biopelícula de <i>M. chelonae</i> tratada con extracto de <i>Methylobacterium</i> sp. durante 72 horas. Tinción Live/Dead BacLight®. ....	94
Figura 23. Efecto de <i>Methylobacterium</i> sp. (autoclavado y extracto) en diferentes parámetros de la biopelícula de <i>M. fortuitum</i> .....	97
Figura 24. Efecto de <i>Methylobacterium</i> sp. en diferentes tiempos sobre biopelículas de <i>M. fortuitum</i> usando <i>Methylobacterium</i> sp. autoclavado y extracto bacteriano. (Tinción Nile Red®). .....	98
Figura 25. Efecto de <i>Methylobacterium</i> sp. autoclavado y extracto en el recuento expresado en log UFC/proyección de la placa con el objetivo de analizar la biopelícula de <i>M. abscessus</i> , <i>M. chelonae</i> y <i>M.fortuitum</i> .....	101
Figura 26. Efecto de <i>Methylobacterium</i> sp. (autoclavado y extracto) y la combinación de estos con claritromicina en el espesor de la biopelícula de <i>M. abscessus</i> . ....	104
Figura 27. Efecto de <i>Methylobacterium</i> sp. (autoclavado y extracto) y la combinación de estos con claritromicina en la superficie cubierta de la biopelícula de <i>M. abscessus</i> . .	105
Figura 28. Efecto de <i>Methylobacterium</i> sp. (autoclavado y extracto) y la combinación de estos con claritromicina en la autofluorescencia de la biopelícula de <i>M. abscessus</i> ....	106
Figura 29. Efecto de <i>Methylobacterium</i> sp. (autoclavado y extracto) y la combinación de estos con claritromicina en el número de micobacterias muertas de la biopelícula de <i>M. abscessus</i> . .....	106
Figura 30. Efecto de <i>Methylobacterium</i> sp. (autoclavado y extracto) y la combinación de estos con claritromicina en el espesor de la biopelícula de <i>M. chelonae</i> . ....	108
Figura 31. Efecto de <i>Methylobacterium</i> sp. (autoclavado y extracto) y la combinación de estos con claritromicina en la superficie cubierta de la biopelícula de <i>M. chelonae</i> ....	108
Figura 32. Efecto de <i>Methylobacterium</i> sp. (autoclavado y extracto) y la combinación de estos con claritromicina en la autofluorescencia de la biopelícula de <i>M. chelonae</i> . ....	109

Figura 33. Efecto de <i>Methylobacterium sp.</i> (autoclavado y extracto) y la combinación de estos con claritromicina en el número de micobacterias muertas de la biopelícula de <i>M. chelonae</i> .....	109
Figura 34. Efecto de <i>Methylobacterium sp.</i> (autoclavado y extracto) y la combinación de estos con claritromicina en el espesor de la biopelícula de <i>M. fortuitum</i> .....	111
Figura 35. Efecto de <i>Methylobacterium sp.</i> (autoclavado y extracto) y la combinación de estos con claritromicina en la superficie cubierta de la biopelícula de <i>M. fortuitum</i> ..	111
Figura 36. Efecto de <i>Methylobacterium sp.</i> (autoclavado y extracto) y la combinación de estos con claritromicina en la autofluorescencia de la biopelícula de <i>M. fortuitum</i> ....	112
Figura 37. Efecto de <i>Methylobacterium sp.</i> (autoclavado y extracto) y la combinación de estos con claritromicina en el número de micobacterias muertas de la biopelícula de <i>M. fortuitum</i> .....	113
Figura 38. Diferentes biopelículas vistas con Tinción Live/Dead BacLight©. A: Biopelícula de <i>M. abscessus</i> tratada con <i>Methylobacterium sp.</i> autoclavado y claritromicina 72 horas; B: biopelícula de <i>M. chelonae</i> tratada con extracto de <i>Methylobacterium sp.</i> y claritromicina 72 horas; C: biopelícula de <i>M. fortuitum</i> tratada con <i>Methylobacterium sp.</i> autoclavado y claritromicina 72 horas.....	113
Figura 39. Efecto de <i>Methylobacterium sp.</i> (autoclavado y extracto) y la combinación de estos con claritromicina en el recuento log UFC/ proyección en las biopelículas de <i>M. abscessus</i> .....	115
Figura 40. Efecto de <i>Methylobacterium sp.</i> (autoclavado y extracto) y la combinación de estos con claritromicina en el recuento log UFC/ proyección en las biopelículas de <i>M. chelonae</i> .....	116
Figura 41. Efecto de <i>Methylobacterium sp.</i> (autoclavado y extracto) y la combinación de estos con claritromicina en el recuento log UFC/ proyección en las biopelículas de <i>M. fortuitum</i> .....	116



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de micobacterias de Runyon.....	31
Tabla 2. Micobacterias utilizadas en los experimentos de evaluación de la patogenicidad de <i>M. abscessus</i> , <i>M. chelonae</i> y <i>M. fortuitum</i> según la morfología de colonia.....	65
Tabla 3. Espectros de excitación y emisión empleados en el CLSM. ....	72
Tabla 4. Health Index Scoring System para la evaluación de larvas de <i>Galleria mellonella</i> . ....	86
Tabla 5. Valores p obtenidos de las comparaciones a diferentes tiempos de los parámetros de las biopelículas de <i>M. abscessus</i> expuestas a las diferentes formas de <i>Methylobacterium sp.</i> ....	89
Tabla 6. Valores p obtenidos para cada uno de los parámetros de las biopelículas de <i>M. abscessus</i> de la comparación a la exposición a diferentes formas de <i>Methylobacterium sp.</i> a diferentes tiempos. ....	91
Tabla 7. Valores p obtenidos de las comparaciones a diferentes tiempos de los parámetros de las biopelículas de <i>M. chelonae</i> expuestas a las diferentes formas de <i>Methylobacterium sp.</i> ....	95
Tabla 8. Valores p obtenidos para cada uno de los parámetros de las biopelículas de <i>M. chelonae</i> de la comparación a la exposición a diferentes formas de <i>Methylobacterium sp.</i> a diferentes tiempos.. ....	96
Tabla 9. Valores p obtenidos de las comparaciones a diferentes tiempos de los parámetros de las biopelículas de <i>M. fortuitum</i> expuestas a las diferentes formas de <i>Methylobacterium sp.</i> ....	99
Tabla 10. Valores p obtenidos para cada uno de los parámetros de las biopelículas de <i>M. fortuitum</i> de la comparación a la exposición a diferentes formas de <i>Methylobacterium sp.</i> a diferentes tiempos.. ....	100
Tabla 11. Valores p obtenidos de las comparaciones entre los diferentes tiempos de exposición de las biopelículas de MNPCR a formas de <i>Methylobacterium sp.</i> .....	102
Tabla 12. Valores p obtenidos de la exposición a diferentes formas de <i>Methylobacterium sp.</i> a diferentes tiempos.. ....	103
Tabla 13. Valores p obtenidos de las comparaciones entre la exposición de las biopelículas de <i>M. abscessus</i> a <i>Methylobacterium sp.</i> autoclavado y extracto con y sin claritromicina.....	107

Tabla 14. Valores p obtenidos de las comparaciones entre la exposición de las biopelículas de <i>M. chelonae</i> a <i>Methylobacterium sp</i> autoclavado y extracto con y sin claritromicina.....	110
Tabla 15. Valores p obtenidos de las comparaciones entre la exposición de las biopelículas de <i>M. fortuitum</i> a <i>Methylobacterium sp</i> autoclavado y extracto con y sin claritromicina.....	114
Tabla 16. Valores p obtenidos de las comparaciones entre la exposición de las biopelículas de <i>M. abscessus</i> , <i>M. chelonae</i> y <i>M. fortuitum</i> a <i>Methylobacterium sp</i> . autoclavado y extracto con y sin claritromicina.....	117

## **ABREVIATURAS**

MNT: Micobacterias no tuberculosas.

MNPCR: Micobacterias de crecimiento rápido.

IFN: Interferón.

GPL: Glucopeptidolipido.

ATS/IDSA: American Thoracic Society/Infections Diseases Society of America.

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute.

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria.

McF: MacFarland.

UFC: Unidades Formadoras de Colonias.

MCLB: Microscopía Confocal Láser de Barrido.



# **RESUMEN**



## INTRODUCCIÓN

Las micobacterias no tuberculosas (MNT) son un grupo de patógenos oportunistas cada vez más reconocidos como causa de infección[1]. Son, también, organismos ambientales que se encuentran en diferentes ecosistemas sin implicaciones en la salud pública[2]. Las infecciones causadas por MNT son un fenómeno emergente, principalmente en la última década[3]. Se ha observado una creciente importancia de las infecciones causadas por estos organismos, tanto localizadas como diseminadas, incluyendo también brotes y pseudo-brotes[4, 5]. Entre ellas, las micobacterias no pigmentadas de crecimiento rápido (MNPCR) son ubicuas en la naturaleza y están ampliamente distribuidas en el agua, el suelo y los animales[2, 6]. Las tres especies más importantes de este grupo, en cuanto a su relevancia clínica, son *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae* y *Mycobacterium fortuitum*[7]. *M. abscessus* es uno de los agentes causantes más frecuentes de enfermedad pulmonar por MNT, a menudo aislada en pacientes con enfermedades pulmonares crónicas subyacentes, como silicosis, fibrosis quística y bronquiectasias[8-10]. *M. chelonae* y *M. fortuitum* se aíslan frecuentemente en infecciones de piel y tejidos blandos[11, 12]. Sin embargo, todos estos organismos pueden aislarse de otras muestras clínicas diferentes como causa de muchos tipos de infección.

Las MNPCR tienen fenotipos de colonias rugosas y lisas cuando se cultivan *in vitro*. Varios estudios han encontrado una correlación significativa entre la morfología de colonia y la virulencia, siendo las variantes de colonia rugosa más virulentas que las de colonia lisa[13, 14]. Se ha relacionado el fenotipo de colonia con la cantidad de glucopeptidolípidos (GPL) de la pared celular, teniendo las variantes de colonia lisa mayor cantidad de GPL y una mayor capacidad para formar biopelículas; sin embargo, una menor capacidad para internalizarse en células eucariotas[15, 16]. Por otro lado, las

## Resumen

variantes de colonia rugosa expresan una cantidad mínima de GPL, siendo más invasivas que las cepas de colonia lisa pero incapaces de formar biopelículas[14, 17].

Muchas MNPCR pueden formar biopelículas y este hecho otorga a estos microorganismos ventajas sobre la forma planctónica de crecimiento, como la resistencia a las agresiones ambientales y el aumento de la resistencia a desinfectantes y antibióticos[18, 19]. Se cree que la mayoría de las infecciones por MNPCR son causadas por bacterias presentes en el ambiente (especialmente en los sistemas de suministro de agua), donde se pueden encontrar formando biopelículas polimicrobianas con otras especies como *Mycobacterium avium*[20-22]. Otro habitante de estos sistemas de suministro de agua es *Methylobacterium sp.*[23, 24]. En un estudio realizado en Estados Unidos, que analizó las biopelículas presentes en las duchas de diferentes ciudades, los autores detectaron que la presencia de *Methylobacterium spp.* en las biopelículas se asociaba con la ausencia de *Mycobacterium spp.* y viceversa[25, 26].

## OBJETIVOS

- Evaluar la capacidad invasiva y la virulencia de *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum* según su fenotipo de colonia liso o rugoso, utilizando un modelo celular con macrófagos y un modelo experimental con larvas de *Galleria mellonella*.
- Determinar el efecto de *Methylobacterium sp.* en la estructura de biopelículas de MNPCR, utilizando dos métodos: microscopía confocal láser de barrido (MCLB) y el método de Calgary, utilizando las placas *MBEC<sup>TM</sup> Biofilm Inoculator*.
- Determinar el efecto de *Methylobacterium sp.* combinado con claritromicina en la estructura de biopelículas de MNPCR, utilizando dos métodos: MCLB y el método de Calgary, utilizando las placas *MBEC<sup>TM</sup> Biofilm Inoculator*.

## MATERIAL Y MÉTODOS

- Evaluación de la capacidad invasiva y virulencia de *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum* según su fenotipo de colonia liso o rugoso.

Se desarrollaron dos modelos, *in vitro* e *in vivo*, para evaluar la diferente patogenicidad de cepas de variante de colonia lisa y rugosa. Se utilizaron cepas clínicas y de colección de *M. abscessus*, *M. fortuitum* y *M. chelonae*. En el modelo *in vitro*, se evaluó la patogenicidad de la cepa analizando la fagocitosis en macrófagos, y en el modelo *in vivo* se evaluó la supervivencia, la actividad, la formación de pupa y la melanización de larvas de *G. mellonella* infectadas.

- Evaluación del efecto de *Methylobacterium sp.* en la estructura de biopelículas de MNPCR.

*Methylobacterium sp.* fue añadido en tres formas diferentes (suspensión de bacteria viva, bacteria autoclavada y un extracto obtenido mediante sonicación) a diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas), a biopelículas preformadas de una cepa colección de *M. abscessus*. En biopelículas de cepas colección de *M. chelonae* y *M. fortuitum* se utilizaron las formas de *Methylobacterium sp.* autoclavado y extracto. Se utilizó un control de 96 horas para cada especie. Las biopelículas fueron analizadas mediante MCLB y mediante el método de Calgary utilizando las placas MBEC<sup>TM</sup> *Biofilm Inoculator*.

- Evaluación del efecto de *Methylobacterium sp.* combinado con claritromicina en la estructura de biopelículas de MNPCR.

*Methylobacterium sp.* fue combinado con claritromicina (2 mg/L) y se siguió el mismo protocolo descrito en el experimento anterior.

## RESULTADOS

- Evaluación de la capacidad invasiva y virulencia de *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum* según su fenotipo de colonia liso o rugoso.

En el modelo *in vitro* (macrófagos), la fagocitosis fue mayor en cepas de colonia rugosa de *M. abscessus* y *M. fortuitum* en comparación con cepas de colonia lisa. Sin embargo, no se encontraron diferencias cuando se estudiaron cepas de *M. chelonae*.

La supervivencia de larvas de *G. mellonella* en el modelo experimental fue menor en aquellos insectos infectados con cepas de colonia rugosa de *M. abscessus* y *M. fortuitum* en comparación con las larvas infectadas con cepas de colonia lisa. No se encontraron diferencias en las larvas infectadas con diferentes fenotipos de colonia de *M. chelonae*.

- Evaluación del efecto de *Methylobacterium sp.* en la estructura de biopelículas de MNPCR.

Se observó una reducción significativa en el espesor y la superficie cubierta en todas las biopelículas micobacterianas expuestas a todas las formas de *Methylobacterium sp.* En cuanto a la autofluorescencia, se detectó un aumento significativo en biopelículas de *M. abscessus* tras la exposición a *Methylobacterium sp.*, pero no en las demás especies de micobacterias. El porcentaje de micobacterias muertas aumentó significativamente en todas las biopelículas cuando se trataron con *Methylobacterium sp.* Los resultados obtenidos del recuento expresados en log UFC (Unidades Formadoras de Colonias) por proyección (presentes en las placas *MBEC<sup>TM</sup> Biofilm Inoculator*) mostraron una reducción significativa en el recuento en biopelículas de *M. chelonae* después del tratamiento con *Methylobacterium sp.* autoclavado y extracto, pero en biopelículas de *M. fortuitum* el recuento disminuyó únicamente con la forma

autoclavada. Las biopelículas de *M. abscessus* se redujeron significativamente en términos de recuento de colonias con la forma autoclavada a las 72 horas y con el extracto a las 24, 48 y 72 horas.

- Evaluación del efecto de *Methylobacterium sp.* combinado con claritromicina en la estructura de biopelículas de MNPCR.

El espesor de la biopelícula de *M. abscessus* fue reducido de forma significativa con la adición de claritromicina a *Methylobacterium sp.*; sin embargo, no fue reducido con esta combinación en biopelículas de *M. chelonae* y *M. fortuitum* (en todos los casos comparando con la utilización de *Methylobacterium sp.* sin antibiótico). Por otra parte, la superficie cubierta no fue menor en biopelículas de *M. abscessus* con la combinación de *Methylobacterium sp.* y claritromicina con respecto a *Methylobacterium sp.* sin antibiótico, pero si disminuyó significativamente en biopelículas de *M. chelonae* tras 24 y 48 horas de exposición y en biopelículas de *M. fortuitum* tras 24, 48 y 72 horas de exposición. El porcentaje de micobacterias muertas aumentó significativamente cuando la claritromicina fue añadida a *Methylobacterium sp.* (autoclavado y extracto) en biopelículas de *M. abscessus* y *M. chelonae*. En las biopelículas de *M. fortuitum* el incremento fue solo significativo con *Methylobacterium sp.* autoclavado combinado con claritromicina. El recuento basado en log UFC/proyección (placas *MBEC<sup>TM</sup> Biofilm Inoculator*) mostró que la única combinación efectiva en la disminución del recuento fue *Methylobacterium sp.* extracto combinado con claritromicina cuando se utilizó en biopelículas de *M. chelonae*, comparado con la utilización de *Methylobacterium sp.* sin antibiótico.

## DISCUSIÓN

- Evaluación de la capacidad invasiva y virulencia de *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum* según su fenotipo de colonia liso o rugoso.

Se han desarrollado pocos estudios sobre los factores de virulencia asociados con MNPCR y la mayoría de ellos se centran en *M. abscessus*[27]. En estos estudios, se han analizado diferentes factores de patogenicidad como hemolisina[28], fosfolipasa C[29] y GPL[30]. La fagocitosis y la capacidad de supervivencia intracelular también han sido estudiadas como factores de patogenicidad[31, 32]. Byrd y Lyons demostraron que el fenotipo de colonia rugoso de cepas de *M. abscessus* persiste y se multiplica en monocitos humanos, mientras que las variantes de colonia lisa experimentan una disminución en esta habilidad a los 5 días[14]. Roux y col. comprobaron que las cepas de colonia lisa eran capaces de restringir la acidificación intrafagosomal e inducían menos apoptosis[33]. Por el contrario, Esteban y col. evaluaron la capacidad invasiva de cepas de MNPCR mediante un ensayo en fibroblastos y no encontraron diferencias en cepas con fenotipo de colonia diferente[34]. En el estudio desarrollado en esta tesis, se demostró que la fagocitosis fue mayor con el fenotipo de colonia rugoso en *M. abscessus* y *M. fortuitum*, pero no se encontraron diferencias significativas entre las cepas de colonia lisa y rugosa en *M. chelonae*. En cuanto a los experimentos *in vivo*, los modelos en ratón han sido los más utilizados para evaluar la patogenicidad[31], pero el uso de *G. mellonella* no requiere aprobación ética, las larvas sobreviven a 37°C y su corta vida útil las hace ideales para estos estudios[35]. Estas larvas tienen una respuesta inmune celular innata, por lo que son adecuadas para el estudio de la infección por micobacterias[36]. Los resultados *in vivo* del estudio descrito en esta tesis se correlacionan con el modelo celular previamente descrito. Las larvas infectadas con el fenotipo de colonia rugoso de *M.*

*abscessus* y *M. fortuitum* tuvieron una tasa de supervivencia más baja que las infectadas con la variante de colonia lisa. No se observaron diferencias en la infección por *M. chelonae*.

- Evaluación del efecto de *Methylobacterium sp.* en la estructura de biopelículas de MNPCR.

A pesar de que la presencia de *Methylobacterium sp.* ha sido relacionada con la ausencia de *Mycobacterium sp.* en entornos ambientales[37], y se ha desarrollado un estudio *in vitro* con *M. avium*[26], no se han realizado estudios *in vitro* para evaluar este efecto en MNPCR. El estudio expuesto en esta tesis muestra que *Methylobacterium sp.* puede inhibir la formación de biopelículas de *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum* en dos modelos *in vitro*. Además, se demuestra que la presencia de la forma viva de *Methylobacterium sp.* no es necesaria para inhibir la formación de biopelículas de *M. abscessus*; por lo que, con *M. chelonae* y *M. fortuitum* se continuó el estudio con la forma autoclavada y el extracto. En las biopelículas de *M. chelonae* se observa una mayor reducción en el espesor y en la superficie cubierta que en *M. abscessus* y *M. fortuitum*. Aunque el porcentaje de micobacterias muertas no fue superior al 10%, la diferencia fue estadísticamente significativa con respecto al control en las tres especies. Con respecto a la autofluorescencia, la capacidad de las MNPCR para emitir autofluorescencia azul ha sido previamente descrita[38]. Las coenzimas H429 y FO han sido señaladas como posibles responsables [39]. La presencia de fluorescencia extracelular podría ser una consecuencia de la liberación de estas moléculas a medida que las células mueren en el proceso de formación de biopelícula[38]. Esto podría explicar el aumento de fluorescencia extracelular cuando las biopelículas de *M. abscessus* fueron expuestas a las diferentes formas de

## Resumen

*Methylobacterium sp.*; sin embargo, este efecto no se observó en biopelículas de *M. chelonae* ni *M. fortuitum*. Con respecto al experimento realizado utilizando el método de Calgary modificado usando las placas MBEC™ *Biofilm Inoculator* se observó que el mayor descenso en el recuento tuvo lugar en las biopelículas de *M. chelonae* después del tratamiento con ambas formas de *Methylobacterium sp.* Este hecho está perfectamente relacionado con el experimento anterior (MCLB) en el cual la máxima reducción de la superficie cubierta y el espesor fue observada en biopelículas de *M. chelonae*. El efecto de *Methylobacterium sp.* en las biopelículas de micobacterias podría ser una consecuencia de la interrupción del *quorum sensing* micobacteriano por un compuesto presente en *Methylobacterium sp.* ya que este tipo de interacción ha sido descrito para otras especies[26].

### - Evaluación del efecto de *Methylobacterium sp.* combinado con claritromicina en la estructura de biopelículas de MNPCR.

La claritromicina tiene buena eficacia frente a MNPCR, excepto frente a *M. fortuitum* en la mayoría de los casos[40]. La formación de biopelículas implica un aumento de la resistencia frente a antibióticos y desinfectantes, siendo un factor de patogenicidad clave[41, 42]. Es constante la búsqueda de nuevas sustancias “antibiopelícula”, como péptidos antimicrobianos[43], sustancias provenientes de la naturaleza[44] o compuestos químicos[45]. El objetivo de este experimento fue comprobar si la combinación de *Methylobacterium sp.* con claritromicina tendría algún efecto sinérgico y si la reducción de la biopelícula sería mayor que solo con *Methylobacterium sp.* El parámetro en el que hubo más diferencia al añadir claritromicina respecto a *Methylobacterium sp.* sin antibiótico fue el porcentaje de micobacterias muertas. Este porcentaje aumentó significativamente en las biopelículas

de *M. abscessus* y *M. chelonae*, tanto al combinar el antibiótico con la forma autoclavada como con el extracto de *Methylobacterium sp.* En las biopelículas de *M. fortuitum* el aumento de micobacterias muertas al añadir claritromicina solo tuvo lugar cuando la forma autoclavada de *Methylobacterium sp.* estaba presente. En el experimento realizado utilizando el método de Calgary modificado usando las placas MBEC™ *Biofilm Inoculator* el recuento de colonias no se vio demasiado afectado por la adición de claritromicina. La única combinación eficaz sobre biopelículas de *M. chelonae* parece ser *Methylobacterium sp.* extracto con claritromicina. Por lo tanto, la adición de claritromicina no parece aportar demasiadas ventajas cuando se combina con *Methylobacterium sp.* Hay que tener en cuenta que la concentración de *Methylobacterium sp.* se redujo a la mitad en comparación con los experimentos anteriores al combinarlo con el antibiótico.

## CONCLUSIONES

La morfología de colonia de *M. abscessus* y *M. fortuitum* parece estar relacionada con la patogenicidad, ya que la fagocitosis en macrófagos y la mortalidad en larvas de *G. mellonella* fue mayor en cepas de colonia rugosa. Sin embargo, no hubo diferencias en cepas de colonia lisa y rugosa en *M. chelonae*.

*Methylobacterium sp.* es capaz de reducir significativamente el espesor y la superficie cubierta de biopelículas de *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum*, tanto la forma viva como una suspensión de *Methylobacterium sp.* autoclavado y un extracto obtenido por sonicación. El recuento de colonias de la biopelícula tras exposición a *Methylobacterium sp.* mostró que la biopelícula más reducida fue la de *M. chelonae*.

La combinación de *Methylobacterium sp.* con claritromicina no parece mostrar demasiada sinergia en la inhibición de biopelículas de MNPCR.



# **ABSTRACT**



## INTRODUCTION

Non-tuberculous mycobacteria (NTM) are a group of opportunistic pathogens that are increasingly recognized as cause of infection[1]. They are also environmental organisms that can be found in many different ecosystems without public health implications[2]. MNT infections are an emerging phenomenon, mainly in the last decade[3]. It has been observed an increasing importance of infections caused by these organisms, both localized and disseminated, including also outbreaks and pseudo-outbreaks[4, 5]. Among these, non-pigmented rapidly growing mycobacteria (NPRGM) are ubiquitous in nature and widely distributed in water, soil and animals[2, 6]. The three most important species of this group, regarding their clinical relevance, are *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium fortuitum*[7]. *M. abscessus* is one of the most frequently causative agents of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease, often isolated in patients with underlying chronic lung diseases, like old tuberculosis scars, silicosis, cystic fibrosis and bronchiectasis[8-10]. *M. chelonae* and *M. fortuitum* are frequently isolated in skin and soft tissue infections[11, 12]. Nevertheless, all these organisms can be isolated from other different clinical samples as cause of many types of infection.

NPRGM have rough and smooth colony phenotypes when cultured *in vitro*. Several studies have found a significative correlation between colony morphology and virulence, with rough variants being usually more virulent than those with a smooth colony morphology[13, 14]. Different authors have reported that colony phenotype is related to the amount of cell-wall glycopeptidolipids (GPL), with the smooth variants having a higher level of GPL and with a better ability to form biofilms, however they have a lower ability to cause eukaryotic cells invasion[15, 16]. On the other hand, rough colony

## Abstract

variants express a minimal amount of GPL, being more invasive than smooth variants but unable to form biofilms[14, 17].

NPRGM can form biofilms and it gives to these organisms many advantages over the planktonic form of growth, like resistance to environmental aggressions and increase resistance against disinfectants and antibiotics[18, 19]. Most of the NPRGM infections are believed to be caused by bacteria present in the environment (especially water supply systems), where they can be found forming polymicrobial biofilms with other species such as *Mycobacterium avium*[20-22]. Another inhabitant of these water supply systems is *Methylobacterium sp.*[23, 24]. Interestingly, in a study carried out in the United States, which analyzed the biofilms present in the showerheads in different cities, the authors report that the presence of *Methylobacterium spp.* in biofilms was associated with the absence of *Mycobacterium spp.* and the opposite[25, 26].

## OBJECTIVES

- Evaluate the invasive ability and virulence of *M. abscessus*, *M. chelonae*, and *M. fortuitum* smooth colony variant and rough colony variant phenotypes, using a macrophagic cell line and a *Galleria mellonella* larvae experimental model.
- Determine the effect of *Methylobacterium sp.* in the structure of NPRGM biofilms, using two methods: Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) and the Calgary biofilm device, using the plates *MBEC<sup>TM</sup> Biofilm Inoculator*.
- Determine the effect of *Methylobacterium sp.* combined with clarithromycin in the structure of NPRGM biofilms, using two methods: Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) and the Calgary biofilm device, using the plates *MBEC<sup>TM</sup> Biofilm Inoculator*.

## MATERIAL AND METHODS

- Evaluation of the invasive ability and virulence of *M. abscessus*, *M. chelonae*, and *M. fortuitum* smooth colony variant and rough colony variant phenotypes.

Two models were developed, *in vitro* and experimental, in order to assess the different pathogenicity of smooth colony variant and rough colony variant phenotypes. We used collection and clinical strains of *M. abscessus*, *M. fortuitum* and *M. chelonae*. In the *in vitro* model, we evaluated strain pathogenicity by analyzing phagocytosis in macrophages, and in the experimental model we evaluated larvae survival, activity, cocoon formation, and melanization of infected *G. mellonella* larvae.

- Evaluation of the effect of *Methylobacterium sp.* in the structure of NPRGM biofilms.

*Methylobacterium sp.* was added in three forms (as a suspension of living bacteria, autoclaved suspension and an extract obtained after sonication) at different times (24, 48 and 72 hours), to preformed biofilms of *M. abscessus*. In *M. chelonae* and *M. fortuitum* biofilms, *Methylobacterium sp.* was added as autoclaved suspension and extract. It was used a 96 hours control of each species. The biofilms were analysed by CLSM and by the Calgary biofilm device using the plates *MBEC<sup>TM</sup> Biofilm Inoculator*.

- Evaluation of the effect of *Methylobacterium sp.* combined with clarithromycin in the structure of NPRGM biofilms.

*Methylobacterium sp.* was combined with clarithromycin (2 mg/L) and the same protocol previous described was developed.

RESULTS

- Evaluation of the invasive ability and virulence of *M. abscessus*, *M. chelonae*, and *M. fortuitum* smooth colony variant and rough colony variant phenotypes.

On the *in vitro* model (macrophages), phagocytosis was higher for *M. abscessus* and *M. fortuitum* rough colony variants strains when compared to smooth colony variants.

However, we did not find differences when *M. chelonae* strains were studied.

Survival of *G. mellonella* larvae in the experimental model was lower for *M. abscessus* and *M. fortuitum* rough colony variants when compared with larvae infected with smooth colony variants. We did not find differences in larvae infected with *M. chelonae* smooth and rough colony variants

- Evaluation of the effect of *Methylobacterium sp.* in the structure of NPRGM biofilms.

A statistically significant reduction in the thickness and covered surface was observed in all mycobacterial biofilms with all forms of *Methylobacterium sp.*

A statistically significant increase in the autofluorescence was observed in *M. abscessus* biofilms but no in other biofilms. The percentage of dead mycobacteria was statistically significant increased in all cases. The log CFU (Colony Forming Units)/peg recount was statistically significant reduced in *M. chelonae* biofilms after treatment with autoclaved suspension and extract suspension, but in *M. fortuitum* biofilms the recount decreased only with autoclaved form. *M. abscessus* biofilms were always significantly reduced with autoclaved suspension at 72 hours and with extract form at 24, 48 and 72 hours.

- Evaluation of the effect of *Methylobacterium sp.* combined with clarithromycin in the structure of NPRGM biofilms.

Thickness was reduced significantly with the addition of clarithromycin to *Methylobacterium sp.* in *M. abscessus* biofilms; however, thickness was not reduced with this combination in *M. chelonae* and *M. fortuitum* biofilms with respect to *Methylobacterium sp.* without clarithromycin. On the other hand, covered surface was not reduced with the combination of *Methylobacterium sp.* and clarithromycin in *M. abscessus* biofilms, but the decrease was statistically significant in *M. chelonae* biofilms at 24 and 48 hours and in *M. fortuitum* biofilms at 24, 48 and 72 hours. The percentage of dead mycobacteria increases significantly when *M. abscessus* and *M. chelonae* biofilms were treated with the combination of *Methylobacterium sp.* (autoclaved and extract) with clarithromycin with respect to *Methylobacterium sp.* without clarithromycin. In *M. fortuitum* biofilms the increase was only significant with autoclaved *Methylobacterium sp.* combined with clarithromycin.

The log CFU/peg recount showed that the only effective combination was *Methylobacterium sp.* extract combined with clarithromycin in *M. chelonae* biofilms, since the count decreased significantly with respect to *Methylobacterium sp.* without antibiotic to all times.

## DISCUSSION

- Evaluation of the invasive ability and virulence of *M. abscessus*, *M. chelonae*, and *M. fortuitum* smooth colony variant and rough colony variant phenotypes.

There are few studies concerning virulence factors associated with NPRGM and most of them focus on *M. abscessus*[27]. In these studies, different pathogenic factors have been implicated such as hemolysin[28], phospholipase C[29] and

## Abstract

glycopeptidolipid[30]. Phagocytosis and intracellular survival of mycobacteria have been studied as pathogenicity factors too[31, 32]. Byrd and Lyons reported that the rough phenotype of *M. abscessus* persists and multiplies in human monocytes, while the smooth variant underwent a decrease in this ability after 5 days[14]. Roux et al. described that the smooth variants are able to restrict intraphagosomal acidification and induces less apoptosis[33]. By contrast, Esteban et al. evaluated the NPRGM strains invasive capacity by means of a fibroblast microcolony assay, failing to find differences between different phenotypes[34]. In our study, we have demonstrated that phagocytosis is higher for the rough phenotype of *M. abscessus* and *M. fortuitum*, but no differences were found between rough and smooth variants of *M. chelonae*. Regarding experimental models, the mouse model was the most widely used in order to evaluate pathogenicity[31], but the use of *G. mellonella* does not require ethical approval, the larvae of this organism can survive at 37°C and their short life span makes them ideal for research[35]. It has an innate cellular immune response, which makes it ideal for the study of mycobacterial infections[36]. The results of our *in vivo* study correlate well with the results of the cell model. Larvae infected with the rough morphotype of *M. abscessus* and *M. fortuitum* had a lower survival rate than those infected with the smooth colony variant, but no differences were observed in *M. chelonae* infection.

### - Evaluation of the effect of *Methylobacterium sp.* in the structure of NPRGM biofilms.

Even though the presence of *Methylobacterium sp.* has been previously related to the absence of *Mycobacterium sp.* in environmental settings[37], and a study was developed with *Mycobacterium avium*[26], no *in vitro* studies have been carried out trying to evaluate this effect in NPRGM. Our study found out that *Methylobacterium*

*sp.* can inhibit *M. abscessus*, *M. chelonae* and *M. fortuitum* biofilms formation in two *in vitro* models. In addition, we have demonstrated that the presence of a living form of *Methylobacterium sp.* is not necessary to inhibit the biofilm formation of *M. abscessus*; so, with *M. chelonae* and *M. fortuitum* biofilms, we continue the study only with the autoclaved and extract forms. In *M. chelonae* biofilms we can observe a higher reduction in thickness and covered surface parameters than *M. abscessus* and *M. fortuitum*. Although the percentage of dead mycobacteria was not higher than 10%, the difference was statistically significant with respect to the control in the three species. Regarding to the autofluorescence, the ability of NPRGM to emit blue autofluorescence has already been described[38]. H429 and FO coenzymes, involved in the electron transport in mycobacteria, have been pointed out as possibly responsables for this autofluorescence[39]. The presence of extracellular fluorescence could be a consequence of the release of these molecules as the cells die in the biofilm formation process[38]. It could also explain the increase in this extracellular fluorescence when *M. abscessus* biofilms were exposed to all the *Methylobacterium sp.* forms studied; however, this effect is not observed in *M. chelonae* and *M. fortuitum* biofilms. With respect to Calgary system using the MBEC™ *Biofilm Inoculator* plates, we can observe that the highest decrease in log CFU/peg was in *M. chelonae* biofilms after treatment with both forms of *Methylobacterium sp.* This fact is perfectly related with CLSM in which the maximum reduction of covered surface and thickness was seen in biofilms of *M. chelonae*. The effect of *Methylobacterium sp.* in mycobacterial biofilms could be a consequence of the disruption of mycobacterial quorum sensing by a compound present in *Methylobacterium sp.* since this type of interaction has been described for other species[26].

## Abstract

- Evaluation of the effect of *Methylobacterium sp.* combined with clarithromycin in the structure of NPRGM biofilms.

Clarithromycin has good efficacy against NPRGM, except against *M. fortuitum* in most cases[40]. Biofilms have been recognized as an important pathogenic factor in human infections and the ability to live in biofilms confers many advantages over the planktonic form of growth, including resistance to antibiotics[41, 42]. A lot of studies have been developed in order to discover “antibiofilm” agents, such as antimicrobial peptides[43], natural substances[44] or chemical compounds[45]. The aim of this experiment was to corroborate if the combination of *Methylobacterium sp.* and clarithromycin could have synergic effect on the mycobacteria biofilms compared with the effect with *Methylobacterium sp.* without antibiotic. The parameter in which there was more difference when adding clarithromycin to *Methylobacterium sp.* it was only the percentage of dead mycobacteria. This percentage increased significantly in the biofilms of *M. abscessus* and *M. chelonae*, both by combining the antibiotic with the autoclaved form and with the extract of *Methylobacterium sp.* In *M. fortuitum* biofilms the increase of dead mycobacteria only occurred when clarithromycin was added with autoclaved form of *Methylobacterium sp.* With respect to Calgary system using the MBEC™ *Biofilm Inoculator* plates, the log CFU/peg count was not too affected by the addition of clarithromycin. The only effective combination was *Methylobacterium sp.* extract with clarithromycin on *M. chelonae* biofilms, since it significantly decreased the count with respect to *Methylobacterium sp.* without antibiotic at all times. Therefore, the addition of clarithromycin does not seem to provide many advantages when combined with *Methylobacterium sp.* In this experiment, the *Methylobacterium sp.* concentration was reduced due to the combination with clarithromycin.

## CONCLUSIONS

Colony phenotype is related to virulence of the strains. On the *in vitro* model, phagocytosis was higher for *M. abscessus* and *M. fortuitum* rough colony variants strains when compared to smooth colony variants, and survival of *G. mellonella* larvae was lower for *M. abscessus* and *M. fortuitum* rough colony variants when compared with larvae infected with smooth colony variants. We did not find differences in larvae infected with *M. chelonae* smooth and rough colony variants.

*Methylobacterium sp.* can inhibit *M. abscessus*, *M. chelonae* and *M. fortuitum* biofilms formation in a living, autoclaved and extract forms. The maximum reduction in mycobacterial count after exposition to *Methylobacterium sp.* was seen in biofilms of *M. chelonae*.

The addition of clarithromycin does not seem to provide many advantages when combined with *Methylobacterium sp.* in biofilms reduction.



# **1. INTRODUCCIÓN**



## 1.1. Género *Mycobacterium*

El género *Mycobacterium* incluye actualmente más de 198 especies[46-48]. La mayoría son microorganismos ambientales que no están implicados en infecciones humanas; sin embargo, algunos se encuentran entre los patógenos humanos más antiguos descritos. La bacteria causante de la tuberculosis fue descrita por primera vez por Robert Koch en 1882[49] y la enfermedad tuberculosa aún se encuentra entre las causas más importantes de mortalidad a nivel mundial [50]. Por otra parte, *Mycobacterium leprae* tiene gran importancia epidemiológica y social en muchos países del mundo[51].

A excepción de estos dos patógenos primarios (*M. tuberculosis* y *M. leprae*), el resto de las micobacterias que pueden causar patología humana son también organismos ambientales que se pueden encontrar en muchos ecosistemas sin implicaciones para la salud. Estos microorganismos, conocidos como micobacterias no tuberculosas (MNT), pueden causar infecciones humanas en circunstancias especiales, como presencia de biomateriales, infecciones crónicas en pacientes con enfermedades subyacentes o incluso brotes asociados con fuentes ambientales[52-54].

Las infecciones por estas micobacterias son un fenómeno emergente en las últimas décadas[55]. Las MNT son ubicuas en la naturaleza, pudiéndose encontrar en agua, suelo y vegetación[2]. Además, cabe destacar su capacidad para formar biopelículas, lo que confiere a estos microorganismos muchas ventajas sobre la forma planctónica de las mismas, como son la resistencia a agresiones medioambientales, a desinfectantes y a antibióticos[18, 56]. Otro factor influyente

## Introducción

es el desarrollo de nuevas técnicas metodológicas en los laboratorios de micobacteriología, que han propiciado un mejor diagnóstico, lo que se lleva a cabo por un aislamiento e identificación más rápidos y precisos[54].

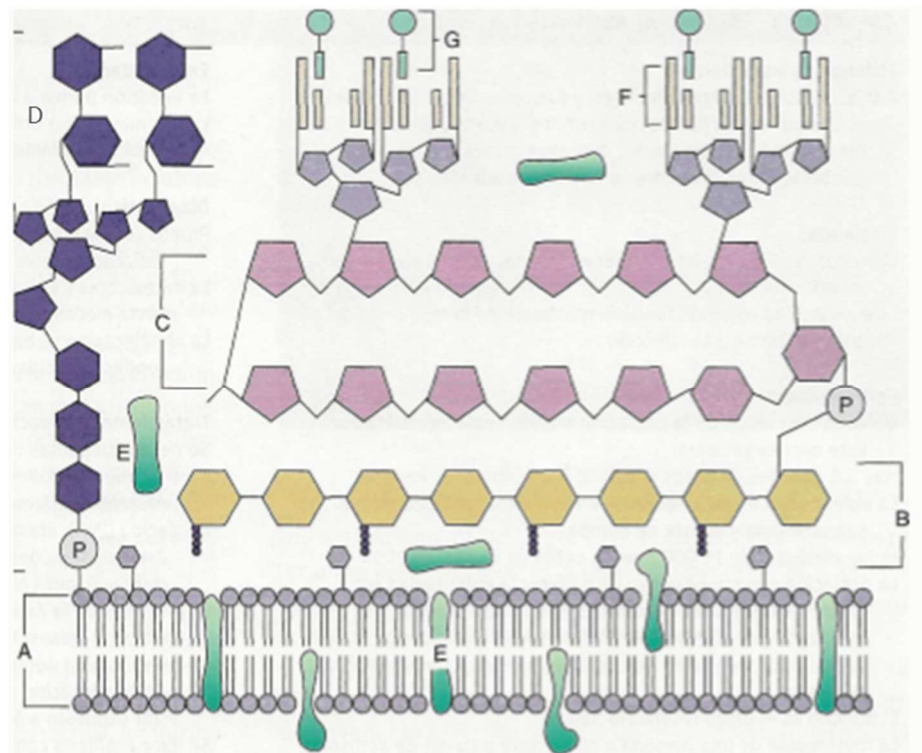
Las MNT pueden producir distintos síndromes clínicos, no solo en pacientes inmunocomprometidos, sino también en inmunocompetentes, entre los que destacan infecciones respiratorias crónicas, infecciones de piel y partes blandas, infecciones osteoarticulares e infecciones diseminadas[52]. Los pacientes con algún factor de riesgo o enfermedades de base son más propensos a contraer estas infecciones[3].

### 1.1.1. Pared celular de las micobacterias.

La estructura básica de la pared celular de las micobacterias es la característica de las bacterias grampositivas: membrana citoplasmática interna cubierta con gruesa capa de peptidoglucano y ausencia de membrana externa. En la membrana plasmática se anclan proteínas, manósido de fosfatidilinositol y lipoarabinomanano, que presenta una relación funcional con los lipopolisacáridos antigénicos de otras bacterias. La estructura del peptidoglucano es ligeramente diferente a las bacterias grampositivas, ya que en vez de ser un polímero de N-acetil- glucosamina y N- acetil- murámico, cambia este último por N- glucosil- murámico. Al peptidoglucano se unen mediante enlace covalente arabinogalactanos (polisacáridos formados por D- arabinosa y D- galactosa). El residuo terminal de D- arabinosa esterifica para dar lugar a los ácidos micólicos hidrofóbicos (con ramificaciones y alto peso molecular). Otro componente característico de la pared celular micobacteriana es el *cord factor* (ácido micólico

6,6'-dimicoltrehalosa). El componente lipídico de la pared celular de las micobacterias supone un 60%. A lo largo de la pared también se intercalan proteínas transportadoras y porinas, que suponen antígenos importantes a nivel biológico estimulando la respuesta inmune[57, 58].

Esta peculiar pared celular es la responsable de muchas de las propiedades características de las micobacterias (ácido-alcohol resistencia, crecimiento lento, resistencia a detergentes, resistencia a los antibióticos antibacterianos frecuentes, antigenicidad y formación de agregados)[58].



**Figura 1.** Esquema de la estructura de la pared celular micobacteriana. Consta de (A) membrana plasmática, (B) peptidoglucano, (C) arabinogalactano, (D) lipoarabinomano con cabeza de manosa, (E) proteínas asociadas a la membrana plasmática y a la pared celular, (F) ácidos micólicos y (G) moléculas de glucolípidos de superficie asociados a los ácidos micólicos. (Imagen tomada de Murray y col., Microbiología Médica, 5ª Ed.)

## 1.2. Clasificación de micobacterias

Las micobacterias se incluyen en la familia *Mycobacteriaceae* y en el orden *Actinomycetales*. El género *Mycobacterium* está formado por bacilos aerobios, no esporulados, inmóviles, intracelulares y resistentes a las condiciones ambientales. Como se detalló en el apartado anterior, su pared celular posee un alto contenido lipídico (cerca del 60%) responsable de la propiedad de la ácido-alcohol resistencia[57].

Las especies dentro del género *Mycobacterium* pueden clasificarse de múltiples formas. La clasificación clásica de Runyon se basa en la velocidad de crecimiento, la morfología y la capacidad de pigmentación de las colonias en medios sólidos y sigue teniendo una cierta utilidad en los laboratorios de micobacteriología clínica. La diferencia fundamental parte de la velocidad de crecimiento; así se pueden distinguir micobacterias de crecimiento lento (si requieren más de 7 días para producir colonias visibles en medio sólido) y micobacterias de crecimiento rápido (si producen colonias visibles en medio sólido en menos de 7 días). Además, las micobacterias pueden diferenciarse si no tienen capacidad de producir pigmento (no cromógenas), producirlo en presencia de luz (fotocromógenas) o en ausencia de luz (escotocromógenas). De esta forma, según la clasificación de Runyon[59] (1959) se pueden distinguir cuatro grupos de micobacterias: Grupo I (fotocromógenas), Grupo II (escotocromógenas), Grupo III (no cromógenas), (siendo estos tres grupos de crecimiento lento), y Grupo IV (no cromógenas, crecimiento rápido).

Micobacterias de crecimiento lento			Micobacterias de crecimiento rápido
Grupo I. Fotocromógenas	Grupo II. Escotocromógenas	Grupo III. No cromógenas	Grupo IV. No cromógenas
<i>M. asiaticum</i>	<i>M. flavescens</i>	<i>M. africanum</i>	<i>M. abscessus</i>
<i>M. kansasii</i>	<i>M. goodii</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. chelonae</i>
<i>M. marinum</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. fortuitum</i>
<i>M. simiae</i>	<i>M. szulgai</i>	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. mucogenicum</i>
	<i>M. xenopi</i>	<i>M. gastri</i>	<i>M. peregrinum</i>
		<i>M. genavense</i>	<i>M. porcinum</i>
		<i>M. haemophilum</i>	
		<i>M. intracellulare</i>	
		<i>M. malmoense</i>	
		<i>M. ulcerans</i>	
		<i>M. triviale</i>	
		<i>M. terrae</i>	
		<i>M. shimoidei</i>	
		<i>M. nonchromogenicum</i>	

Tabla 1. Clasificación de micobacterias de Runyon.

Existen otras clasificaciones realizadas con fines prácticos, como la que divide en función de entidades nosológicas en tres grupos las micobacterias: Grupo A, el complejo *M. tuberculosis* (formado principalmente por las especies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* y *M. microti*); Grupo B, *M. leprae*; y Grupo

C, micobacteriosis producidas por micobacterias distintas a las anteriores. Este último grupo ha recibido varios nombres, “atípicas”, “ambientales”, “oportunistas” y el más extendido actualmente: micobacterias no tuberculosas [40, 52, 54].

### **1.3. Micobacterias no pigmentadas de crecimiento rápido (MNPCR)**

Son aquellas micobacterias pertenecientes al Grupo IV según la clasificación de Runyon, que no son cromógenas y producen colonias en medio sólido en menos de 7 días.

#### **1.3.1. Epidemiología**

Las MNPCR son ubicuas en la naturaleza, y ampliamente distribuidas en suelo, agua, animales y vegetación[2, 60]. Pueden sobrevivir con poca concentración de nutrientes, en un amplio margen de temperatura y a pH bajo. Además, son capaces de formar biopelículas, lo que les confiere resistencia a factores ambientales, desinfectantes y antibióticos[18, 56]. Por todo esto, se considera el medio ambiente como una fuente potencial de infección[60].

Especialmente relevante es la presencia de MNPCR en el agua, así como en los sistemas de distribución de esta, como conductos y cañerías. En este ámbito, las micobacterias pueden convivir con amebas y otros protozoos, creando una relación beneficiosa para las micobacterias, ya que dentro de la ameba pueden evitar condiciones hostiles[61]. En conductos de distribución de agua existe diversidad de microorganismos, entre los que se encuentran bacterias del *Phylum*

*Proteobacteria* como *Burkholderia*, *Methylobacterium*, *Legionella*, *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas*; y también MNT, formando una comunidad microbiana compleja[62, 63]. Entre estas bacterias, se han detectado interacciones, destacando el estudio realizado por Joseph O. Falkinham y colaboradores[37], en el que se muestra que cuando *M. avium* está presente, no lo está *Methylobacterium*, y viceversa.

La capacidad de las micobacterias de formar biopelículas confiere a estos microorganismos más resistencia a agresiones medioambientales que la forma planctónica de las mismas, por lo que el crecimiento en biopelículas parece estar relacionado con las fuentes ambientales[56, 64, 65]. Además, varios estudios han demostrado el papel de estos reservorios ambientales en brotes causados por estos microorganismos, incluidas infecciones secundarias a intervenciones estéticas, procedimientos médicos y realización de tatuajes[60, 66-70].

En cuanto a los mecanismos de transmisión, la principal vía de adquisición de estas micobacterias es respiratoria a través de aerosoles[71]; aunque también existe la transmisión mediante agua o alimentos contaminados por vía digestiva[72] y la inoculación directa en la piel por traumatismo o cirugía[73].

Debido a la presencia generalizada de las MNPCR en el medio ambiente y los sistemas de distribución de agua, toda la población está expuesta a ellas. Sin embargo, hay determinados tipos de población con factores de riesgo para la adquisición de infecciones. Los factores de riesgo en infecciones pulmonares son enfermedades respiratorias de base, como fibrosis quística, bronquiectasias o

## Introducción

enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)[8-10]. Los factores de riesgo para infecciones localizadas en la piel son traumatismos o cirugía[74]. Además, los pacientes con mayor riesgo de desarrollar una infección diseminada son los trasplantados, en tratamiento con corticoesteroides y con otras enfermedades que conllevan un debilitamiento del sistema inmune, como VIH, leucemia o linfoma[75].

### 1.3.2. Patogenia

Las MNPCR pueden causar varios tipos de infecciones, como infecciones pulmonares, infecciones de piel y partes blandas, infecciones asociadas a dispositivos biomédicos (catéteres, prótesis), infecciones asociadas a cirugías e infecciones diseminadas[73].

Según la relevancia clínica, las tres especies más patógenas son *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum*, suponiendo un 90% del total de infecciones causadas por MNPCR[7, 73]. *M. abscessus* es la tercera micobacteria aislada con mayor frecuencia en enfermedad pulmonar en Estados Unidos, y su aislamiento es cuatro veces más frecuente que el resto de las micobacterias de su grupo[76, 77].

Las MNPCR, en especial *M. abscessus*, son causantes de infección pulmonar[77], la cual se asocia en la mayoría de los casos a enfermedades estructurales crónicas que conllevan un aclaramiento deficiente de los microorganismos, como EPOC o fibrosis quística[10, 78]. Clínicamente, la infección puede causar desde una enfermedad asintomática hasta bronquiectasias graves y cavitaciones con morbilidad y mortalidad significativas. En estos pacientes, es frecuente la

asociación de *M. abscessus* con otras bacterias como *Staphylococcus aureus* o *Pseudomonas aeruginosa*[73]. También existen infecciones pulmonares polimicobacterianas, como las causadas simultáneamente por *M. avium* y *M. abscessus*; de hecho, es más probable que los pacientes con cultivos de *M. abscessus* cumplan con los criterios de la *American Thoracic Society (ATS) and Infectious Diseases Society of America (IDSA)* para el diagnóstico de otras micobacterias no tuberculosas, como el complejo *M. avium*[54]. En cuanto a las tasas de prevalencia en muestras respiratorias, Olivier y col. encontraron un 13% de MNT en esputos de pacientes con fibrosis quística, siendo un 75% del complejo *M. avium* y un 13% MNPCR[79]. Sin embargo, la presencia en el esputo no asegura el diagnóstico certero de infección, ya que estos microorganismos pueden ser meros colonizadores del tracto respiratorio. Siguiendo las guías ATS/IDSA, los criterios clínicos, radiológicos y microbiológicos son igualmente importantes y todos deben cumplirse para hacer un diagnóstico de enfermedad pulmonar por micobacterias no tuberculosas[54].

Las infecciones de piel y partes blandas por estas micobacterias normalmente son producidas por traumatismo o procedimientos médicos o quirúrgicos en los que exista material contaminado. Con el desarrollo de la medicina estética, en los últimos años ha habido un aumento de infecciones asociadas a estos procedimientos, como en procedimientos faciales, abdominoplastia, liposucción, mamoplastia y realización de *piercings*[80-82]. Además, se han documentado casos de forunculosis después de un baño de hidromasaje[83].

## Introducción

Las infecciones asociadas a dispositivos, como catéteres, se han descrito con más frecuencia en los últimos años[7, 84]. Los riesgos de adquisición son inmunosupresión, tiempo de permanencia del catéter y terapia antimicrobiana previa[85, 86]. También se han descrito casos de infecciones asociadas a otros implantes, como marcapasos[87]o prótesis articulares[88]. En todos estos casos la retirada del dispositivo es fundamental para una completa curación.

En cuanto a las infecciones diseminadas, ocurren en personas con inmunosupresión celular (quimioterapia, trasplante, síndrome de inmunodeficiencia adquirida), y también en casos de bacteriemia asociada a catéter, normalmente por un uso prolongado del mismo[54, 89].

Según los criterios ATS/IDSA[54], hay que tener en cuenta respecto a la patogenia de MNT:

- a) En pacientes infectados por VIH, las infecciones diseminadas ocurren cuando el número de linfocitos T CD4+ está por debajo de 50/ $\mu$ l[90].
- b) En pacientes no infectados por VIH, la infección diseminada se ha asociado con mutaciones específicas en las vías de síntesis y respuesta al interferón (IFN) y la interleucina 12 (IL-12)[91, 92].
- c) Existe una asociación entre bronquiectasias, infección nodular por MNT y particularidades del cuerpo humano, como *pectus excavatum*, escoliosis o prolapso de válvula mitral[93].

En cuanto a la respuesta inmune, las micobacterias son inicialmente fagocitadas por macrófagos, los cuales producen IL-12 y esto regula el IFN- $\gamma$ , que activa

neutrófilos y macrófagos para matar patógenos intracelulares, incluyendo las micobacterias. Existe una retroalimentación positiva entre el IFN y el IL-12, que es fundamental para el control de las micobacterias, así como algunas otras infecciones intracelulares[94].

### 1.3.3. Morfología de colonia y patogenicidad

El crecimiento de MNT en medios sólidos permite diferenciar diferentes morfologías de colonia, pudiendo distinguir entre cepas con morfología de colonia rugosa y cepas con morfología de colonia lisa[13, 14, 95, 96]. Varios estudios muestran una correlación entre la morfología de la colonia y la virulencia de la cepa, siendo generalmente las cepas de colonia rugosa más virulentas que las variantes de colonia lisa en modelos experimentales de infección. Varios estudios han demostrado que el fenotipo de colonia está influenciado por el glucopeptidolípido (GPL) de la pared celular[15, 16], teniendo las variantes de colonia lisa más cantidad de GPL y siendo capaces de formar biopelículas, pero menos invasivas en células. Por el contrario, las cepas de colonia rugosa expresan menos cantidad de GPL y son más invasivas a nivel celular pero su capacidad de formar biopelículas es mucho menor[14, 17].

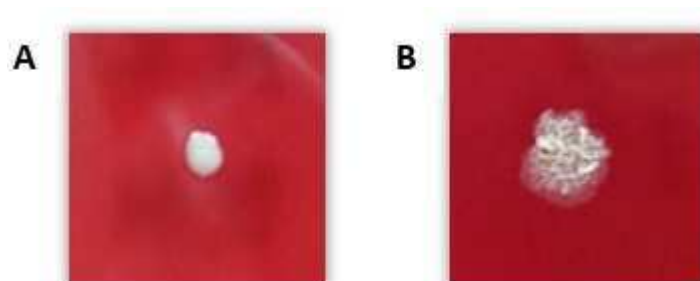


Figura 2. Colonias de *M. abscessus* con morfología lisa (A) y con morfología rugosa (B) en agar triptosa en soja + 5% sangre de carnero (TSS) (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia).

### 1.3.4. Diagnóstico

#### 1.3.4.1. Diagnóstico microbiológico

La identificación microbiológica final consiste en determinar género y especie de la micobacteria a estudio. El diagnóstico microbiológico de las infecciones por MNPCR comprende métodos clásicos, como la observación microscópica, el cultivo y pruebas bioquímicas, así como técnicas moleculares más actuales[40].

La microscopía es un procedimiento simple, barato y rápido que permite obtener una orientación diagnóstica preliminar. Presenta una sensibilidad que oscila entre el 22% y el 80%, variando ésta según el tipo de muestra, la cantidad y la concentración de micobacteria en la muestra. Debido a las características de la pared celular micobacteriana, las tinciones empleadas son específicas, como la tinción ácido alcohol resistente (Ziehl-Neelsen o Kinyoun) o tinciones con fluorocromos, como auramina-rodamina. Esta última permite emplear menos tiempo en la observación, pero no está claramente probado que aumente la sensibilidad[40, 97].

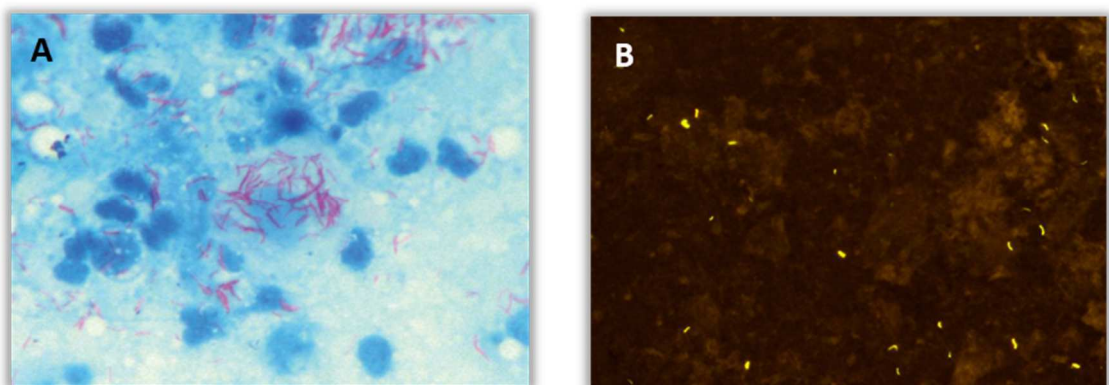


Figura 3. Tinciones específicas para micobacterias: Ziehl-Neelsen (A) y auramina-rodamina (B).

El cultivo es más sensible que el examen microscópico y el aislamiento permite la identificación de la especie y la realización de estudios de sensibilidad. Suelen emplearse medios con antibióticos u otras sustancias (verde malaquita, cristal violeta) para impedir el crecimiento bacteriano o fúngico. Para el aislamiento a partir de una muestra clínica es conveniente usar medio líquido y sólido. Los más utilizados son Middlebrook, Lowenstein-Jensen y Coletsos. A partir del crecimiento en el cultivo, mediante técnicas fenotípicas y pruebas bioquímicas puede llevarse a cabo la identificación[98], pero actualmente este método está en desuso, ya que hay otros métodos que permiten identificar con más precisión los aislamientos. La identificación molecular y los métodos cromatográficos permiten identificar correctamente las diferentes especies[40, 99].

Los métodos de identificación más actuales están basados en el diagnóstico molecular, como la detección de las dianas 16S ARNr (PCR), hsp65, rpoB y las técnicas de hibridación. Para las especies más frecuentes, existen sistemas comerciales (Figura 4), y para la identificación de especies menos frecuentes se utiliza PCR- RFLP Analysis (PRA) y secuenciación de diversos genes[72, 99-102].

## Introducción

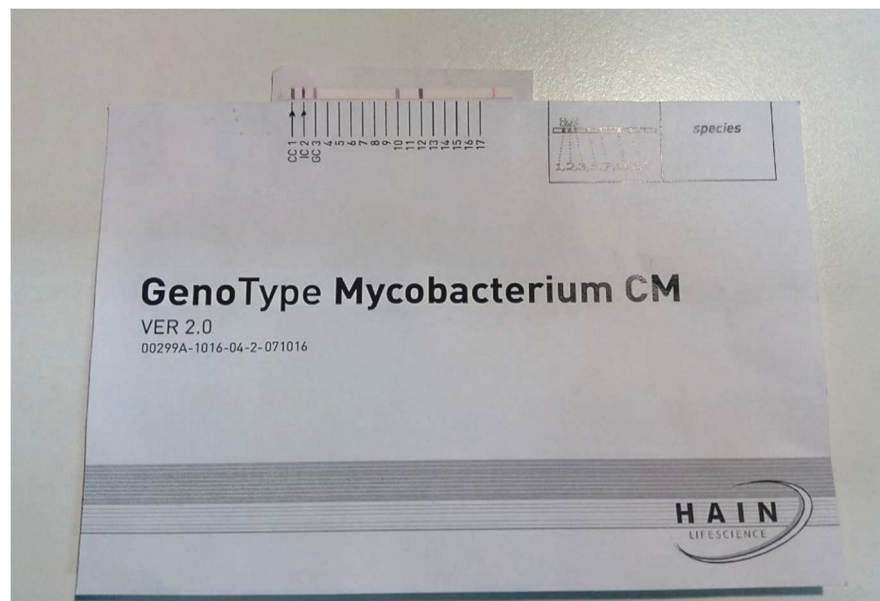
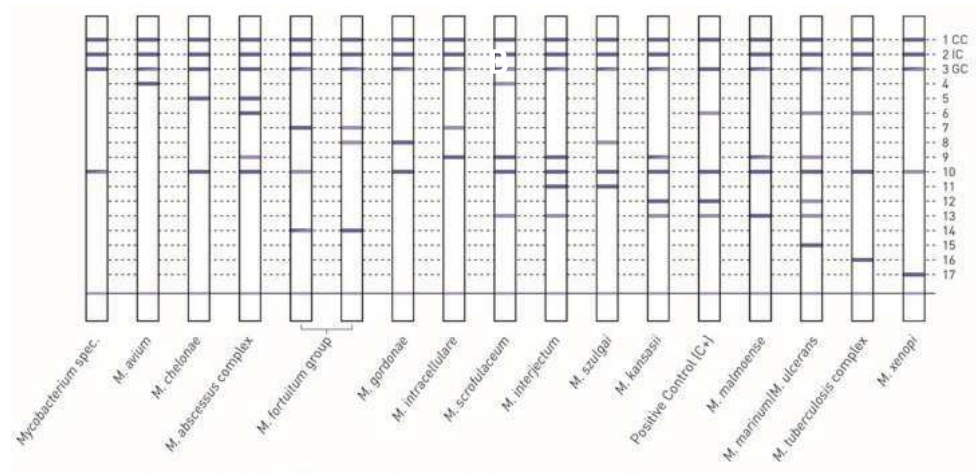


Figura 4. Sistema GenoType basado en la hibridación mediante sonda de cada especie micobacteriana.

### 1.3.4.2. Diagnóstico histopatológico

Si el caso requiere muestra de biopsia (piel, ganglios, pulmón...) el examen histopatológico revelará, en el caso de infección por micobacterias atípicas, granulomas supurativos (el rasgo histopatológico más frecuente), inflamación crónica inespecífica, infiltrado difuso de histiocitos, células espumosas y foliculitis necrotizante[103, 104].

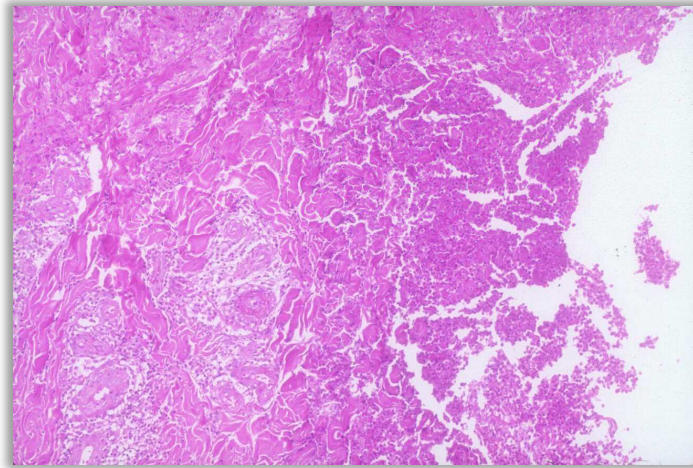


Figura 5. Detalle histopatológico de foliculitis por micobacterias.

#### 1.3.4.3. Diagnóstico por imagen

El diagnóstico por imagen es fundamental en las infecciones pulmonares por micobacterias. Radiológicamente, la infección por micobacterias atípicas clásica puede ser indistinguible de la infección por *M. tuberculosis*[105], aunque por lo general la última es más sintomática clínicamente. La infección pulmonar por MNPCR se aprecia radiológicamente por cavitación, consolidación, presencia de bronquiectasias, nódulos pulmonares y en ocasiones empiema y fístulas broncopleurales[3]. Estas manifestaciones radiológicas pueden variar en función de cada paciente, dependiendo si es inmunocompetente o no, o si ya existe enfermedad pulmonar de base[106].

#### 1.3.4.4. Criterios ATS/IDSA

El diagnóstico de la enfermedad pulmonar por MNT es, en ocasiones, complicado. Los síntomas son, muchas veces, inespecíficos (tos, fatiga, malestar general); y los síntomas constitucionales (pérdida de peso, fiebre, sudores nocturnos) suelen indicar enfermedad avanzada[54, 107].

## Introducción

Un cultivo positivo no siempre indica infección, puede tratarse de una contaminación o una colonización transitoria del tracto respiratorio[53, 54, 106]. En algunos hospitales, se han descrito contaminaciones por estas micobacterias en sistemas de conducción de agua e instrumental médico[108, 109]. Por todo ello, y siguiendo las indicaciones ATS/IDSA[54], los criterios clínicos, radiológicos y microbiológicos son igualmente importantes a la hora de diagnosticar enfermedad pulmonar por MNT.

Según la ATS/IDSA, los criterios clínicos y microbiológicos para el diagnóstico de enfermedad pulmonar por MNT son[54]:

1- Criterios clínicos:

- a) Síntomas pulmonares, opacidades nodulares o cavitarias en la radiografía de tórax, o una tomografía computarizada de alta resolución que muestre bronquiectasias multifocales con múltiples nódulos pequeños, y
- b) Exclusión apropiada de otros diagnósticos.

2- Criterios microbiológicos:

- a) Cultivo positivo de al menos dos muestras de esputo recogidas de forma separada, o
- b) Cultivo positivo de al menos un lavado bronquial, o
- c) Biopsia transbronquial u otra biopsia pulmonar con características histopatológicas propias de infección micobacteriana y cultivo positivo para MNT o biopsia con características histopatológicas micobacterianas y uno o más cultivos de lavados bronquiales o esputos positivos para MNT.

3- Recomendaciones:

- a) Debe hacerse consulta a un experto en la materia cuando se aíslan MNT que se encuentran con poca frecuencia o que generalmente representan contaminación ambiental.
- b) Los pacientes con sospecha de enfermedad pulmonar por MNT pero que no cumplen con los criterios de diagnóstico deben seguirse hasta que el diagnóstico esté firmemente establecido o excluido.
- c) Establecer el diagnóstico de la enfermedad pulmonar por MNT no requiere, por sí mismo, la institución de tratamiento antimicobacteriano. Esta decisión estará basada en los riesgos y beneficios potenciales de la terapia para cada paciente de forma individualizada.

**1.3.4.5. Otras pruebas diagnósticas**

Se han ensayado pruebas intradérmicas similares a la técnica de Mantoux en el diagnóstico de la tuberculosis, a partir de derivados de proteína purificada de micobacterias atípicas, pero no parecen tener utilidad en la práctica clínica, debido principalmente a la abundancia de reacciones cruzadas[110].

Bhatta y col. comprobaron que los espectros de emisión y excitación revelan que las bacterias y levaduras pueden diferenciarse por su fluorescencia intrínseca con la excitación ultravioleta (UV)[111]. La autofluorescencia intrínseca es una característica propia de algunos microorganismos, como *Lactobacillus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*,

## Introducción

*Enterococcus faecalis* y *Saccharomyces*[111, 112]. En el ámbito de las micobacterias, Patiño y col. detectaron la presencia de autofluorescencia azul en especies de micobacterias como *M. tuberculosis*, *M. smegmatis*, *M. marinum* y *M. fortuitum*[39]. Posteriormente Muñoz-Egea y col. utilizaron la autofluorescencia propia de las MNPCR para caracterizar la formación de biopelículas de las mismas[38].

### 1.3.5. Sensibilidad *in vitro* y tratamiento

Las técnicas valoradas para realizar los estudios de sensibilidad antibiótica en MNPCR han sido disco-placa, E-test y microdilución en caldo. El único método estandarizado por *el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* en 2003 es la microdilución en caldo[113]. En este documento, actualizado en 2011, se establecen puntos de corte para los siguientes antimicrobianos frente a MNPCR: amikacina, cefoxitina, claritromicina, doxiciclina, linezolid, imipenem, tobramicina, cotrimoxazol, minociclina y moxifloxacino. La microdilución en caldo se considera el método de referencia[114, 115], mientras que el resto de técnicas tienen problemas de reproducibilidad[40]. Sin embargo, para algunas infecciones causadas por estos microorganismos todavía no existen pautas establecidas de tratamiento consenso ni protocolos para el estudio de la sensibilidad claramente pautados[116, 117].

En cuanto a mecanismos de resistencia, la abundancia de lípidos en la pared celular de las micobacterias se convierte en una barrera frente a la penetración de compuestos antimicrobianos, relacionándose la resistencia natural de las micobacterias frente a algunos fármacos con esta hidrofobicidad[118]. Por otro

lado, es conocida la presencia de bombas de eflujo, que suponen la aparición de resistencia fenotípica a macrólidos y quinolonas respectivamente[119-123]. Además, son de especial interés las metilasas inducibles como mecanismo de resistencia a macrólidos. Existen 5 clases de genes *erm* (erythromycin ribosome methylation), que codifican para enzimas llamadas metilasas. Son enzimas inducibles, que actúan metilando los ARN ribosómicos 23S, lo que dificulta la unión de los macrólidos a los ribosomas, impidiendo, por tanto, su acción[124-127]. Al ser enzimas inducibles, el efecto en la resistencia antimicrobiana fenotípica puede no ser detectado en las pruebas antimicrobianas convencionales[126]. El CLSI propone la posibilidad de detectar estos genes haciendo la primera lectura de la concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de microdilución en caldo al tercer día y realizar una posterior lectura a los 14 días[54, 113]. También puede detectarse la resistencia por métodos moleculares de detección del gen[128].

El tratamiento debe realizarse en función de la especie aislada, la sintomatología y el estudio de sensibilidad *in vitro*. Las MNPCR son resistentes a los fármacos antituberculosos convencionales, pero pueden tener sensibilidad frente a antimicrobianos de amplio espectro[129]. Debido al desarrollo de resistencias bacterianas, se recomienda el uso de al menos dos fármacos sensibles según antibiograma[89]. En términos generales, los patrones de sensibilidad más característicos muestran que *M. abscessus* suele ser sensible a macrólidos, amikacina y cefoxitina y resistente a quinolonas; *M. chelonae* suele ser sensible a amikacina y macrólidos y resistente a quinolonas y cefoxitina; por último, *M. fortuitum* suele presentar sensibilidad a quinolonas, pero resistencia a

## Introducción

macrólidos[77, 89, 130, 131]. Aun así, la gran variabilidad de cepas hace necesaria la realización de estudios de sensibilidad.

Debido a la capacidad de estas micobacterias de formar biopelículas, en algunos casos puede ser necesario el tratamiento quirúrgico además del farmacológico. En pacientes portadores de dispositivos biomédicos (mallas, prótesis, catéteres) la retirada del mismo y la consiguiente eliminación de la biopelícula es fundamental para una completa curación[88, 89, 132].

### **1.4. Biopelículas**

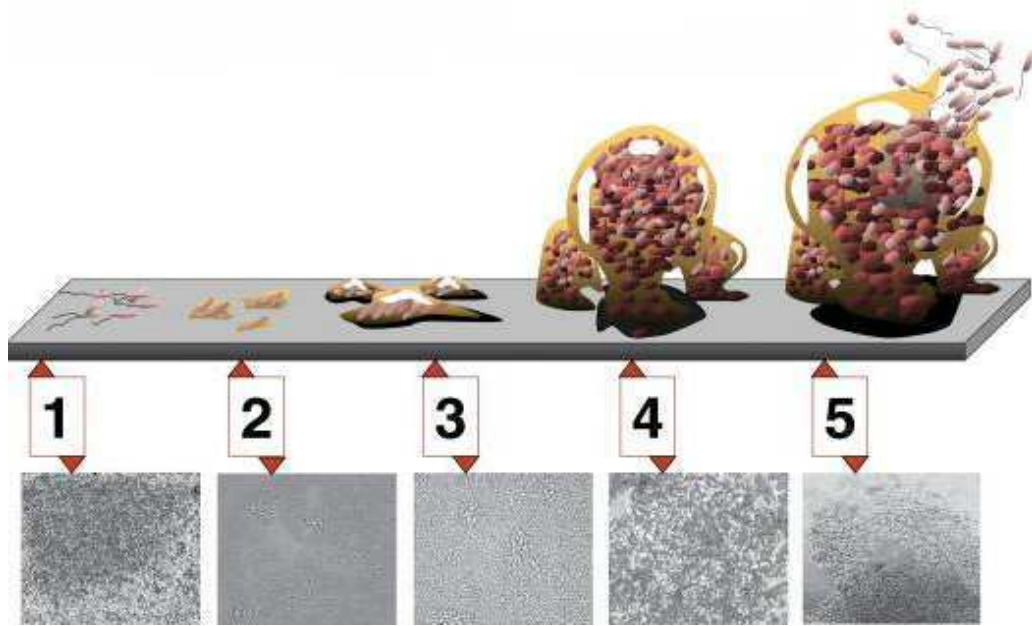
El concepto de biopelícula fue demostrado por J. W. Costerton y cols. en 1978, y se definen actualmente como “comunidades de microorganismos, en muchas ocasiones mixtas, que crecen embebidas en una matriz extracelular, sintetizada por la propia comunidad, y adheridas a una superficie inerte, tejido vivo o interfase”[133, 134].

Se considera que todos los microorganismos son capaces de formar biopelículas bajo las condiciones de pH, temperatura y nutrientes adecuadas[135], siendo además la forma prevalente de existencia de los microorganismos en la naturaleza, estimándose que el 90% de las bacterias viven en biopelículas, pudiendo ser monomicrobianas y más frecuentemente polimicrobianas[134, 136].

El proceso de formación de una biopelícula se puede describir en 4 fases: adhesión reversible, adhesión irreversible, maduración y dispersión[137]. Todo comienza con la adherencia de las bacterias en estado planctónico a la superficie[138]. Esta adherencia parece estar mediada por diferentes componentes según la bacteria;

por ejemplo, en bacterias gramnegativas se ha comprobado que los flagelos y fimbrias juegan un papel importante[139, 140], mientras que en bacterias grampositivas se ha descrito la participación de proteínas de superficie (AtlE, Bap, Esp) en esta adherencia primaria[141, 142]. En la primera etapa la adhesión es reversible, mediante fuerzas débiles, como las fuerzas de Van der Waals. En la segunda etapa, se produce una adhesión más fuerte mediante enlaces covalentes. En las fases tercera y cuarta se produce la multiplicación y agregación celular, con la secreción de exopolímeros y la consiguiente formación de la matriz extracelular, alcanzándose una biopelícula madura. En la última etapa se produce la liberación de microorganismos en forma planctónica hacia otros focos donde puede darse la formación de una nueva biopelícula[41, 137, 143]. Por ello, las biopelículas se convierten en una fuente de infección persistente y crónica.

Las bacterias que forman una biopelícula poseen su propio sistema de comunicación y regulación intrínseca denominado *quorum sensing*[144, 145]. Este proceso se basa en señales químicas. Las bacterias producen, liberan, detectan y responden a pequeñas moléculas similares a hormonas denominadas autoinductores. La acumulación en el medio de esta molécula o inductor como consecuencia del aumento en la densidad de células hace que estas moléculas interactúen con receptores en la bacteria que pueden dar lugar a activación o desactivación de genes[145].



**Figura 6.** Etapas de formación de una biopelícula: (1) adhesión reversible, (2) adhesión irreversible a la superficie, (3, 4) síntesis de la matriz de exopolisacáridos y formación de la biopelícula, (5) biopelícula madura y dispersión de nuevas bacterias. Imagen tomada de D. Davis. Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. PLoSBiol, Vol 5, issue 11.

La formación de biopelículas se considera un importante mecanismo de patogenicidad, que confiere a las bacterias mayor resistencia frente a desinfectantes y antimicrobianos que en su estado planctónico[146, 147]. La CMI de las bacterias que forman una biopelícula puede ser de 100 a 1000 veces superior a la de las mismas bacterias en estado planctónico[143, 148]. Esta característica puede deberse a varios mecanismos. En primer lugar, cabe destacar la impermeabilidad de la biopelícula a varias sustancias (como antibióticos) debido a la presencia de matriz extracelular, aunque esto no parece ser la causa fundamental de la resistencia[149]. Otro motivo que podría explicar la mayor resistencia a antibióticos en las bacterias que forman biopelículas es el agotamiento de nutrientes y oxígeno, que causaría que las bacterias estuvieran en un estado estacionario (sin multiplicación) por lo que podrían ser menos susceptibles a antibióticos dependientes del crecimiento bacteriano[149, 150].

Además, puede existir una activación de genes de resistencia, inactivos en estado planctónico, como es el caso de las bombas de eflujo en *P. aeruginosa*[151, 152], e incluso la diferenciación de células para que actúen como mecanismo de resistencia (*persisters*) dentro de la diferenciación metabólica que tiene lugar durante la maduración de la biopelícula[153]. En definitiva, la causa de la resistencia a antimicrobianos de las bacterias que forman una biopelícula es, posiblemente, multifactorial[149, 150].

Las biopelículas bacterianas están, por tanto, implicadas en numerosas infecciones de tipo crónico y con mala respuesta a tratamiento antibiótico[154, 155]. Algunas de estas infecciones son caries dental, otitis media, osteomielitis, fascitis necrotizante, endocarditis, neumonía en pacientes con fibrosis quística e infecciones asociadas a dispositivos biomédicos, como prótesis osteoarticulares, catéteres, suturas, mallas, válvulas mecánicas, marcapasos y tubos endotraqueales[147, 155, 156]. Para la detección y el diagnóstico de los microorganismos que forman estas biopelículas se han desarrollado varios métodos. En el diagnóstico de la infección asociada a catéter, la técnica semicuantitativa de Maki[157] se practica en los laboratorios como método habitual, aunque puede tener sensibilidad limitada al no tener en cuenta la parte intraluminal del catéter[158]. Por ello se han propuesto técnicas como el cepillado intraluminal[159]. Los métodos en otros dispositivos están poco estandarizados, y muchas veces se recurre al uso de agitación con vórtex con el fin de desprender la biopelícula[160]. Sin embargo, en los últimos años, la sonicación (basada en ondas de ultrasonidos) se ha impuesto como un método eficaz para el diagnóstico

## Introducción

de infecciones asociadas a diversos dispositivos, pudiéndose además realizar una cuantificación del microorganismo [161-163].

### 1.4.1. Biopelículas micobacterianas.

La capacidad de las micobacterias de formar biopelículas está totalmente establecida, y pueden ser definidas del mismo modo que las del resto de bacterias[18]. El proceso de formación es similar, y también existe comunicación bacteriana mediante *quorum sensing*[164]. La adherencia inicial de las micobacterias a las superficies está mediada por unas moléculas denominadas adhesinas. Una vez adheridas, comienza la síntesis de la matriz extracelular, normalmente compuesta por glucopéptidos, ADN y otras moléculas. Cabe destacar la falta de producción de exopolisacárido característica de las biopelículas de otras bacterias[165]. Algunos autores han propuesto que los ácidos micólicos forman una matriz extracelular hidrofóbica[166]. Las micobacterias carecen de fimbrias o pili, pero se han descrito algunas proteínas como potenciales factores de agregación[167].

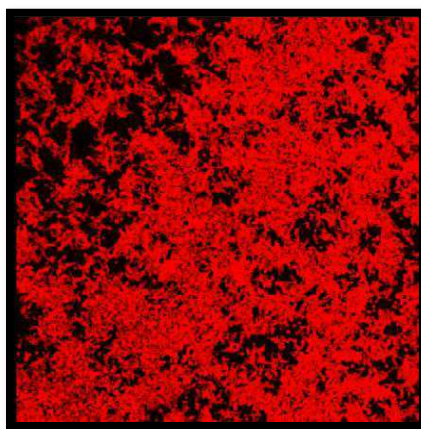


Figura 7. Biopelícula de *M. abscessus* de 96 horas teñida con Nile Red®. Microscopía confocal láser de barrido.

Las micobacterias son capaces de desarrollar biopelículas no solo en las superficies, sino también en la interfaz aire-medio[168]. Este fenómeno podría ser explicado por la diferente composición de la matriz extracelular y las características de la pared bacteriana, rica en lípidos.

Varios estudios han confirmado la capacidad de las micobacterias de adherirse a materiales, como cloruro de polivinilo[169], diacetato de celulosa[170] o polipropileno[165]. En cuanto a la formación de estas biopelículas, el papel de varias moléculas ha sido estudiado: Recht y col. mostraron que los glucopeptidolípidos son esenciales en *M. smegmatis* para la adhesión inicial[171]. Además, influyen en la motilidad, propiedad que se relaciona con la capacidad de las micobacterias de colonizar superficies[171-173]. Sin embargo, esta motilidad no siempre está relacionada con el desarrollo de biopelículas, ya que estudios como el de Ojha y col. demuestran que, en micobacterias sin motilidad, los ácidos micólicos de cadena corta (modulados por la chaperona GroEL1) tienen un papel importante en el desarrollo de la estructura de la biopelícula[166, 168].

En cuanto a la patología causada por biopelículas de MNPCR, la principal es la respiratoria, que normalmente afecta a pacientes con predisposición como enfermos por silicosis, antiguas cicatrices tuberculosas y otras cavidades pulmonares donde las MNPCR pueden desarrollar una biopelícula y posteriormente causar una enfermedad invasiva[52, 54, 174]. El desarrollo de estas biopelículas en enfermos de fibrosis quística o con bronquiectasias crónicas está documentado y supone un problema a la hora de instaurar un tratamiento eficaz[175]. Otro grupo importante de infecciones debidas a biopelículas de MNPCR son las asociadas con biomateriales, entre las que están documentadas:

## Introducción

bacteriemia asociada a catéter[129], catéteres usados en diálisis peritoneal[176], infección de prótesis osteoarticular[88], infección de mallas utilizadas en cirugía abdominal[132], infección de marcapasos[177, 178] y endocarditis por válvula protésica[179]. Para tratar estas infecciones suele ser imprescindible retirar el material para curar la infección[180].

Al igual que en el resto de las biopelículas, la resistencia a antibióticos y desinfectantes es mucho mayor que en las micobacterias en estado planctónico. Por ello, aunque la CMI indique que la micobacteria a estudio es sensible a determinados antibióticos, estos fármacos serán mínimamente activos en las biopelículas[181, 182]. En un estudio llevado a cabo con MNPCR, se confirmaron las diferencias entre la CMI y la concentración mínima de erradicación de la biopelícula (CMEB), observando que cuando estas micobacterias se encuentran formando parte de una biopelícula presentan una resistencia a antimicrobianos muy superior respecto a las micobacterias en estado planctónico, variando desde < 100 veces en el caso de *M. mucogenicum* cuando se expone a ciprofloxacino, hasta > 100.000 veces en el caso de *M. abscessus* y *M. peregrinum* cuando se exponen a claritromicina[183].

### **1.5. *Methylobacterium spp.***

*Methylobacterium* es un género de bacterias gramnegativas, pertenecientes a la clase *Alphaproteobacteria*, que normalmente se encuentran en suelo, plantas, lagos y en sistemas de distribución de agua[23, 184-186]. Son bacterias aerobias y metilótrofas facultativas, ya que pueden utilizar compuestos con un solo átomo de carbono para crecer[187]. Contienen carotenoides, pigmentos que hacen que

las colonias de *Methylobacterium sp.* sean de color rosado. Es frecuente observar este pigmento macroscópicamente en baños o cañerías[188].

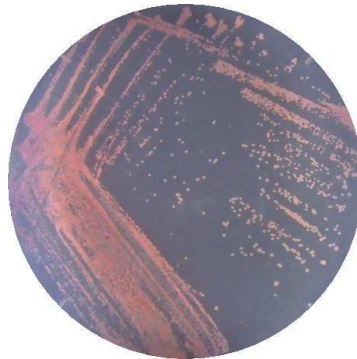


Figura 8. Cultivo de *Methylobacterium sp.* en agar R2A. Imagen tomada de [www.ccos.ch](http://www.ccos.ch).

*Methylobacterium spp.* presenta elevada resistencia al cloro y la desecación, por lo que predomina en ambientes poco favorables para el crecimiento de otros microorganismos[189]. Es una bacteria ambiental, que ocasionalmente, puede comportarse como oportunista, causando infecciones en pacientes inmunodeprimidos. Están documentados varios casos de bacteriemia asociada a catéter en este tipo de pacientes[190-192].

En los sistemas de distribución de agua, *Methylobacterium spp.* convive con otras especies de bacterias, entre las que se encuentran *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium avium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* o *Aeromonas hydrophila*. En estos sistemas es frecuente el desarrollo de biopelículas polimicrobianas[144].

### 1.5.1. *Methylobacterium spp.* y su relación con las micobacterias.

En el medio ambiente, muchos microorganismos conviven en comunidades, en ocasiones formando biopelículas y compitiendo por los recursos[144]. Es

## Introducción

conocido el hecho de que en biopelículas asociadas a sistemas de distribución de agua conviven especies de *Methylobacterium* y algunas especies de micobacterias[25, 144, 193].

Feazel y col. llevaron a cabo un estudio que pretendía describir la población microbiana que forma biopelículas en duchas, ya que, por formación de aerosoles y posterior inhalación, podrían llegar a ser una potencial fuente de infección en determinados pacientes, en especial por la presencia de MNT. En este estudio se pudo observar que la presencia *Methylobacterium spp.* se asociaba con la ausencia de *Mycobacterium spp.* y la presencia de *Mycobacterium spp.* con la ausencia de *Methylobacterium spp.*[25]. Partiendo de esta observación, Falkinham y col. recolectaron muestras de sistemas de distribución de agua de casas de pacientes con enfermedad por MNT y sus vecinos en Philadelphia, con el objetivo de hacer un recuento bacteriano de micobacterias y *Methylobacterium spp.* Los resultados mostraron que en las biopelículas donde había *Methylobacterium spp.* rara vez se aislaban micobacterias y viceversa[37]. En otro estudio *in vitro* realizado por el mismo grupo, se demostró que la presencia previa de *Methylobacterium sp.* reducía la adherencia de *M. avium*, demostrado tanto por cultivo bacteriano como por métodos moleculares (qPCR)[26].

## **2. HIPÓTESIS**



Se establecen las siguientes hipótesis:

1. La morfología de colonia de MNPCR parece estar relacionada con la patogenicidad, y este hecho podría ser probado mediante cultivo celular de cepas de estas micobacterias en macrófagos y mediante un modelo experimental con larvas de *Galleria mellonella*, pudiendo ser útil el conocimiento del tipo de colonia para el manejo de los pacientes infectados.
2. *Methylobacterium sp.* podría inhibir la formación de biopelículas de MNPCR, siendo un posible primer paso para el desarrollo de un tratamiento o sustancia antibiopelícula.
3. La combinación de *Methylobacterium sp.* y claritromicina podría ser sinérgica frente a la erradicación de biopelículas de MNPCR.



### **3. OBJETIVOS**



1. Evaluar la patogenia de *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum* según la morfología de colonia lisa/rugosa con cepas colección y con cepas clínicas, mediante dos métodos:
  - 1.1. Modelo *in vitro* por fagocitosis en macrófagos.
  - 1.2. Modelo *in vivo* con larvas de *G. mellonella*.
  
2. Evaluar el efecto de *Methylobacterium sp.* sobre biopelículas de *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum*, mediante dos métodos:
  - 2.1. Evaluación del espesor de la biopelícula, porcentaje de superficie cubierta, porcentaje de autofluorescencia y porcentaje de bacterias muertas mediante microscopía confocal láser de barrido (MCLB).
  - 2.2. Evaluación de la biopelícula mediante recuento bacteriano.
  
3. Evaluar el efecto de *Methylobacterium sp.* combinado con claritromicina sobre biopelículas de *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum*, mediante dos métodos:
  - 3.1. Evaluación del espesor de la biopelícula, porcentaje de superficie cubierta, porcentaje de autofluorescencia y porcentaje de bacterias muertas mediante MCLB.
  - 3.2. Evaluación de la biopelícula mediante recuento bacteriano.



## **4. MATERIAL Y MÉTODOS**



#### 4.1. Evaluación de la patogenicidad de *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum* según la morfología de colonia lisa/rugosa.

Las micobacterias utilizadas para estos experimentos fueron: tres cepas colección de cada micobacteria (*M. abscessus* DSM 44196, *M. chelonae* ATCC 19235 y *M. fortuitum* ATCC 6841), las tres de colonia lisa; y tres cepas clínicas de cada micobacteria aisladas en el Departamento de Microbiología Clínica del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz, siendo una de cada especie de colonia lisa y dos de colonia rugosa. Las cepas se mantuvieron congeladas a -20°C en leche desnatada estéril (Oxoid, Reino Unido).

Cepa	Microorganismo	Morfología de colonia/origen
MA DSM 44196	<i>M. abscessus</i> DSM 44196	Lisa/cepa colección
MA 1	<i>M. abscessus sub. abscessus</i>	Lisa/clínica
MA 2	<i>M. abscessus sub. abscessus</i>	Rugosa/clínica
MA 3	<i>M. abscessus sub. massiliense</i>	Rugosa/clínica
MF ATCC 6841	<i>M. fortuitum</i> ATCC 6841	Lisa/cepa colección
MF 1	<i>M. fortuitum</i>	Lisa/clínica
MF 2	<i>M. fortuitum</i>	Rugosa/clínica
MF 3	<i>M. fortuitum</i>	Rugosa/clínica
MC ATCC 19235	<i>M. chelonae</i> ATCC 19235	Lisa/cepa colección
MC 1	<i>M. chelonae</i>	Lisa/clínica
MC 2	<i>M. chelonae</i>	Rugosa/clínica
MC 3	<i>M. chelonae</i>	Rugosa/clínica

Tabla 2. Micobacterias utilizadas en los experimentos de evaluación de la patogenicidad de *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum* según la morfología de colonia.

#### 4.1.1. Modelo *in vitro* por fagocitosis en macrófagos.

Los macrófagos utilizados fueron la línea celular J-774A.1 (ATCC® TIB-67™), obtenidos de líquido ascítico de ratón con sarcoma de células reticulares. Las células fueron conservadas en medio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI; Gibco®, Massachusetts, EE. UU.) suplementado al 10% con suero fetal bovino y antibióticos. La patogenicidad de cada micobacteria fue evaluada analizando la fagocitosis. Para ello, se formaron monocapas celulares confluentes en placas de 96 pocillos de poliestireno de fondo plano (Falcon®, Corning, NY, EE. UU.) añadiendo 200 µl por pocillo de una suspensión con 30.000 células por mililitro y 48 horas de incubación (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Después, cada pocillo fue lavado tres veces con 150 µl de tampón fosfato salino (PBS) estéril (Gibco®, Massachusetts, EE. UU.) con el fin de eliminar el antibiótico del medio.

Con el fin de proceder a la infección celular, cada micobacteria a estudio fue descongelada, sembrada en agar triptosa soja + 5% sangre de carnero (TSS) (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) e incubada durante 72 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Las células fueron infectadas con 150 µl de una suspensión 0,5 McFarland (McF) de cada micobacteria en medio Middlebrook 7H9 (BD, EE. UU.) durante una hora (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). La concentración de 0,5 McF se evaluó por turbidimetría (DensiCHEK™ plus Instrument, bioMérieux, Francia). Después de la infección, los pocillos fueron lavados tres veces con 150 µl de PBS estéril con el fin de eliminar micobacterias extracelulares. Para finalizar, se realizó una lisis hipotónica de las células infectadas. Para ello, se añadieron 150 µl de agua estéril a cada pocillo para romper las membranas plasmáticas celulares y liberar las micobacterias intracelulares[194, 195]. A partir de cada pocillo se realizaron

diluciones seriadas 1:10 y se sembró cada dilución siguiendo la técnica “drop-plate”[196] en agar TSS. Las placas se incubaron durante 72 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> y se procedió al recuento de colonias.

Se utilizó un control negativo (células sin infectar) por cada cepa. El experimento fue realizado por triplicado.

El análisis estadístico fue realizado con el programa STATA (StataCorp2009). Se utilizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon para la comparación por pares. Los valores utilizados fueron mediana y rango intercuartílico.

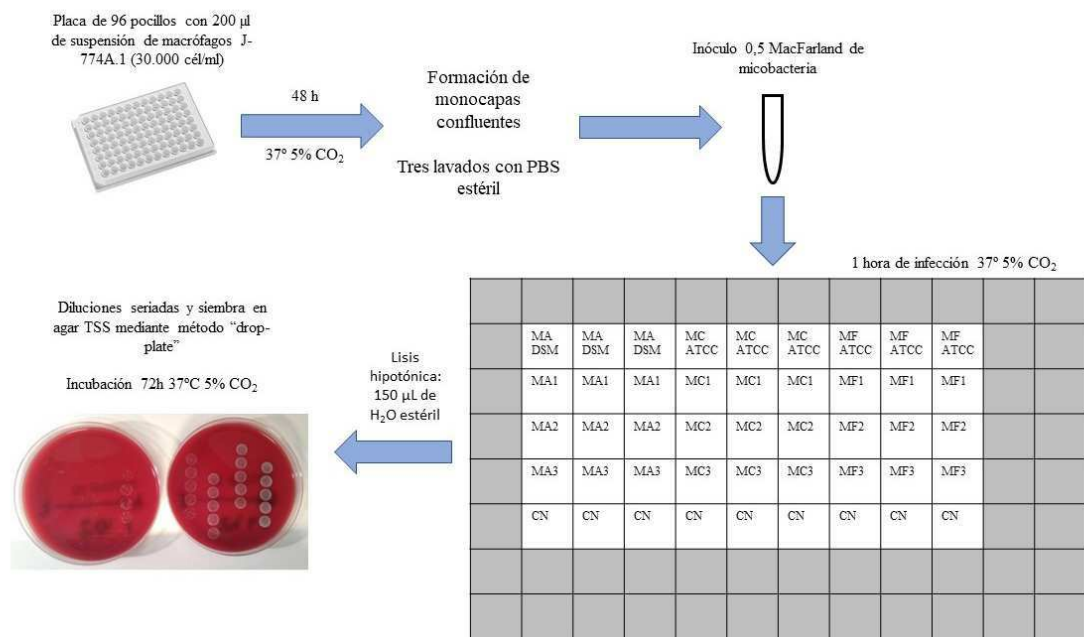


Figura 9. Esquema del procedimiento para la evaluación de la patogenicidad de MNPCR en macrófagos.

#### 4.1.2. Modelo *in vivo* con larvas de *Galleria mellonella*.

Las cepas de micobacterias fueron descongeladas y sembradas en agar TSS e incubadas 72 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Con el fin de obtener una suspensión homogénea para poder inyectar en las larvas, cada micobacteria fue resuspendida en medio Middlebrook 7H9 con un 0,005% de Tween (BD, EE. UU) e incubada

## Material y métodos

a 37°C y agitación (80 rpm) durante 72 horas. Antes de la inoculación a las larvas, cada suspensión fue centrifugada y lavada con suero salino por duplicado.

Las larvas de *G. mellonella* (BioSystems Technology Ltd, Exeter, Devon, Reino Unido) se mantuvieron a 15°C durante las 24 horas previas al inicio del experimento. Fueron infectadas (en grupos de 10) por inyección a través del último propodio izquierdo con 10 µl de inóculo (1 McF, 10<sup>6</sup> UFC en 10 µl, por turbidimetría) de cada cepa de micobacteria. Después de la infección, fueron incubadas a 37°C.

Los parámetros evaluados fueron: supervivencia, actividad, melanización y formación de pupa, siguiendo el sistema “Health Index Scoring”[197]. Las observaciones fueron realizadas en intervalos de 24 horas y durante 7 días en total. Como controles negativos se utilizaron un grupo de larvas sin manipular y otro grupo a las que se inoculó solución salina. Se recuperó la micobacteria a estudio mediante cultivo convencional de cada larva muerta.

El análisis estadístico fue realizado con el programa STATA (StataCorp2009). Se utilizó la prueba estadística log-rank para la comparación por pares de las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier. La actividad y melanización se evaluaron mediante un modelo de regresión lineal, y las pendientes se compararon mediante la prueba paramétrica t de Student de comparación por pares, teniendo en cuenta o no la desigualdad de la varianza.

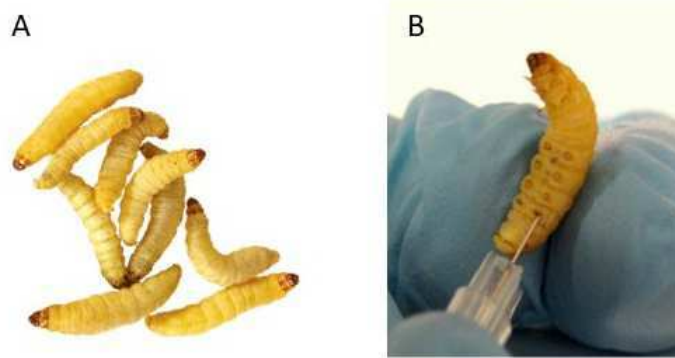


Figura 10. Larvas de *G. mellonella* (A). Inyección en propodio (B).

#### 4.2. Evaluación del efecto de *Methylobacterium sp.* sobre biopelículas de *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum*.

Las micobacterias utilizadas en estos experimentos fueron cepas colección de las tres MNPCR más relevantes clínicamente: *M. abscessus* DSM 44196, *M. chelonae* ATCC 19235 y *M. fortuitum* ATCC 6841. Las cepas se mantuvieron congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  en leche desnatada estéril. La cepa colección de *Methylobacterium sp.* utilizada fue *Methylobacterium sp.* CECT 7805. Se mantuvo congelada a  $-20^{\circ}\text{C}$  en leche desnatada estéril. Para su crecimiento en medio sólido se utilizó agar TSS y requirió una incubación de 5 días a  $30^{\circ}\text{C}$ .

*Methylobacterium sp.* CECT 7805 fue usada de tres formas:

- *Methylobacterium sp. vivo*: Se preparó suspendiendo colonias en medio líquido Middlebrook 7H9 hasta alcanzar una turbidez de 2 McF ( $6 \times 10^8$  UFC/ml).
- *Methylobacterium sp. autoclavado*: Se realizó suspendiendo colonias en PBS hasta alcanzar una turbidez de 4 McF ( $1.2 \times 10^9$  UFC/ml). Esta suspensión se

## Material y métodos

sometió a 121°C (15 psi) durante 20 minutos en autoclave. La concentración final de esta suspensión se ajustó a 2 McF por dilución con Middlebrook 7H9.

- Extracto de *Methylobacterium sp.*: Se sonicó una suspensión 4 McF de *Methylobacterium sp.* usando un sonicador UP200H (Hielscher, Alemania) durante 1,5 minutos en intervalos de 30 segundos (1 ciclo, 100 Amp), parando 5 minutos entre cada intervalo. Después las muestras fueron centrifugadas a 5000 x g a 4°C durante 10 minutos. Los sobrenadantes fueron separados y congelados a -80°C para ser utilizados en los experimentos.

### 4.2.1. Evaluación mediante microscopía confocal láser de barrido.

Las biopelículas de micobacterias fueron desarrolladas utilizando placas de 2x4 pocillos con superficie hidrófoba y sin recubrimiento (Ibidi GMBH, Martinsried, Alemania), siguiendo el protocolo desarrollado por Muñoz-Egea y colaboradores[38]. Antes del inicio de cada experimento se procedió a la descongelación, siembra e incubación (72 h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) de las micobacterias en placas de agar TSS. Una vez crecidas, las micobacterias se resuspendieron en PBS (bioMérieux, Francia) hasta alcanzar una concentración de 0,5 McF (equivalente a 1,5x10<sup>8</sup> UFC/ml) mediante turbidimetría. En cada pocillo fueron inoculados 300 µl de una suspensión 0,5 McF de la micobacteria a estudio. Una vez inoculada toda la placa, fue incubada a 37°C y atmósfera de CO<sub>2</sub> durante 30 minutos. Después de este tiempo, la suspensión fue retirada y los pocillos fueron lavados con PBS. Se añadieron 300 µl de medio líquido Middlebrook 7H9 a cada pocillo y la placa se colocó en un agitador orbital (80 rpm) y se incubó a 37°C durante 24 horas. Después, fueron añadidos 300 µl de *Methylobacterium sp.* CECT 7805 en tres formas (cada una de ellas en placas independientes) en las

biopelículas de *M. abscessus* (*Methylobacterium sp.* vivo, autoclavado y un extracto del mismo) y en dos formas en las biopelículas de *M. chelonae* y *M. fortuitum* (*Methylobacterium sp.* autoclavado y extracto) a las 24, 48 y 72 horas, dejando un pocillo como control (96 horas). El medio fue cambiado diariamente y el experimento fue realizado por triplicado.

Las placas fueron teñidas con la tinción Nile Red<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) en la fila de pocillos de arriba y con la tinción Live/Dead BacLight<sup>®</sup> (Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kit, Invitrogen, EE. UU) en la fila de pocillos de abajo, de acuerdo con las instrucciones provistas por el fabricante. Se añadieron 25 µl de tinción a cada pocillo. Las placas con la tinción se incubaron durante 15 minutos en oscuridad, a temperatura ambiente y en cámara húmeda, y posteriormente se lavaron con agua destilada estéril.

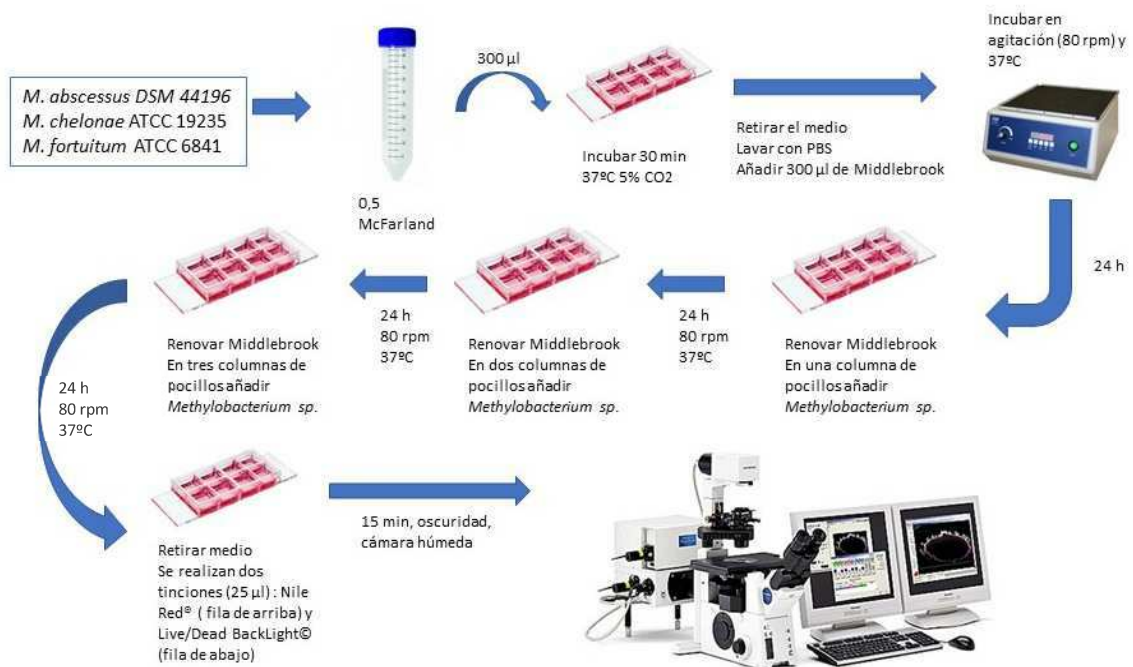


Figura 11. Esquema del procedimiento para el estudio del efecto de *Methylobacterium sp.* sobre biopelículas de MNPCR mediante microscopía confocal láser de barrido.

## Material y métodos

Después de la tinción, cada pocillo fue analizado usando un microscopio confocal láser de barrido (Leica, Germany) (MCLB). Las placas se observaron con el objetivo de inmersión HCX PL APO lambda blue 63,0 x 1,40 OIL UV, y se emplearon diferentes láseres en función del parámetro a estudiar.

Parámetros	Excitación (nm)	Emisión (nm)	Descripción
Autofluorescencia	Diode 405	450-480	Fluorescencia emitida por las propias micobacterias (azul)
Nile Red <sup>®</sup>	HeNe 543	600-650	Nile Red es una molécula que se une a lípidos de células bacterianas. Emite fluorescencia roja en ambientes hidrofóbicos.
Live/Dead BacLight <sup>®</sup>	Argón 488	Verde: 500-550	Fluorescencia verde emitida por células vivas
		Roja: 610-670	Fluorescencia roja emitida por células muertas

Tabla 3. Espectros de excitación y emisión empleados en el CLSM[198].

El espesor de las biopelículas, en micrómetros, fue medido en ocho puntos diferentes en cada pocillo empleando ZOOM 2. La fórmula utilizada fue:

**Media espesores  $\pm$  Desviación estándar ( $\mu\text{m}$ )**

El porcentaje de superficie cubierta fue estudiado tomando 24 microfotografías de cada forma de *Methylobacterium sp.* y cada tiempo empleando ZOOM 1. Estas fotografías fueron analizadas con el programa Image J (National Institute of Health, Bethesda, MD, EE. UU). Se calculó a partir de los resultados obtenidos mediante la tinción Nile Red<sup>®</sup> mediante la fórmula:

**Media Nile Red  $\pm$  Desviación estándar (%)**

La autofluorescencia fue analizada como el porcentaje de fluorescencia relacionada con el número de células bacterianas detectadas con la tinción Nile Red© empleando la fórmula:

$$\frac{\% \text{ autofluorescencia superficie cubierta}}{\% \text{ Nile Red superficie cubierta}} \times 100$$

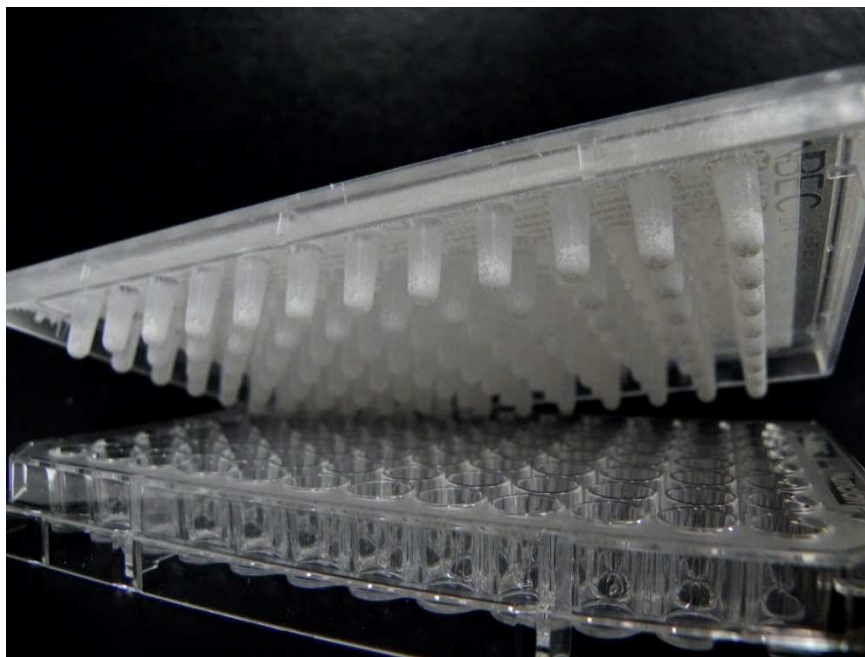
Para calcular el porcentaje de bacterias muertas se tomaron 24 microfotografías de cada forma de *Methylobacterium sp.* y cada tiempo empleando ZOOM 1 y después de analizarlas con el programa Image J, se utilizaron los resultados obtenidos con la tinción Live/Dead BacLight© empleando la fórmula:

$$\frac{\% \text{ bacterias muertas}}{\text{total bacterias vivas y muertas}} \times 100$$

Los datos estadísticos se analizaron mediante comparaciones por pares utilizando la prueba no paramétrica de Mann-Whitney con un nivel de significación estadística de 0,05 utilizando el programa STATA (Stata Corp 2009).

#### **4.2.2. Evaluación mediante recuento bacteriano utilizando el método de Calgary modificado.**

Con el fin de replicar el mismo experimento realizado anteriormente, las biopelículas de micobacterias fueron desarrolladas utilizando placas *MBEC<sup>TM</sup> Biofilm Inoculator* (Innovotech, Canadá) con la intención de desarrollar un protocolo basado en el método de Calgary[199].



**Figura 12.** Detalle de placa de 96 pocillos con proyecciones (*MBEC™ Biofilm Inoculator*) utilizada en el método de Calgary. Imagen tomada de <http://www.innovotech.ca>.

Doscientos microlitros de una suspensión 0,5 McF (medido por turbidimetría) en medio líquido Middlebrook 7H9 de la especie de micobacteria a estudio fueron inoculados en 20 pocillos (cuatro columnas de 5 pocillos cada una). La placa fue llevada a un agitador orbital (80 rpm) e incubada a 37°C en atmósfera normal durante 24 horas. La formación de las biopelículas se desarrolló en las proyecciones salientes de la tapa. Pasadas 24 horas, en otra placa de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE. UU) se prepararon 200 µl de medio Middlebrook en la primera, tercera y cuarta columna correspondientes al día anterior (5 pocillos cada una) y en la segunda columna 200 µl de *Methylobacterium sp.* (autoclavado o extracto). Después, se intercambió la tapa normal por la tapa con proyecciones en las que ya había formada biopelículas y se incubó durante otras 24 horas. A las 48 y 72 horas el proceso fue similar al anterior pero el tratamiento con *Methylobacterium sp.* se fue añadiendo a una

columna más, es decir, a las 48 horas en la segunda y tercera columna y a las 72 horas en todas menos en la primera. De esta manera se consigue un control de 96 horas y un tratamiento progresivo sobre la biopelícula de 24 h, 48 h y 72 h.

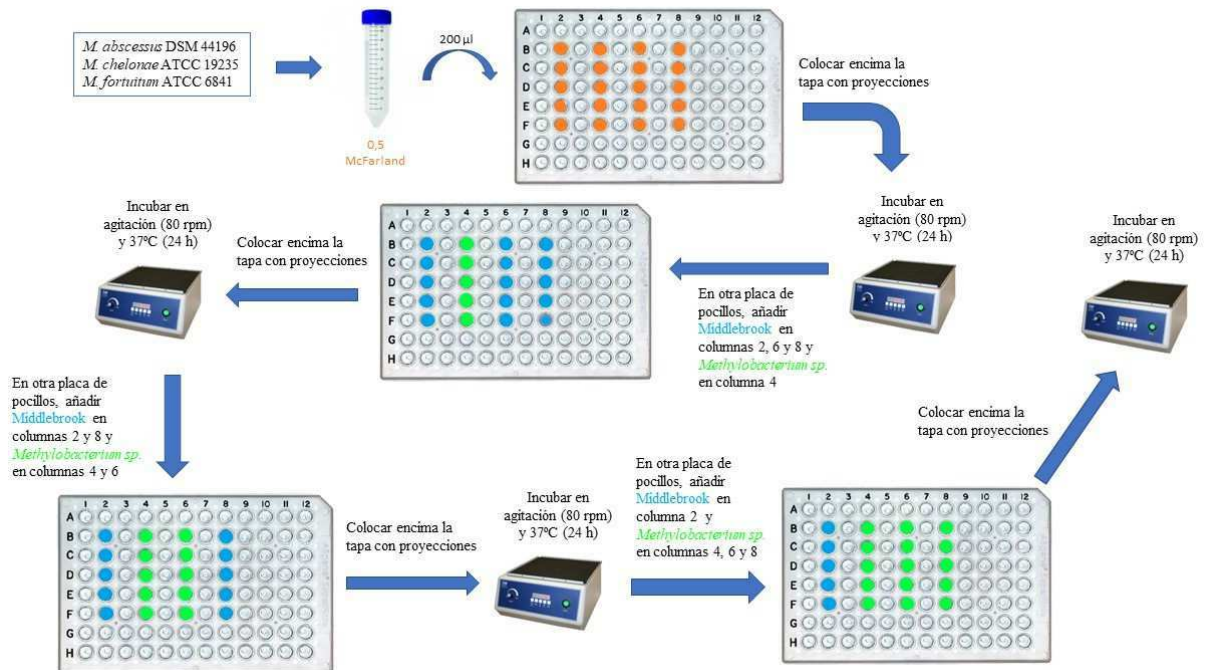


Figura 13. Esquema del procedimiento para el estudio del efecto de *Methylobacterium sp.* sobre biopelículas de MNPCR mediante método de Calgary modificado (parte 1).

Pasados estos tiempos, las tapas con proyecciones se lavaron dos veces con PBS, se colocaron en placas de pocillos con medio Middlebrook 7H9 y fueron sometidas a sonicación durante 5 minutos con un sonicador Ultrasons-H 3000840 (J. P. Selecta, Barcelona, España). Las bacterias que formaban la biopelícula se desprendieron y quedaron en medio Middlebrook 7H9. A partir de cada pocillo se realizaron diluciones seriadas 1:10 y se sembró cada dilución siguiendo la técnica “drop-plate” en agar TSS.

## Material y métodos

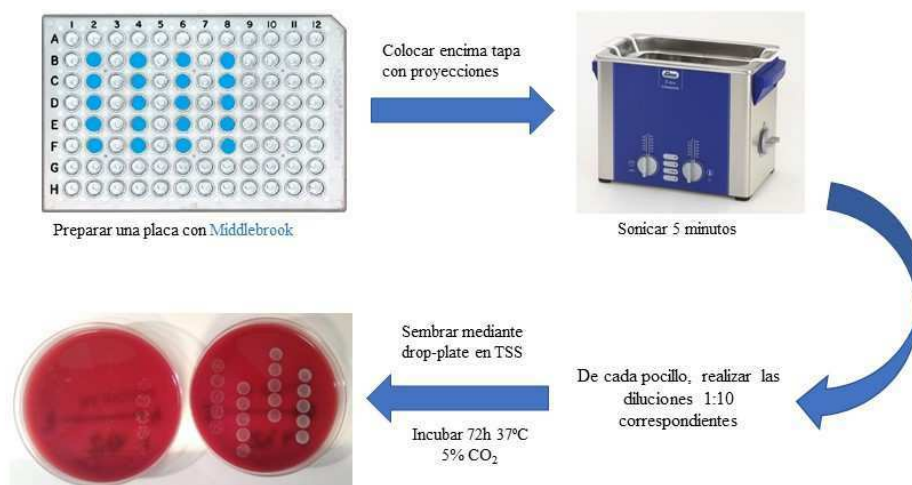


Figura 14. Esquema del procedimiento para el estudio del efecto de *Methylobacterium sp.* sobre biopelículas de MNPCR mediante método de Calgary modificado (parte 2).

Las placas se incubaron durante 72 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> y se procedió al recuento de colonias.

Los datos estadísticos se analizaron mediante comparaciones por pares utilizando la prueba no paramétrica de Mann-Whitney con un nivel de significación estadística de 0,05 utilizando el programa STATA.

### 4.3. Evaluación del efecto de *Methylobacterium sp.* combinado con claritromicina sobre biopelículas de *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum*.

Las cepas de micobacterias y *Methylobacterium sp.* utilizadas en este experimento fueron las mismas que en el experimento anterior (4.2). En este caso, *Methylobacterium sp.* solo se utilizó en las formas autoclavado y extracto.

#### **4.3.1. Evaluación mediante microscopía confocal láser de barrido.**

El protocolo fue el mismo que el seguido en el experimento 4.2.1. La única diferencia fue que *Methylobacterium sp.* se combinó con el antibiótico claritromicina. Para ello, se preparó una solución madre de claritromicina 4 mg/ml mediante disolución de 4 mg de este antibiótico en 1 ml de dimetilsulfóxido y se mantuvo congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Semanalmente se descongeló para diluir el volumen necesario en medio Middlebrook 7H9 alcanzando la concentración de 4 mg/l. Como se utilizó combinada con *Methylobacterium sp.* en proporción 1:1, la concentración final de claritromicina fue 2 mg/l.

#### **4.3.2. Evaluación mediante recuento bacteriano utilizando el método de Calgary modificado.**

El protocolo fue el mismo que el seguido en el experimento 4.2.2, pero *Methylobacterium sp.* se utilizó combinado con claritromicina en una concentración final de 2 mg/l. La preparación de claritromicina fue la misma que la seguida en el punto 4.3.1.



## **5. RESULTADOS**



## 5.1. Evaluación de la patogenicidad de *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum* según la morfología de colonia lisa/ rugosa.

### 5.1.1. Modelo *in vitro* por fagocitosis en macrófagos.

Los resultados del recuento de colonias expresados en log UFC/10<sup>4</sup> células pueden verse reflejados en la Figura 15.

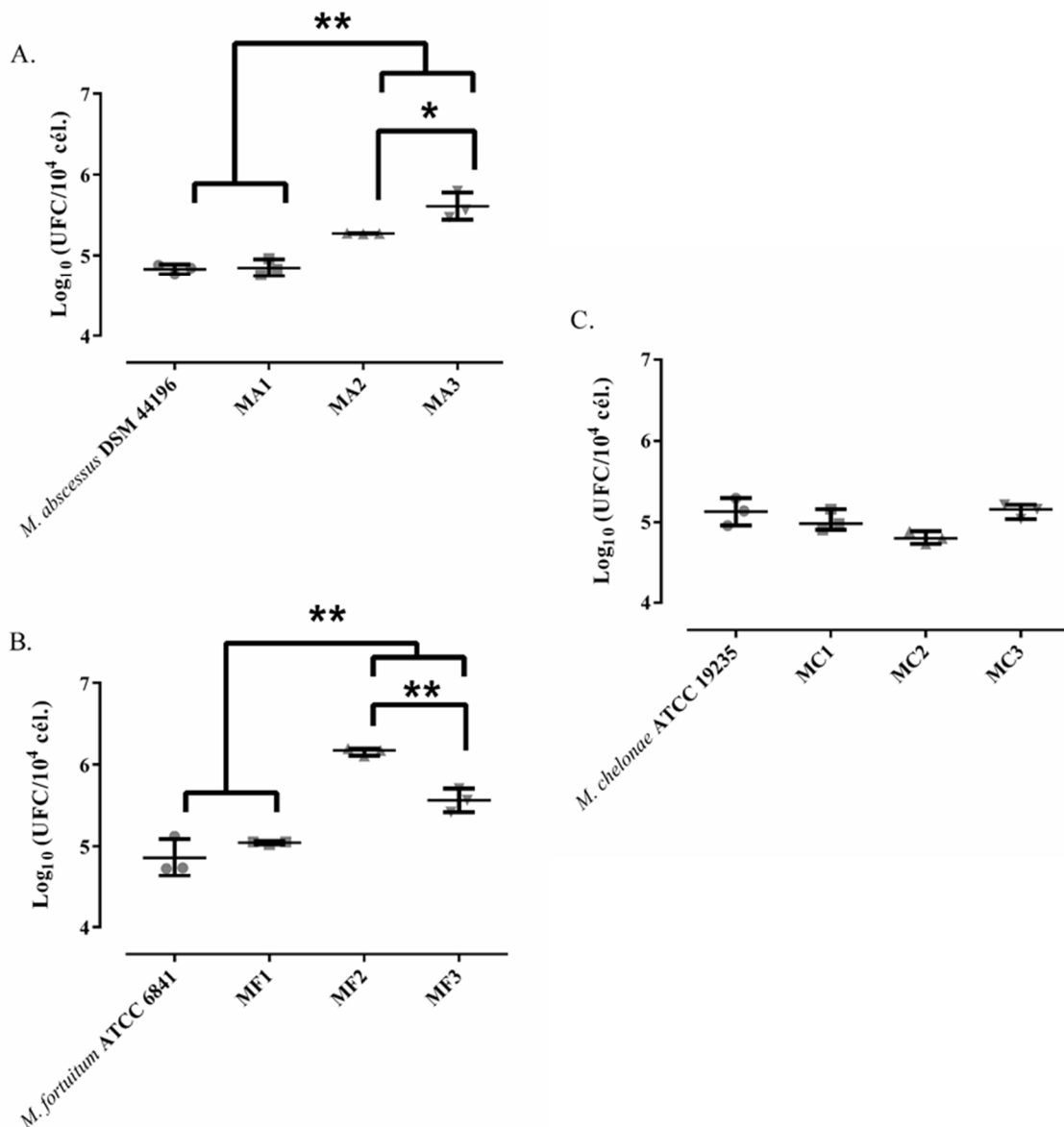


Figura 15. Representación del recuento de colonias (expresado en log UFC/10<sup>4</sup> células) de micobacterias fagocitadas por los macrófagos J-774A.1. (\*) Estadísticamente significativo.

## Resultados

Los resultados de *M. abscessus* corresponden a la Figura 15A. No se observaron diferencias significativas en el recuento bacteriano entre *M. abscessus* DSM 44196 y MA1 (ambas cepas de colonia lisa) ( $p=1,000$ ). Sin embargo, el recuento de colonias fue mayor en MA3 que en MA2 (ambas cepas de colonia rugosa) ( $p=0,024$ ). Comparando las dos cepas de colonia rugosa (MA2 y MA3) con las cepas de colonia lisa (*M. abscessus* DSM 44196 y MA1), la fagocitosis fue mayor en las cepas de colonia rugosa ( $p=0,0003$ ).

En la Figura 15B están representados los resultados para *M. fortuitum*. Se observaron diferencias significativas en la fagocitosis entre las cepas de colonia rugosa (MF2 y MF3) y las cepas de colonia lisa (*M. fortuitum* ATCC 6841 y MF1), siendo los valores de  $\log \text{UFC}/10^4$  células mayores en las cepas de colonia rugosa ( $p=0,0001$ ). No se encontraron diferencias significativas al comparar entre sí las dos cepas de colonia lisa ( $p=0,837$ ); sin embargo, si hubo diferencias entre las cepas de colonia rugosa, siendo mayor el recuento bacteriano en MF2 ( $p=0,004$ ).

Como muestra la figura 15C, la infección con *M. chelonae* no produjo mayor fagocitosis en cepas con un fenotipo de colonia u otro, de hecho, no se encontraron diferencias significativas entre las cuatro cepas ( $p>0,05$ ).



Figura 16. Tinción de Zielh-Neelsen de un macrófago con micobacterias fagocitadas.

### 5.1.2. Modelo *in vivo* con larvas de *Galleria mellonella*.

Como controles negativos se utilizaron un grupo sin manipular, y un grupo al que se le inyectó solución salina. Entre estos dos grupos no hubo diferencias significativas en mortalidad ( $p=0,860$ ), demostrando así que no hubo muertes por causa de la inyección. Si hubo diferencias estadísticamente significativas al comparar cualquiera de los controles negativos con todos los grupos de larvas infectados, siendo mayor la mortalidad siempre en los grupos infectados con micobacterias ( $p<0,001$  para todas las cepas).

#### Evaluación de la mortalidad.

En las larvas infectadas con *M. abscessus*, la mortalidad fue similar en los dos grupos infectados con cepas de colonia rugosa ( $p=0,595$ ), y se detectó el mismo resultado al comparar los dos grupos infectados por cepas de colonia lisa ( $p=0,201$ ). Cuando comparamos el total de larvas infectadas por cepas de micobacterias con morfología de colonia lisa ( $n=60$ ) con el total de larvas infectadas con cepas de colonia rugosa ( $n=60$ ), pudimos comprobar que la diferencia era significativa, siendo mayor la supervivencia en larvas infectadas con micobacterias con morfología de colonia lisa ( $p<0,001$ ) (Figura 17A).

En las larvas infectadas con *M. fortuitum*, los hallazgos fueron similares entre las dos cepas de colonia lisa ( $p=1,000$ ). Sin embargo, sí se encontraron diferencias significativas en mortalidad entre las dos cepas de colonia rugosa ( $p=0,008$ ), causando la cepa MF3 más mortalidad que la cepa MF2. Al comparar el total de larvas infectadas con cepas de colonia lisa ( $n=60$ ) con el total de larvas infectadas con cepas de colonia rugosa ( $n=60$ ), comprobamos que el mayor porcentaje de supervivencia correspondía a las larvas infectadas con cepas de colonia lisa

## Resultados

( $p < 0,001$ ). Además, comparamos cada cepa de colonia rugosa con cada cepa de colonia lisa y en todos los casos causaron mayor mortalidad las cepas de colonia rugosa que las de colonia lisa ( $p < 0,05$  en todos los casos) (Figura 17B).

En el caso de *M. chelonae*, no hubo diferencia significativa al comparar los grupos de larvas infectados con cepas de colonia rugosa con aquellos infectados con cepas de colonia lisa ( $p = 0,338$ ). De hecho, ni siquiera hubo diferencia al comparar cada una de las cepas entre sí ( $p > 0,05$ ) (Figura 17C).

### Evaluación de la actividad.

El valor más alto de actividad fue encontrado en el grupo de larvas control.

En el modelo de infección por *M. abscessus*, la puntuación del parámetro actividad fue significativamente más baja en los grupos infectados que en el grupo control ( $p < 0,05$ ). Además, estas puntuaciones fueron más bajas en las larvas de *G. mellonella* infectadas con cepas de colonia rugosa que en larvas infectadas con cepas de colonia lisa ( $p < 0,05$ ) (Figura 17D).

En las larvas infectadas con *M. fortuitum* y *M. chelonae* los resultados fueron similares: las puntuaciones de actividad fueron significativamente menores ( $p < 0,05$ ) en grupos de larvas infectados con cepas de colonia rugosa que en grupos infectados con cepas de colonia lisa (Figura 17E y Figura 17F).

### Evaluación de la melanización.

El grupo control evidenció una menor producción de pigmentación oscura en la piel, lo que correspondió con la mayor puntuación, y por lo tanto pendiente, en las curvas. Esta diferencia fue significativa comparada con los grupos de larvas infectados ( $p < 0,001$ ).

En la infección por *M. abscessus*, las puntuaciones de melanización fueron menores en los grupos de larvas infectadas con cepas de colonia rugosa en relación con aquellas infectadas con cepas de colonia lisa, aunque las diferencias sólo fueron significativas entre *M. abscessus* DSM 44196 y MA2 ( $p=0,0468$ ) y entre MA1 y MA2 ( $p=0,0468$ ) (Figura 17G).

De manera similar, en la infección por *M. fortuitum*, las puntuaciones de melanización fueron menores en larvas infectadas con cepas de colonia rugosa, pero las diferencias sólo fueron significativas entre *M. fortuitum* ATCC 6841 y MF2 ( $p<0,001$ ) y entre *M. fortuitum* ATCC 6841 y MF3 ( $p<0,001$ ) (Figura 17H).

Por otro lado, las puntuaciones de melanización en *M. chelonae* fueron diferentes para cada cepa; el valor más bajo correspondió a una cepa de colonia lisa (MC1) y el valor más alto a una cepa de colonia rugosa (MC3) (Figura 17I). Por lo tanto, *M. chelonae* siguió un patrón diferente al resto de micobacterias.

### Evaluación de la formación de pupa.

La formación de pupa fue mayor en el grupo control con respecto a los grupos infectados (Figuras 17J, 17K, 17L), pero no fue posible establecer relaciones significativas entre este parámetro y la morfología de colonia lisa o rugosa.

## Resultados

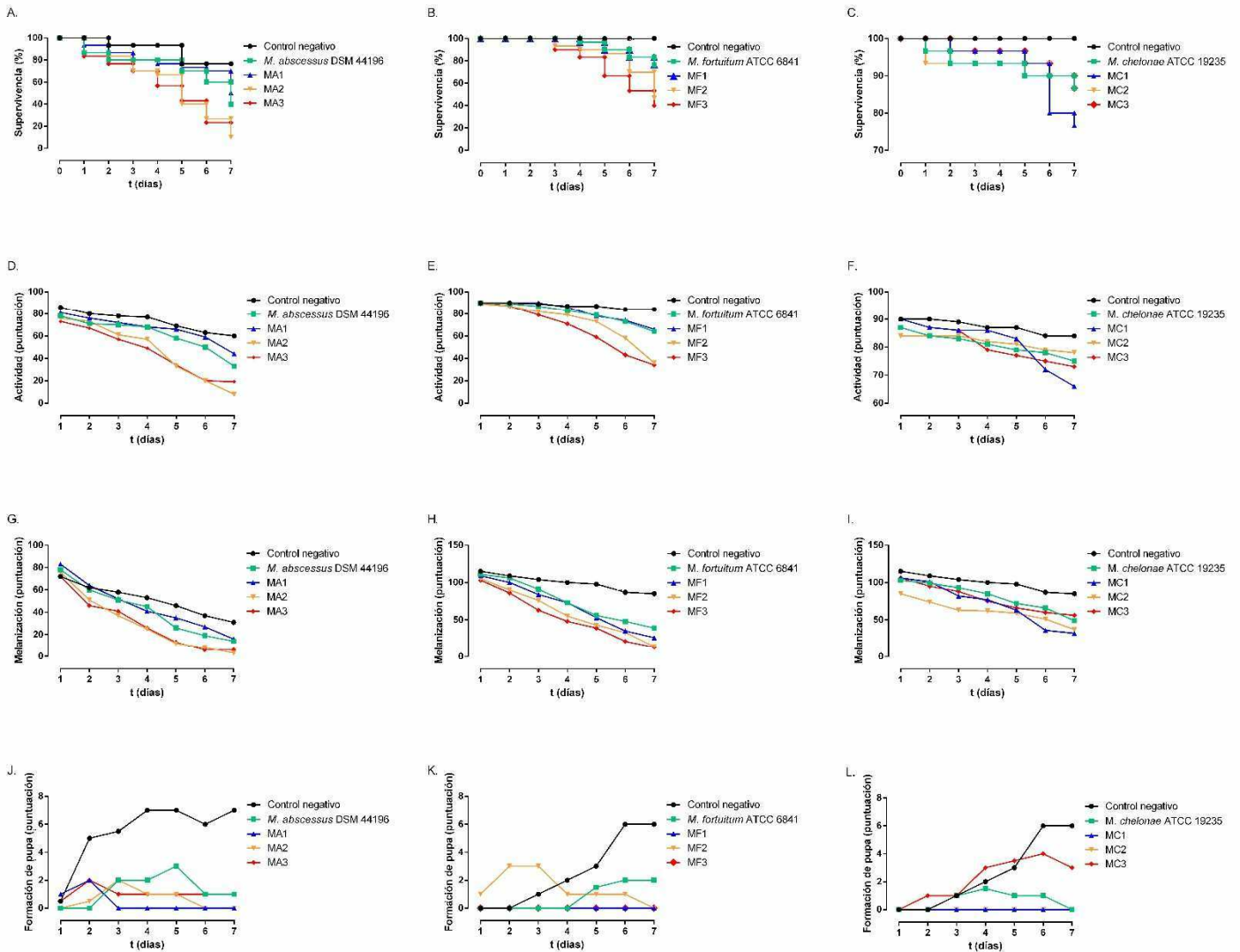


Figura 17. Porcentaje de supervivencia (A, B, C), puntuación de actividad (D, E, F), puntuación de melanización (G, H, I) y puntuación de formación de pupa (J, K, L) de larvas de *G. mellonella* sometidas a infección con *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum*.

Categoría	Descripción	Puntuación
Supervivencia	Muertas	0
	Vivas	2
Actividad	No movimiento	0
	Mínimo movimiento con estimulación	1
	Movimiento con estimulación	2
	Movimiento sin estimulación	3
Melanización	Larva negra	0
	Larva marrón	1
	≥ 3 puntos en larva	2
	≤ 3 puntos en larva	3
	No melanización	4
Formación de pupa	No pupa	0
	Pupa parcial	0,5
	Pupa completa	1

Tabla 4. Health Index Scoring System para la evaluación de larvas de *Galleria mellonella*.

## **5.2. Evaluación del efecto de *Methylobacterium sp.* sobre biopelículas de *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum*.**

### **5.2.1. Evaluación mediante microscopía confocal láser de barrido.**

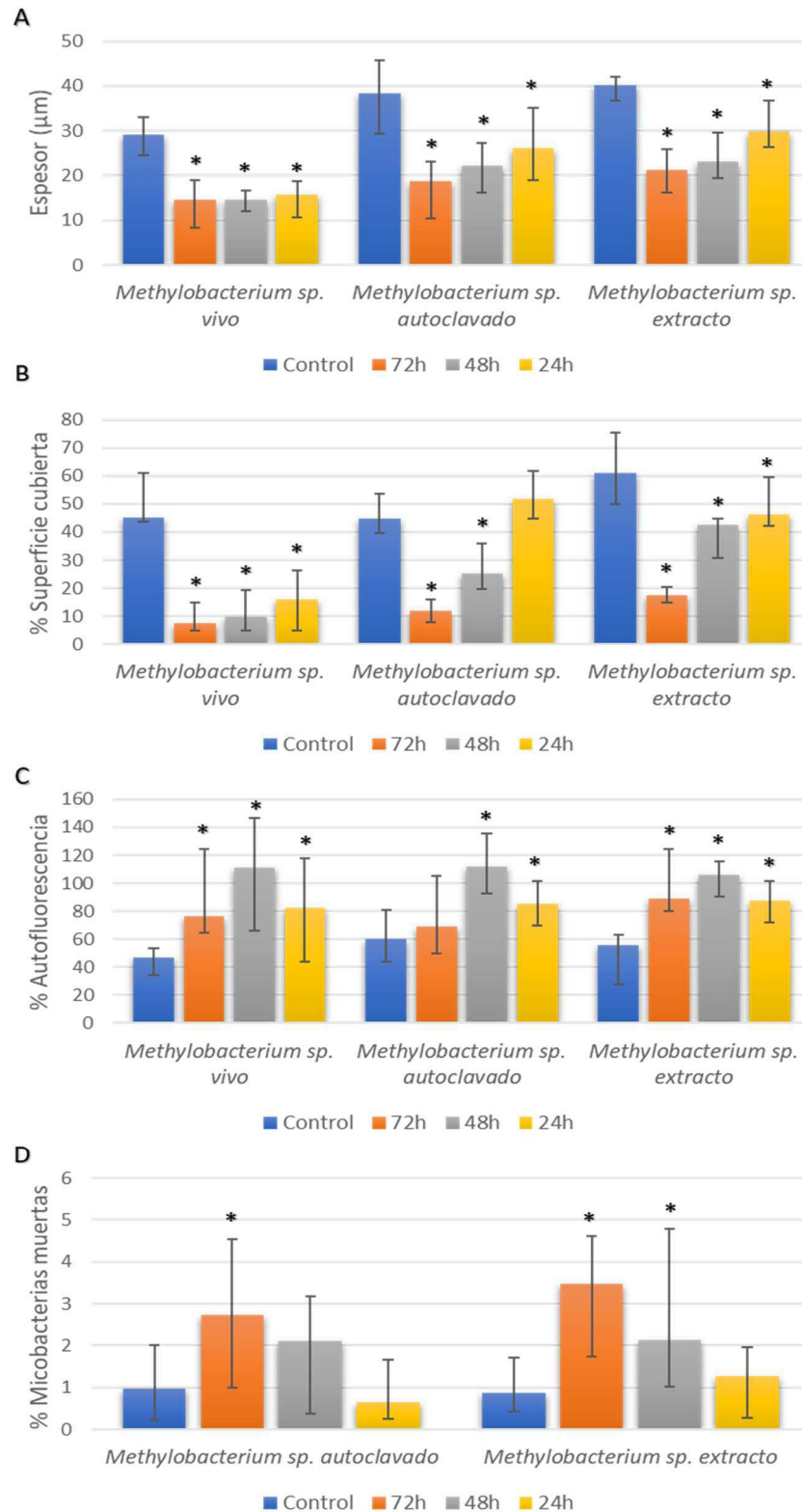
#### **5.2.1.1. Efecto de *Methylobacterium sp.* sobre biopelículas de *M. abscessus*.**

Los resultados obtenidos del análisis del porcentaje de superficie cubierta, espesor, autofluorescencia y porcentaje de bacterias muertas pueden ser observados en la Figura 18.

Se observó reducción en el espesor y en el porcentaje de superficie cubierta de la biopelícula de *M. abscessus* tras su exposición a todas las formas de *Methylobacterium sp.*; mientras que el porcentaje de autofluorescencia aumentó. Los valores mínimos de superficie cubierta y de espesor se observaron después de la exposición de la biopelícula de *M. abscessus* a *Methylobacterium sp.* durante 72 horas ( $p < 0,001$ ); aunque la diferencia fue estadísticamente significativa en comparación con el control a todos los tiempos y con las tres formas de *Methylobacterium sp.* (Figuras 18A y 18B). La mayor emisión de autofluorescencia fue registrada a las 48 horas ( $p = 0,001$ ) (Figura 18C), siendo las diferencias con el control estadísticamente significativas en todos los casos excepto a las 24 horas de exposición a *Methylobacterium sp.* autoclavado.

En cuanto al porcentaje de micobacterias muertas, se observó un incremento de este parámetro con la forma autoclavada a las 72 horas ( $p = 0,0198$ ) y con el extracto a las 48 y 72 horas ( $p = 0,0065$ ,  $p < 0,001$ ) (Figura 18D).

## Resultados



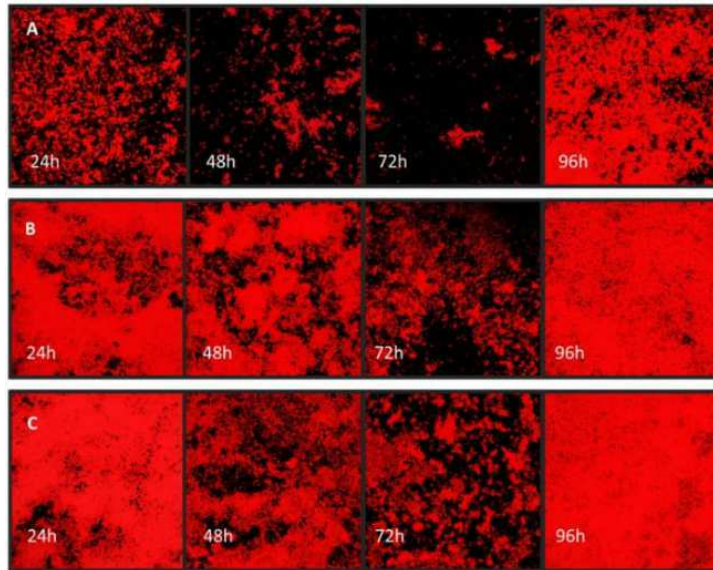
**Figura 18.** Efecto de *Methylobacterium sp.* (vivo, autoclavado y un extracto obtenido por sonicación) en diferentes parámetros de la biopelícula de *M. abscessus*: A) espesor ( $\mu\text{m}$ ), B) % de superficie cubierta, C) % de autofluorescencia, D) % de micobacterias muertas. Tiempo: horas de incubación con *Methylobacterium sp.* (24, 48 y 72h) y control sin *Methylobacterium sp.* (96h). \*Estadísticamente significativo con respecto al control.

En la tabla 5 se muestran los p valores provenientes de la comparación a diferentes tiempos de cada uno de los parámetros de las biopelículas de *M. abscessus* expuestas a las diferentes formas de *Methylobacterium sp.*[200].

<i>Methylobacterium sp. vivo</i>	Espesor (µm)	% superficie cubierta	% autofluorescencia	% micobacterias muertas
24-48 h	0,3404	0,1489	0,1333	
24-72 h	0,4824	0,1333	0,3865	
24h- control	<0,0001*	<0,0001*	0,0327*	
48-72 h	0,9835	0,4884	0,2482	
48h- control	<0,0001*	<0,0001*	0,0005*	
72h- control	<0,0001*	0,0001*	0,0005*	
<i>Methylobacterium sp. autoclavado</i>	Espesor (µm)	% superficie cubierta	% autofluorescencia	% micobacterias muertas
24-48 h	0,0401*	<0,001*	0,0078*	0,0949
24-72 h	0,0005*	<0,001*	0,4321	0,0069*
24h- control	0,0010*	0,0447*	0,0052*	0,3753
48-72 h	0,0311*	<0,001*	0,0244*	0,2482
48h- control	<0,001*	0,0001*	0,0001*	0,2482
72h- control	<0,001*	<0,001*	0,1543	0,0198*
<i>Methylobacterium sp. extracto</i>	Espesor (µm)	% superficie cubierta	% autofluorescencia	% micobacterias muertas
24-48 h	0,0009*	0,0111*	0,0377*	0,0373*
24-72 h	<0,001*	<0,001*	0,3291	0,0001*
24h- control	0,0001*	0,0087*	0,0003*	0,5499
48-72 h	0,1665	<0,001*	0,4642	0,1489
48h- control	<0,001*	<0,001*	<0,001*	0,0065*
72h- control	<0,001*	<0,001*	0,0001*	<0,001*

Tabla 5. Valores p obtenidos de las comparaciones a diferentes tiempos de los parámetros de las biopelículas de *M. abscessus* expuestas a las diferentes formas de *Methylobacterium sp.*

## Resultados



**Figura 19.** Efecto de *Methylobacterium sp.* en diferentes tiempos sobre biopelículas de *M. abscessus* usando *Methylobacterium sp.* vivo (A), autoclavado (B) y un extracto de *Methylobacterium sp.* (C). Las imágenes de 96 horas corresponden al control de una biopelícula de *M. abscessus* (Tinción Nile Red©) (200).

Se realizaron comparaciones entre las diferentes formas de *Methylobacterium sp.* (vivo, autoclavado y extracto) en el efecto que mostraron en los diferentes parámetros de la biopelícula de *M. abscessus* (tabla 6). El efecto fue mayor con *Methylobacterium sp.* vivo comparado con el autoclavado y el extracto. Fue demostrada la emisión de autofluorescencia en las biopelículas de *M. abscessus* y también fue detectada fluorescencia extracelular tras la exposición a *Methylobacterium sp.*

A las 72 horas, la diferencia entre la forma autoclavada de *Methylobacterium sp.* y el extracto fue estadísticamente significativa en cuanto a la reducción de la superficie cubierta de la biopelícula de *M. abscessus*, siendo mayor la reducción con la forma autoclavada. De forma similar, se observó una reducción significativa en este parámetro al comparar el extracto y las bacterias vivas, siendo mayor el efecto de *Methylobacterium sp.* vivo. Hubo diferencias

entre las bacterias autoclavadas y las bacterias vivas a las 24 y 48 horas de exposición, siendo mayor el efecto inhibitorio producido por las bacterias vivas, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa a las 72 horas.

		<i>Methylobacterium</i> <i>sp.</i> vivo vs. autoclavado	<i>Methylobacterium</i> <i>sp.</i> vivo vs. extracto	<i>Methylobacterium</i> <i>sp.</i> autoclavado vs. extracto
Espesor (µm)	24 h	<0,001*	<0,001*	0,2115
	48 h	<0,001*	<0,001*	0,4828
	72 h	0,1116	0,0012*	0,0510
% sup. cubierta	24 h	<0,001*	<0,001*	0,2617
	48 h	0,001*	<0,001*	0,0117*
	72 h	0,0803	0,004*	0,0046*
% autofluorescencia	24 h	0,9223	0,4892	0,7697
	48 h	0,7188	0,6861	0,3819
	72 h	0,3819	0,2046	0,1161
% muertas	24 h			0,3535
	48 h			0,4455
	72 h			0,3223

Tabla 6. Valores p obtenidos, para cada uno de los parámetros de las biopelículas de *M. abscessus*, de la comparación a la exposición a diferentes formas de *Methylobacterium sp.* a diferentes tiempos. (\*) Estadísticamente significativo[200].

En cuanto al espesor de la biopelícula, después de 72 horas de exposición, no hubo diferencias significativas entre el uso de *Methylobacterium sp.* vivo o autoclavado, pero si se encontró diferencia significativa entre el uso de bacteria

## Resultados

viva y extracto, siendo mayor la reducción del espesor de la biopelícula de *M. abscessus* cuando se utilizó bacteria viva. Al comparar bacteria autoclavada con extracto no hubo diferencias significativas.

Por otra parte, el porcentaje de autofluorescencia no se vio afectado por el uso de una u otra forma de *Methylobacterium sp.* Respecto al porcentaje de micobacterias muertas, no hubo diferencias significativas por el uso de *Methylobacterium sp.* autoclavado o extracto.

### **5.2.1.2. Efecto de *Methylobacterium sp.* sobre biopelículas de *M. chelonae*.**

Los resultados obtenidos del análisis del espesor, porcentaje de superficie cubierta, porcentaje de autofluorescencia y porcentaje de micobacterias muertas están representados en la Figura 20.

La superficie cubierta y el espesor fueron significativamente menores en las biopelículas de *M. chelonae* después de la exposición de estas a *Methylobacterium sp.* autoclavado y extracto a las 24, 48 y 72 horas comparado con el control ( $p < 0,001$  en todos los casos). La máxima inhibición de los dos parámetros fue detectada a las 72 horas (Figuras 20A y 20B). En cuanto al porcentaje de autofluorescencia, sólo se encontraron diferencias significativas con respecto al control cuando se utilizó la forma autoclavada de *Methylobacterium sp.* durante 48 ( $p < 0,001$ ) y 72 horas ( $p = 0,009$ ), disminuyendo la autofluorescencia en estos casos (Figura 20C).

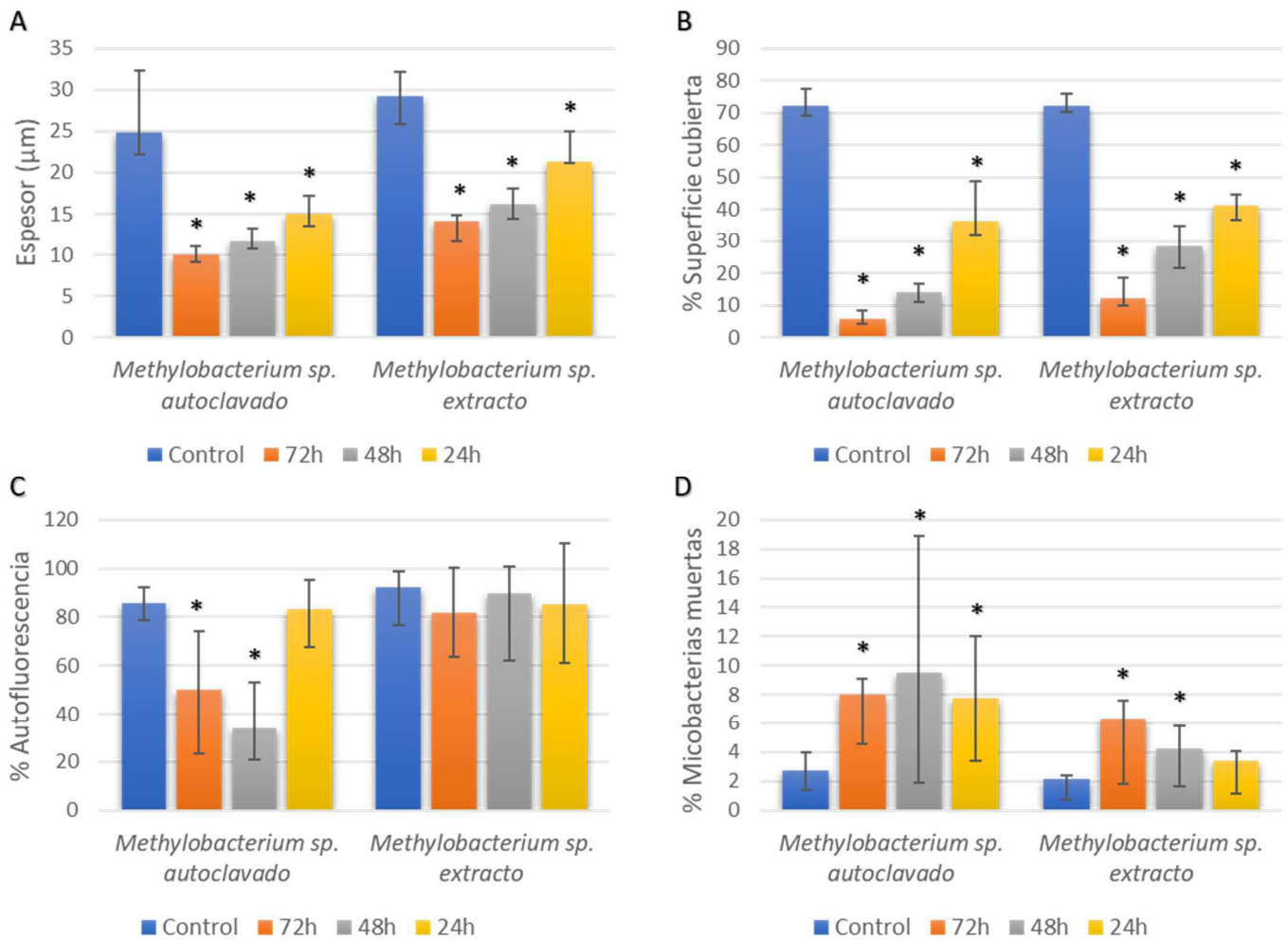
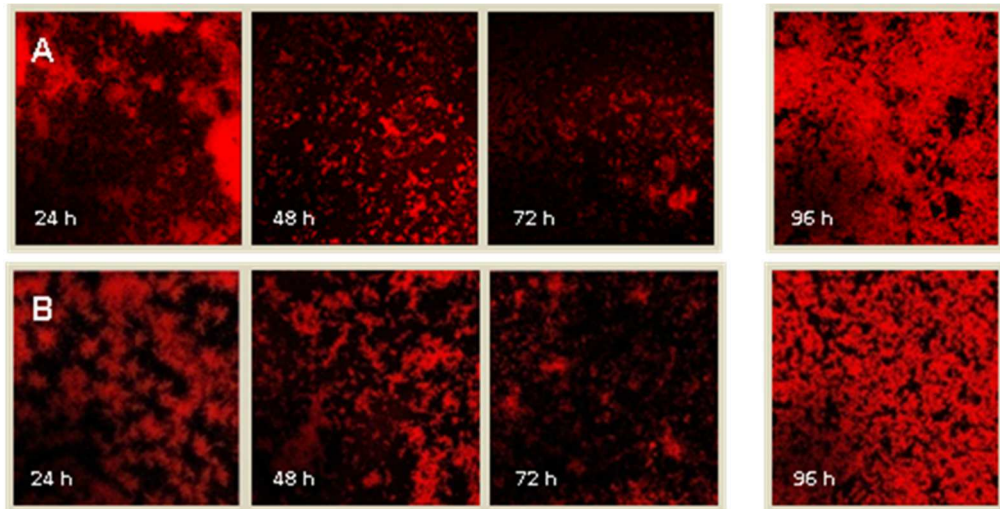


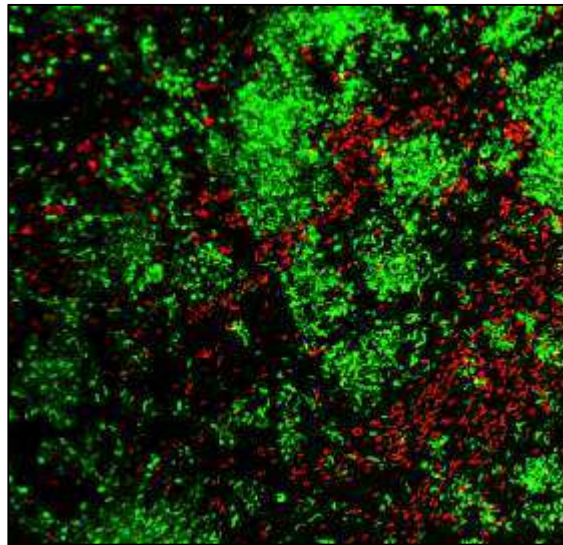
Figura 20. Efecto de *Methylobacterium sp.* (autoclavado y extracto) en diferentes parámetros de la biopelícula de *M. chelonae*: A espesor ( $\mu\text{m}$ ), B % superficie cubierta, C % autofluorescencia, D % micobacterias muertas. Tiempo: horas de incubación con *Methylobacterium sp.* (24, 48 y 72h) y control sin *Methylobacterium sp.* (96h). (\*) Estadísticamente significativo con respecto al control ( $p < 0,05$ ).

El porcentaje de micobacterias muertas se incrementó cuando la biopelícula de *M. chelonae* fue expuesta a *Methylobacterium sp.* autoclavado a todos los tiempos ( $p < 0,05$  en todos los casos). Con el extracto de *Methylobacterium sp.* el porcentaje de micobacterias muertas aumentó a las 48 horas ( $p = 0,0047$ ) y a las 72 horas ( $p = 0,0007$ ) (Figura 20D).

## Resultados



**Figura 21.** Efecto de *Methylobacterium sp.* en diferentes tiempos sobre biopelículas de *M. chelonae* usando *Methylobacterium sp.* autoclavado (A) y extracto bacteriano (B). Las imágenes de 96 horas corresponden al control de una biopelícula de *M. chelonae* (Tinción Nile Red®).



**Figura 22.** Biopelícula de *M. chelonae* tratada con extracto de *Methylobacterium sp.* durante 72 horas. Tinción Live/Dead BacLight®.

En la tabla 7 se muestran los p valores provenientes de la comparación a diferentes tiempos de cada uno de los parámetros de las biopelículas de *M. chelonae* expuestas a *Methylobacterium sp.* autoclavado y extracto.

<i>Methylobacterium</i> <i>sp.</i> autoclavado	Espesor ( $\mu\text{m}$ )	% superficie cubierta	% autofluorescencia	% micobacterias muertas
24-48 h	<0,001*	<0,001*	<0,001*	0,4962
24-72 h	<0,001*	<0,001*	0,0032*	0,6353
24h- control	<0,001*	<0,001*	0,7571	<0,001*
48-72 h	0,001*	<0,001*	0,1124	0,3025
48h- control	<0,001*	<0,001*	<0,001*	0,0119*
72h- control	<0,001*	<0,001*	0,009*	<0,001*
<i>Methylobacterium</i> <i>sp.</i> extracto	Espesor ( $\mu\text{m}$ )	% superficie cubierta	% autofluorescencia	% micobacterias muertas
24-48 h	<0,001*	<0,001*	>0,05	0,0990
24-72 h	<0,001*	<0,001*	>0,05	0,0187*
24h- control	<0,001*	<0,001*	>0,05	0,1432
48-72 h	0,001*	<0,001*	>0,05	0,3865
48h- control	<0,001*	<0,001*	>0,05	0,0047*
72h- control	<0,001*	<0,001*	>0,05	0,0007*

Tabla 7. Valores p obtenidos de las comparaciones a diferentes tiempos de los parámetros de las biopelículas de *M. chelonae* expuestas a las diferentes formas de *Methylobacterium sp.*

Cuando se comparó la forma autoclavada de *Methylobacterium sp.* con el extracto se detectaron diferencias significativas en la capacidad de reducción del espesor de la biopelícula de *M. chelonae*, viéndose más reducido en todos los tiempos con la forma autoclavada. En el parámetro superficie cubierta, la reducción también fue mayor con la forma autoclavada a las 48 y 72 horas, pero no hubo diferencias significativas con el extracto a las 24 horas. El porcentaje de autofluorescencia fue estadísticamente mayor con el extracto a las 48 y 72 horas, pero no hubo diferencias a las 24 horas. El porcentaje de micobacterias muertas fue mayor con *Methylobacterium sp.* autoclavado a las 24 y 72 horas.

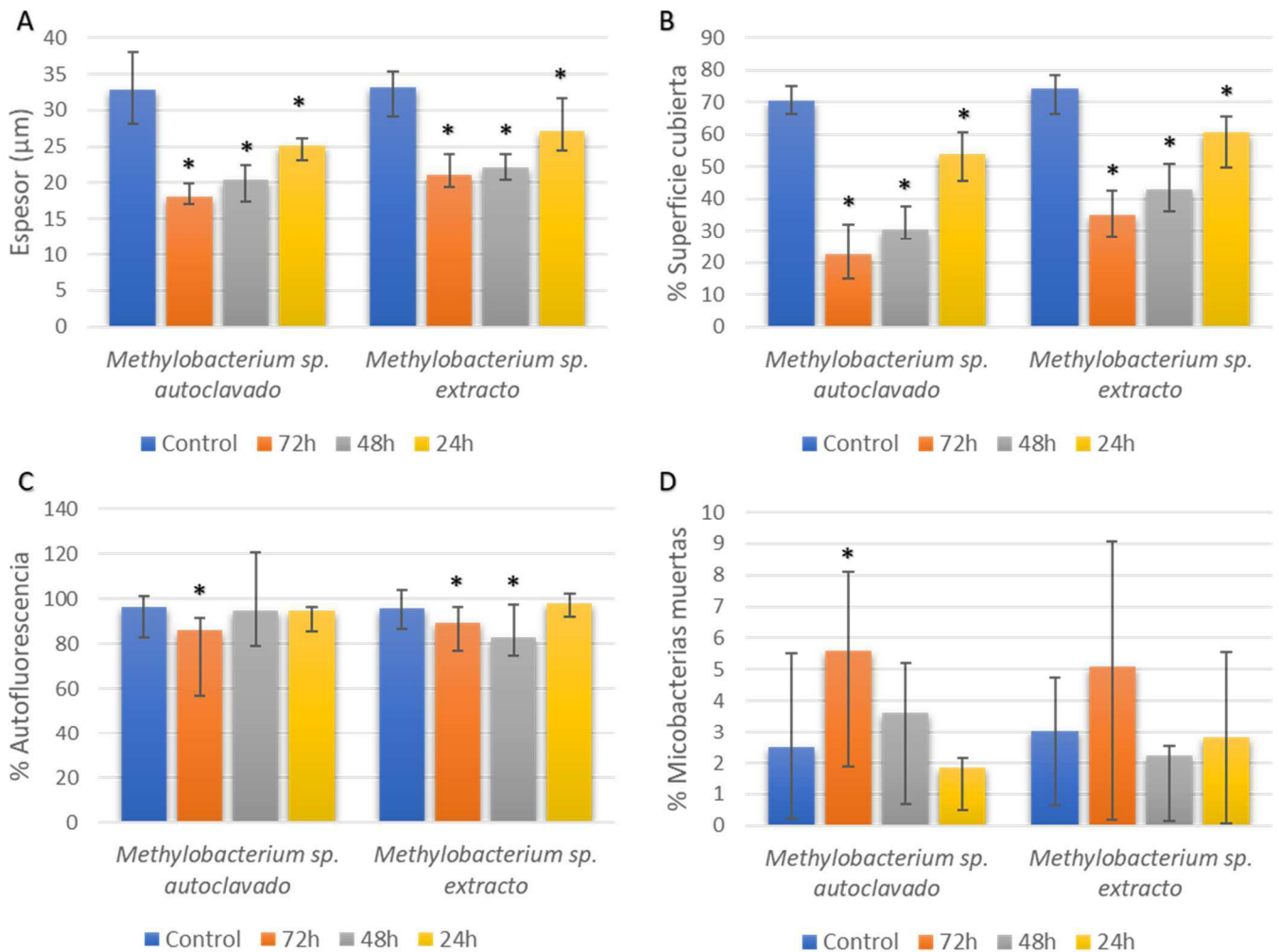
## Resultados

		<i>Methylobacterium sp.</i> autoclavado vs. extracto
Espesor ( $\mu\text{m}$ )	24 h	<0,001*
	48 h	<0,001*
	72 h	<0,001*
% sup. cubierta	24 h	0,1432
	48 h	<0,001*
	72 h	<0,001*
% autofluorescencia	24 h	0,3223
	48 h	<0,001*
	72 h	0,0015*
% muertas	24 h	0,001*
	48 h	0,1548
	72 h	0,0233*

Tabla 8. Valores p obtenidos, para cada uno de los parámetros de las biopelículas de *M. chelonae*, de la comparación a la exposición a diferentes formas de *Methylobacterium sp.* a diferentes tiempos. (\*) Estadísticamente significativo.

### 5.2.1.3. Efecto de *Methylobacterium sp.* sobre biopelículas de *M. fortuitum*.

Los resultados obtenidos del análisis del espesor, porcentaje de superficie cubierta, porcentaje de autofluorescencia y porcentaje de micobacterias muertas están representados gráficamente en la Figura 23.

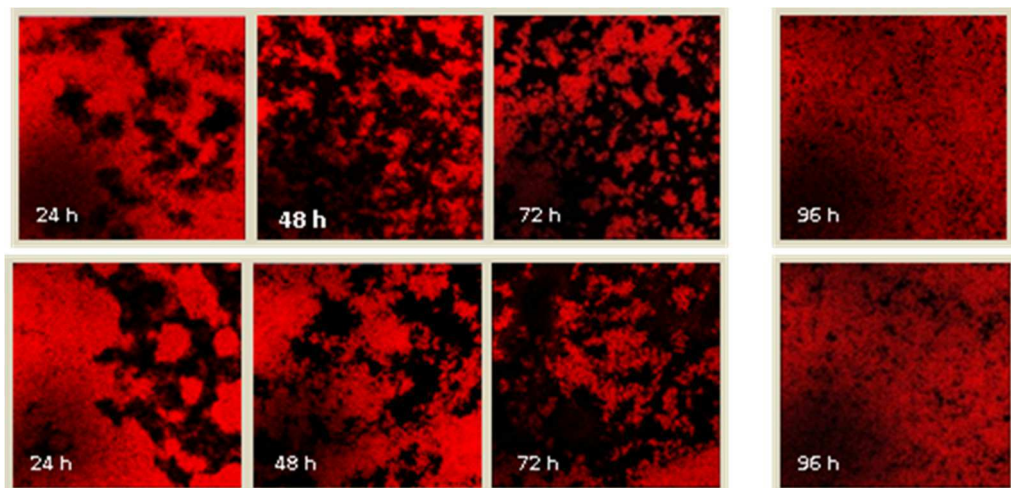


**Figura 23.** Efecto de *Methylobacterium sp.* (autoclavado y extracto) en diferentes parámetros de la biopelícula de *M. fortuitum*: A espesor (μm), B % superficie cubierta, C % autofluorescencia, D % micobacterias muertas. Tiempo: horas de incubación con *Methylobacterium sp.* (24, 48 y 72h) y control sin *Methylobacterium sp.* (96h). (\*) Estadísticamente significativo con respecto al control (p < 0,05).

La superficie cubierta y el espesor fueron significativamente más bajos en biopelículas de *M. fortuitum* que habían sido expuestas a *Methylobacterium sp.* autoclavado y extracto (p < 0,001 en todos los casos) con respecto al control.

## Resultados

La máxima inhibición de estos dos parámetros fue registrada a las 48 y 72 horas (Figuras 23A y 23B). En cuanto al porcentaje de autofluorescencia, se pueden observar diferencias significativas respecto al control con la forma autoclavada de *Methylobacterium sp.* a las 72 horas ( $p=0,0083$ ) y con el extracto a las 48 ( $p=0,0039$ ) y 72 horas ( $p=0,0106$ ), disminuyendo la autofluorescencia en todos los casos (Figura 23C). El porcentaje de micobacterias muertas fue significativamente más alto sólo tras la exposición de la biopelícula a *Methylobacterium sp.* autoclavado durante 72 horas ( $p=0,0054$ ) (Figura 23D).



**Figura 24.** Efecto de *Methylobacterium sp.* en diferentes tiempos sobre biopelículas de *M. fortuitum* usando *Methylobacterium sp.* autoclavado (A) y extracto bacteriano (B). Las imágenes de 96 horas corresponden al control de una biopelícula de *M. fortuitum* (Tinción Nile Red®).

En la tabla 9 se muestran los p valores provenientes de la comparación a diferentes tiempos de cada uno de los parámetros de las biopelículas de *M. fortuitum* expuestas a *Methylobacterium sp.* autoclavado y extracto.

<i>Methylobacterium</i> <i>sp.</i> autoclavado	Espesor ( $\mu\text{m}$ )	% superficie cubierta	% autofluorescencia	% micobacterias muertas
24-48 h	0,0001*	<0,001*	0,3979	0,0433*
24-72 h	<0,001*	<0,001*	0,0501	0,0005*
24h- control	<0,001*	<0,001*	0,0665	0,9671
48-72 h	0,0418*	0,0074*	0,0150*	0,0949
48h- control	<0,001*	<0,001*	0,8852	0,2568
72h- control	<0,001*	<0,001*	0,0083*	0,0024*
<i>Methylobacterium</i> <i>sp.</i> extracto	Espesor ( $\mu\text{m}$ )	% superficie cubierta	% autofluorescencia	% micobacterias muertas
24-48 h	<0,001*	0,0001	0,0039*	0,3753
24-72 h	<0,001*	<0,001*	0,0030*	0,3429
24h- control	0,0002*	<0,001*	0,5777	0,1270
48-72 h	0,2162	0,0057*	0,5637	0,0909
48h-control	<0,001*	<0,001*	0,0039*	0,0054*
72h- control	<0,001*	<0,001*	0,0106*	0,8852

Tabla 9. Valores p obtenidos de las comparaciones a diferentes tiempos de los parámetros de las biopelículas de *M. fortuitum* expuestas a las diferentes formas de *Methylobacterium sp.*

En la tabla 10, pueden observarse las diferencias entre la forma autoclavada y el extracto de *Methylobacterium sp.* en su influencia en los diferentes parámetros de la biopelícula. La reducción del espesor y de la superficie cubierta fue significativamente mayor con la forma autoclavada que con el extracto. En la autofluorescencia no se observaron diferencias entre las dos formas a las 48 y 72 horas; solo se observó diferencia significativa a las 24 horas, siendo mayor el porcentaje de autofluorescencia con el extracto. El porcentaje de micobacterias muertas fue significativamente mayor con *Methylobacterium sp.* autoclavado a las 48 horas.

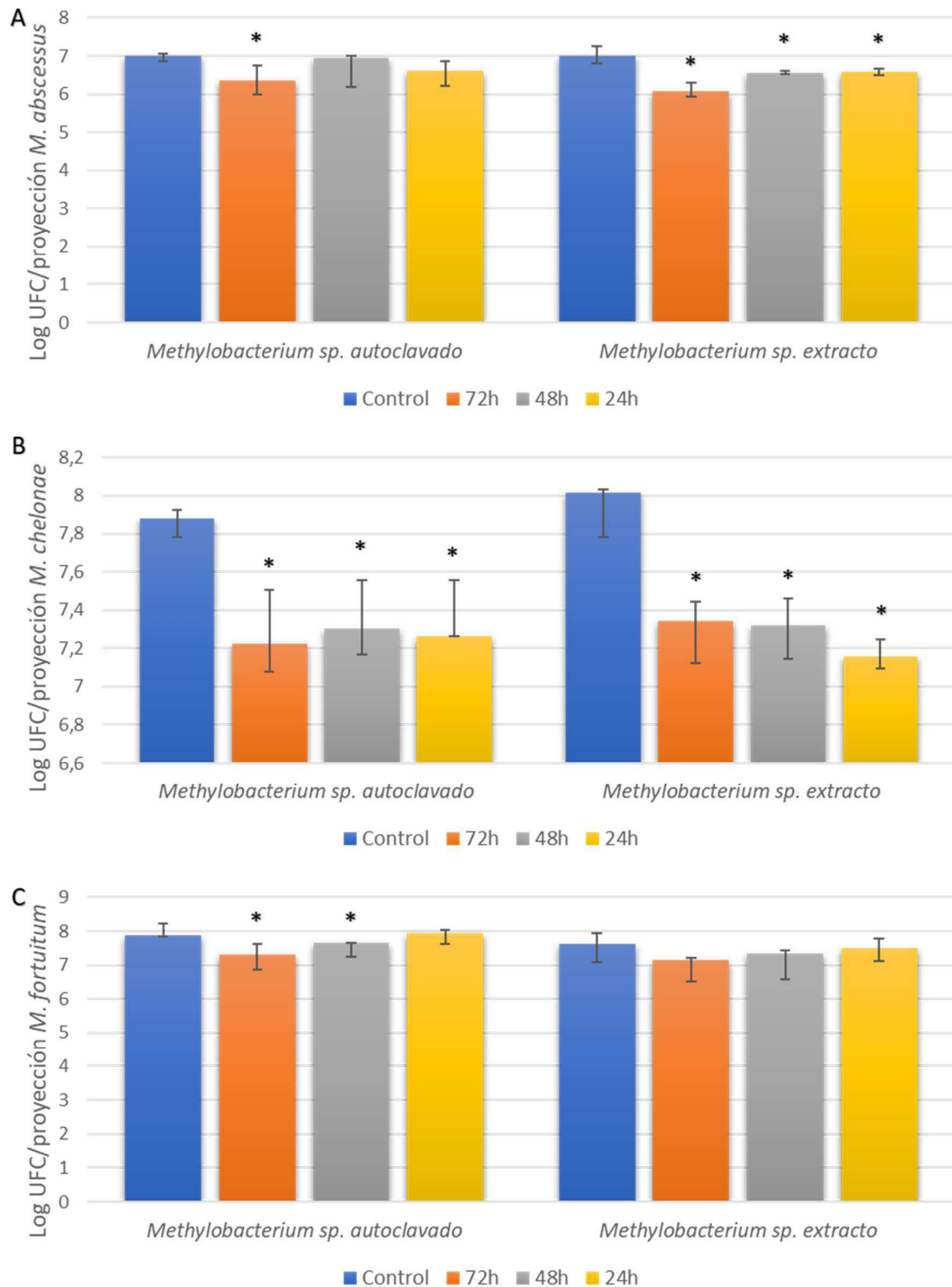
## Resultados

		<i>Methylobacterium sp.</i> autoclavado vs. extracto
Espesor ( $\mu\text{m}$ )	24 h	0,0066*
	48 h	0,0336*
	72 h	0,0009*
% sup. cubierta	24 h	0,0354*
	48 h	0,0001*
	72 h	0,0002*
% autofluorescencia	24 h	0,0106*
	48 h	0,0501
	72 h	0,3025
% muertas	24 h	0,5227
	48 h	0,0094*
	72 h	0,0990

Tabla 10. Valores p obtenidos, para cada uno de los parámetros de las biopelículas de *M. fortuitum*, de la comparación a la exposición a diferentes formas de *Methylobacterium sp.* a diferentes tiempos. (\*) Estadísticamente significativo.

### 5.2.2. Evaluación mediante recuento bacteriano utilizando el método de Calgary modificado.

Los resultados obtenidos del recuento expresados en log UFC por proyección de la placa *MBEC<sup>TM</sup> Biofilm Inoculator* están recogidos en la figura 25.



**Figura 25.** Efecto de *Methylobacterium sp.* autoclavado y extracto en el recuento expresado en log UFC/proyección de la placa con el objetivo de analizar la biopelícula de *M. abscessus* (A), *M. chelonae* (B) y *M. fortuitum* (C). Tiempo: horas de incubación con *Methylobacterium sp.* (24, 48 y 72h) y control sin *Methylobacterium sp.* (96h). (\*) Estadísticamente significativo con respecto al control ( $p < 0,05$ ).

## Resultados

En las biopelículas de *M. abscessus* el recuento bacteriano disminuyó significativamente con respecto al control después de añadir extracto de *Methylobacterium sp.* durante 24, 48, y 72 horas ( $p=0,0495$  en los tres casos). Sin embargo, con la forma autoclavada, la reducción fue significativa sólo a las 72 horas de tratamiento ( $p=0,0495$ ) (Figura 25A).

En cuanto a las biopelículas de *M. chelonae*, la disminución en el recuento bacteriano fue estadísticamente significativa a todos los tiempos y con ambas formas de *Methylobacterium sp.* ( $p<0,05$  en todos los casos) (Figura 25B).

<i>Methylobacterium sp.</i> autoclavado	Log UFC/ proyección <i>M. abscessus</i>	Log UFC/ proyección <i>M. chelonae</i>	Log UFC/ proyección <i>M. fortuitum</i>
24-48 h	0,5127	1,00	0,2752
24-72 h	0,5127	0,2683	0,1266
24h- control	0,0765	0,0463*	0,8273
48-72 h	0,2752	0,5127	0,2752
48h- control	0,3758	0,0495*	0,0495*
72h- control	0,0495*	0,0495*	0,0495*
<i>Methylobacterium sp.</i> extracto	Log UFC/ proyección <i>M. abscessus</i>	Log UFC/ proyección <i>M. chelonae</i>	Log UFC/ proyección <i>M. fortuitum</i>
24-48 h	0,8273	0,2752	0,2752
24-72 h	0,0495*	0,2752	0,2752
24h- control	0,0495*	0,0495*	0,8273
48-72 h	0,0495*	0,8273	0,2752
48h- control	0,0495*	0,0495*	0,2752
72h- control	0,0495*	0,0495*	0,2752

Tabla 11. Valores p obtenidos de las comparaciones entre los diferentes tiempos de exposición de las biopelículas de MNPCR a diferentes formas de *Methylobacterium sp.*

En las biopelículas de *M. fortuitum* se observa la menor reducción en el recuento de las tres micobacterias tras el tratamiento con *Methylobacterium sp.* Sólo la

exposición a la forma autoclavada tuvo una reducción significativa a las 48 y 72 horas ( $p=0,0495$ ) (Figura 25C).

En la tabla 12 se muestra la comparación entre las dos formas de *Methylobacterium sp.* (autoclavado y extracto) en cuanto a la reducción en el recuento bacteriano de biopelículas de *Mycobacterium sp.* No se encontraron diferencias significativas entre las dos formas en el recuento expresado en log UFC/proyección, solamente la reducción fue significativamente mayor a las 24 horas de exposición a *Methylobacterium sp.* extracto en la biopelícula de *M. chelonae*.

		<i>Methylobacterium sp.</i> autoclavado vs. extracto
<i>M. abscessus</i>	24 h	0.8273
	48 h	0.5127
	72 h	0.2752
<i>M. chelonae</i>	24 h	0.0463*
	48 h	0.8273
	72 h	0.8273
<i>M. fortuitum</i>	24 h	0.1266
	48 h	0.2752
	72 h	0.2752

Tabla 12. Valores p obtenidos de la exposición a diferentes formas de *Methylobacterium sp.* a diferentes tiempos. (\*) Estadísticamente significativo.

### 5.3. Evaluación del efecto de *Methylobacterium sp.* combinado con claritromicina sobre biopelículas de *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum*.

Los resultados obtenidos en el apartado anterior fueron comparados con la adición de claritromicina a dos formas de *Methylobacterium sp.* (autoclavado y extracto), con la intención de comprobar si mejoraba el efecto sobre la inhibición de biopelículas de MNPCR.

#### 5.3.1. Evaluación mediante microscopía confocal láser de barrido.

##### 5.3.1.1. Efecto de *Methylobacterium sp.* combinado con claritromicina sobre biopelículas de *M. abscessus*.

En las Figuras 26, 27, 28 y 29 están representadas todas las opciones a las que se expusieron las biopelículas de *M. abscessus* y su efecto sobre los diferentes parámetros (espesor, % superficie cubierta, % autofluorescencia, % micobacterias muertas).

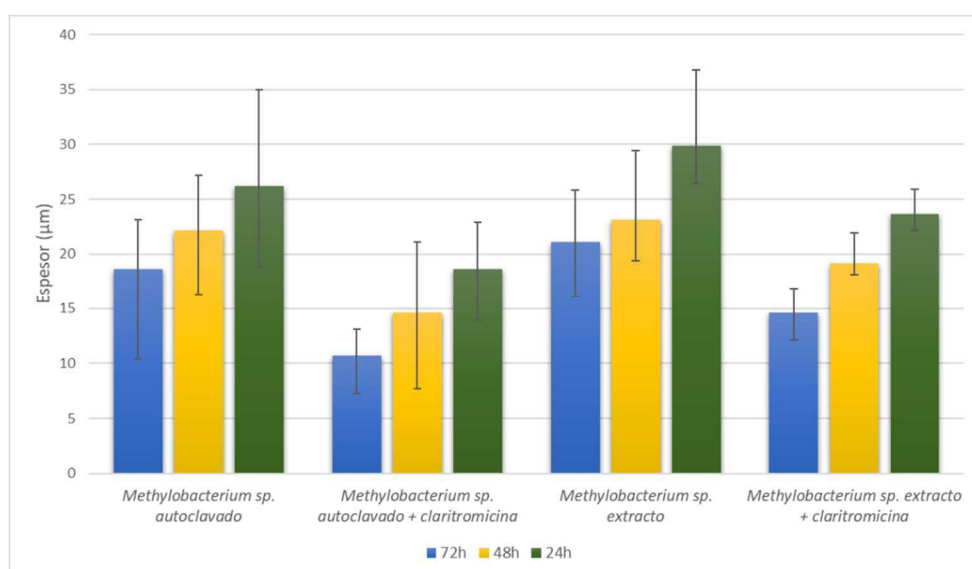


Figura 26. Efecto de *Methylobacterium sp.* (autoclavado y extracto) y la combinación de estos con claritromicina en el espesor de la biopelícula de *M. abscessus*.

En cuanto al espesor de la biopelícula de *M. abscessus*, se redujo significativamente con la adición de claritromicina a las dos formas de *Methylobacterium sp.* (Figura 26).

Sin embargo, en el parámetro superficie cubierta las diferencias no fueron significativas, por lo que añadir claritromicina no supuso ninguna ventaja. De hecho, al añadir claritromicina al extracto de *Methylobacterium sp.* la superficie cubierta se vio ligeramente incrementada a las 24 y 72 horas. Cabe destacar en este punto que al añadir claritromicina la cantidad de *Methylobacterium sp.* se redujo a la mitad (Figura 27).

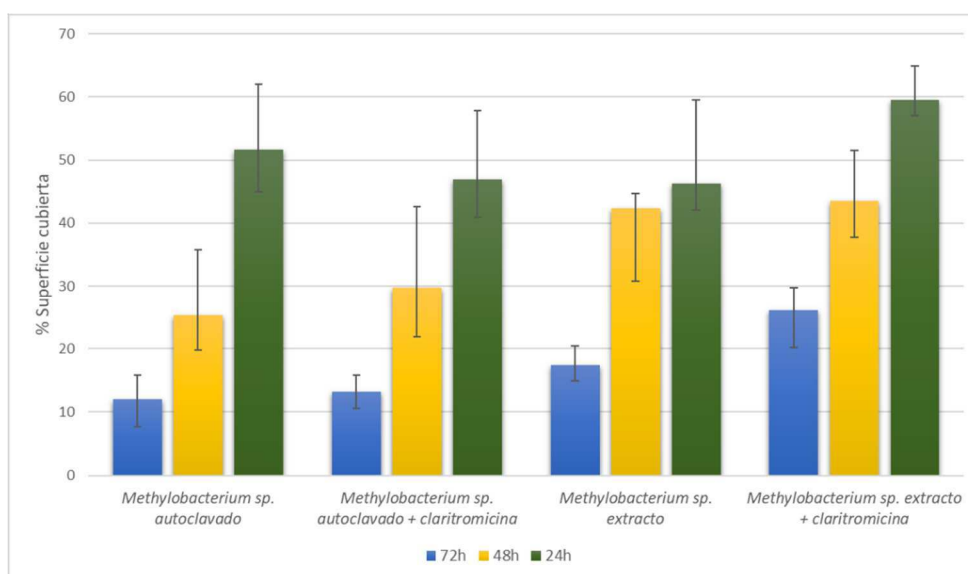


Figura 27. Efecto de *Methylobacterium sp.* (autoclavado y extracto) y la combinación de estos con claritromicina en la superficie cubierta de la biopelícula de *M. abscessus*.

La autofluorescencia disminuyó significativamente con la adición de claritromicina a las dos formas de *Methylobacterium sp.* a las 48 y 72 horas, y no hubo diferencias significativas a las 24 horas (Figura 28).

## Resultados

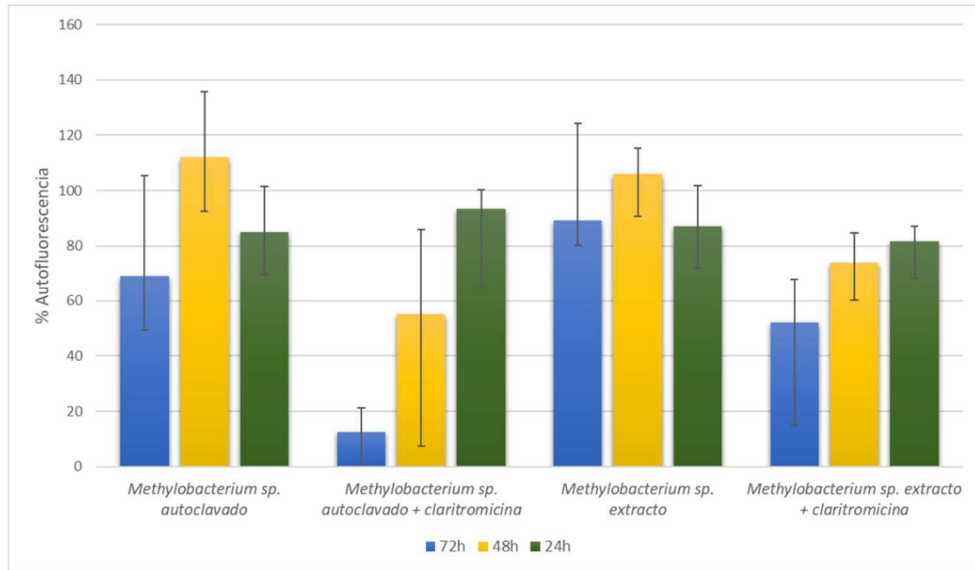


Figura 28. Efecto de *Methylobacterium sp.* (autoclavado y extracto) y la combinación de estos con claritromicina en la autofluorescencia de la biopelícula de *M. abscessus*.

El número de micobacterias muertas aumentó de manera muy significativa cuando el antibiótico claritromicina estaba presente (Figura 29).

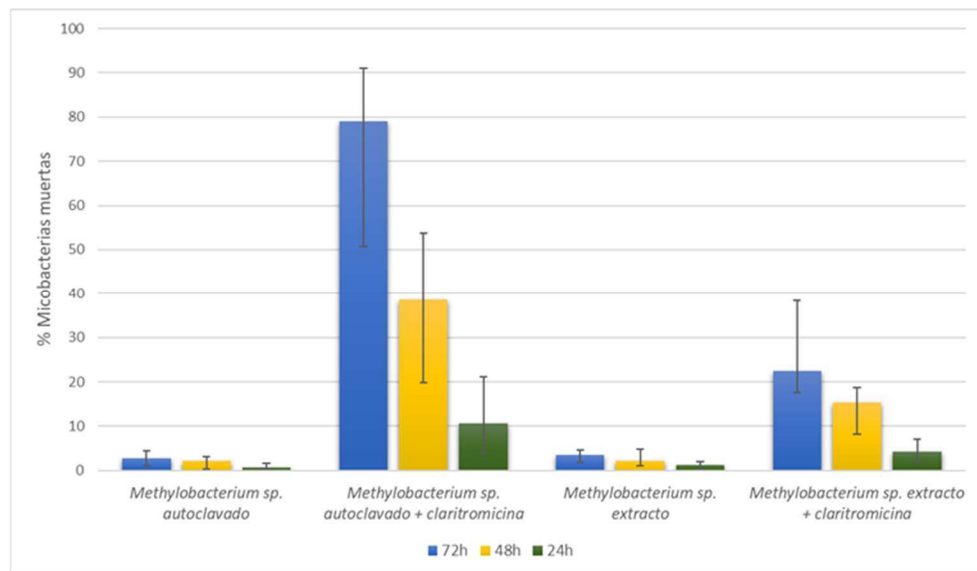


Figura 29. Efecto de *Methylobacterium sp.* (autoclavado y extracto) y la combinación de estos con claritromicina en el número de micobacterias muertas de la biopelícula de *M. abscessus*.

<i>M. abscessus</i>		<i>Methylobacterium sp.</i> autoclavado vs. <i>Methylobacterium sp.</i> autoclavado + claritromicina	<i>Methylobacterium sp.</i> extracto vs. <i>Methylobacterium sp.</i> extracto + claritromicina
Espesor ( $\mu\text{m}$ )	24 h	0,0010*	<0,001*
	48 h	0,0011*	0,0199*
	72 h	0,0021*	<0,001*
% sup. cubierta	24 h	0,0885	0,0172*
	48 h	0,3180	0,1689
	72 h	0,4314	0,0011*
% autofluorescencia	24 h	0,8625	0,1072
	48 h	<0,001*	0,001*
	72 h	<0,001*	<0,001*
% muertas	24 h	<0,001*	<0,001*
	48 h	<0,001*	<0,001*
	72 h	<0,001*	<0,001*

Tabla 13. Valores p obtenidos de las comparaciones entre la exposición de las biopelículas de *M. abscessus* a *Methylobacterium sp.* autoclavado y extracto con y sin claritromicina.

### 5.3.1.2. Efecto de *Methylobacterium sp.* combinado con claritromicina sobre biopelículas de *M. chelonae*.

En las Figuras 30, 31, 32 y 33 están representadas todas las opciones a las que se expusieron las biopelículas de *M. chelonae* y su efecto sobre los diferentes parámetros.

## Resultados

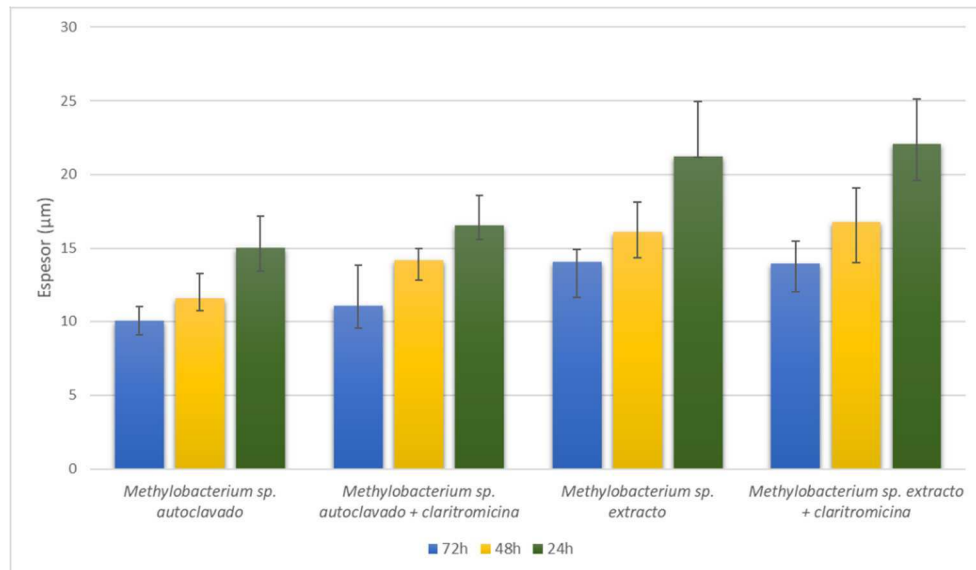


Figura 30. Efecto de *Methylobacterium sp.* (autoclavado y extracto) y la combinación de estos con claritromicina en el espesor de la biopelícula de *M. chelonae*.

El espesor de las biopelículas de *M. chelonae* no se redujo por la adición de claritromicina.; de hecho, al combinarla con la forma autoclavada se observó un ligero aumento. En el extracto no hubo diferencias significativas con o sin claritromicina (Figura 30). En cuanto a la superficie cubierta, hubo una disminución significativa con la adición de claritromicina durante 24 y 48 horas, pero no durante 72 horas (Figura 31).

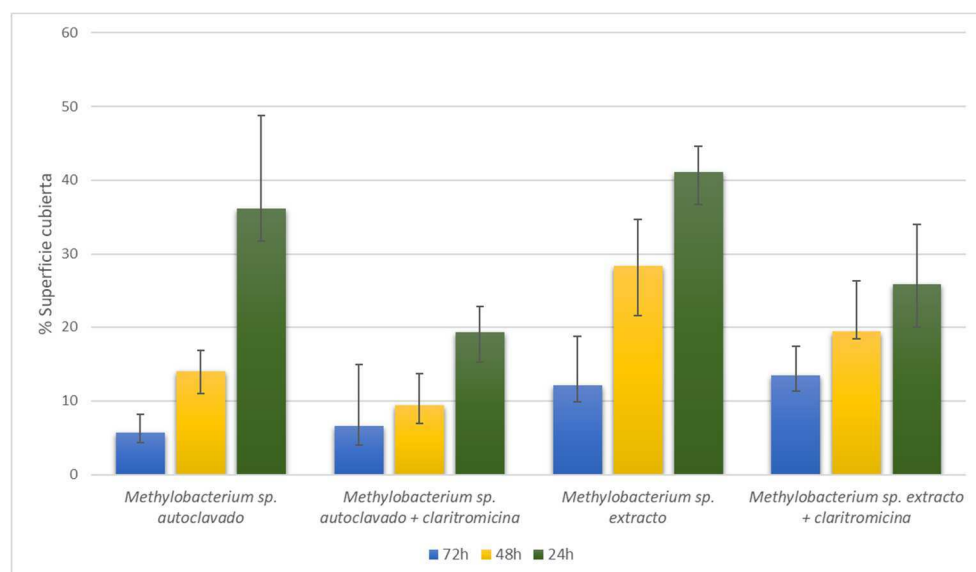


Figura 31. Efecto de *Methylobacterium sp.* (autoclavado y extracto) y la combinación de estos con claritromicina en la superficie cubierta de la biopelícula de *M. chelonae*.

En el porcentaje de autofluorescencia apenas hubo diferencias significativas por la adición de claritromicina, únicamente hubo disminución significativa al añadir claritromicina a *Methylobacterium sp.* autoclavado a las 24 y 72 horas (Figura 32).

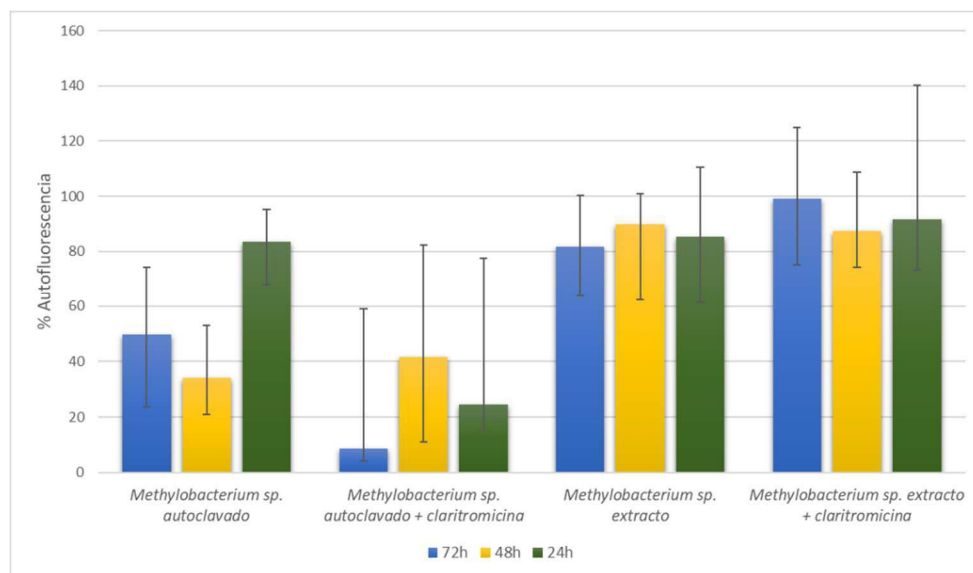


Figura 32. Efecto de *Methylobacterium sp.* (autoclavado y extracto) y la combinación de estos con claritromicina en la autofluorescencia de la biopelícula de *M. chelonae*.

El porcentaje de micobacterias muertas si fue significativamente mayor en todos los casos en los que la claritromicina fue añadida (Figura 33).

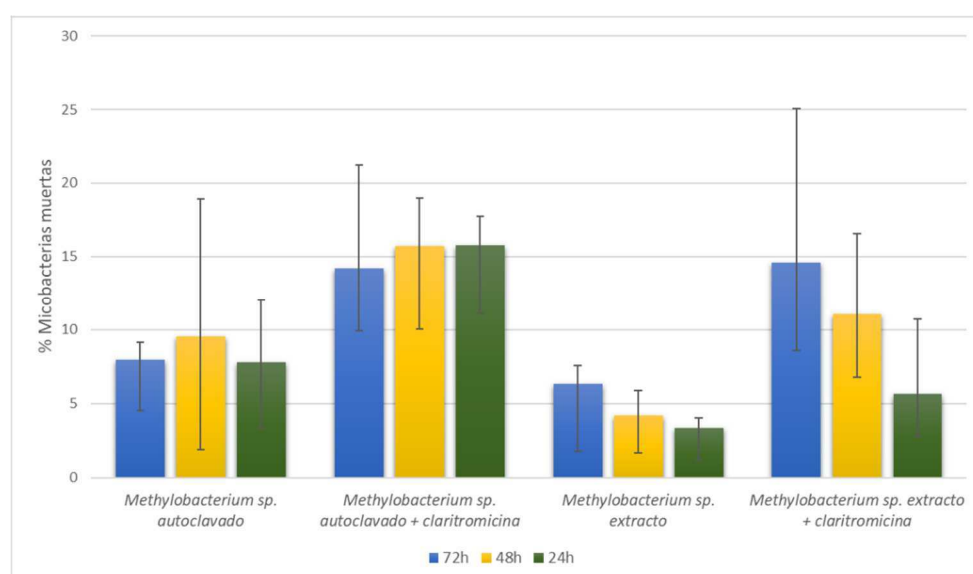


Figura 33. Efecto de *Methylobacterium sp.* (autoclavado y extracto) y la combinación de estos con claritromicina en el número de micobacterias muertas de la biopelícula de *M. chelonae*.

<i>M.cheloniae</i>		<i>Methylobacterium</i> <i>sp.</i> autoclavado vs. <i>Methylobacterium</i> <i>sp.</i> autoclavado + claritromicina	<i>Methylobacterium</i> <i>sp.</i> extracto vs. <i>Methylobacterium</i> <i>sp.</i> extracto+ claritromicina
Espesor (µm)	24 h	0,0125*	0,7724
	48 h	0,0020*	0,6645
	72 h	0,0255*	0,6796
% sup. cubierta	24 h	<0,001*	<0,001*
	48 h	0,0412*	0,0177*
	72 h	0,2399	0,6801
% autofluorescencia	24 h	0,0017*	0,2568
	48 h	0,9507	0,6952
	72 h	0,0018*	0,1671
% muertas	24 h	0,007*	0,0094*
	48 h	0,0411*	< 0,001*
	72 h	0,009*	< 0,001*

Tabla 14. Valores p obtenidos de las comparaciones entre la exposición de las biopelículas de *M. cheloniae* a *Methylobacterium sp.* autoclavado y extracto con y sin claritromicina.

### 5.3.1.3. Efecto de *Methylobacterium sp.* combinado con claritromicina sobre biopelículas de *M. fortuitum*.

En las Figuras 34, 35, 36 y 37 están representadas todas las opciones a las que se expusieron las biopelículas de *M. fortuitum* y su efecto sobre los diferentes parámetros.

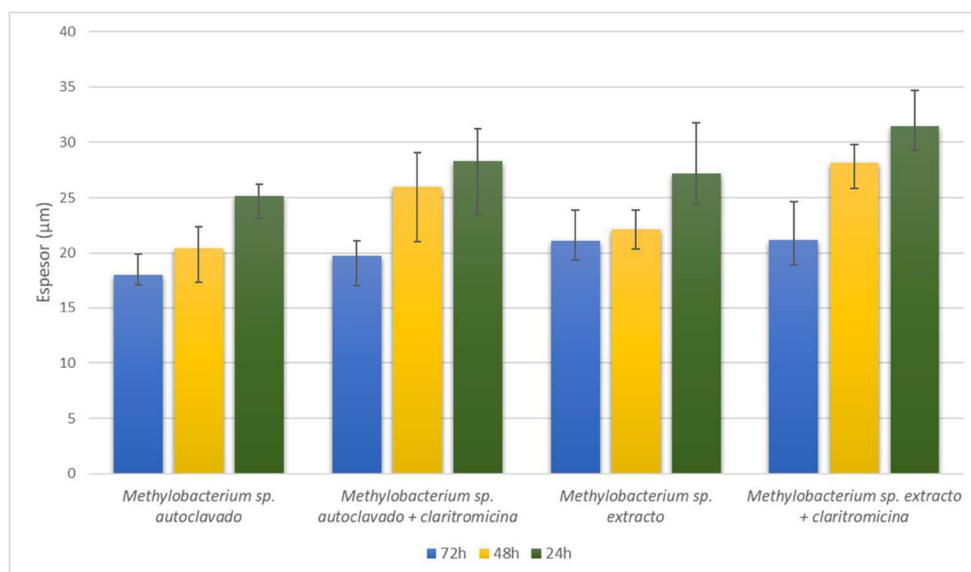


Figura 34. Efecto de *Methylobacterium sp.* (autoclavado y extracto) y la combinación de estos con claritromicina en el espesor de la biopelícula de *M. fortuitum*.

El espesor de las biopelículas no se redujo por la adición de claritromicina; de hecho, aumentó ligeramente tras la exposición de las biopelículas durante 24 y 48 horas y se mantuvo igual tras la exposición durante 72 horas, tanto con la forma autoclavada como con el extracto de *Methylobacterium sp.* (Figura 34).

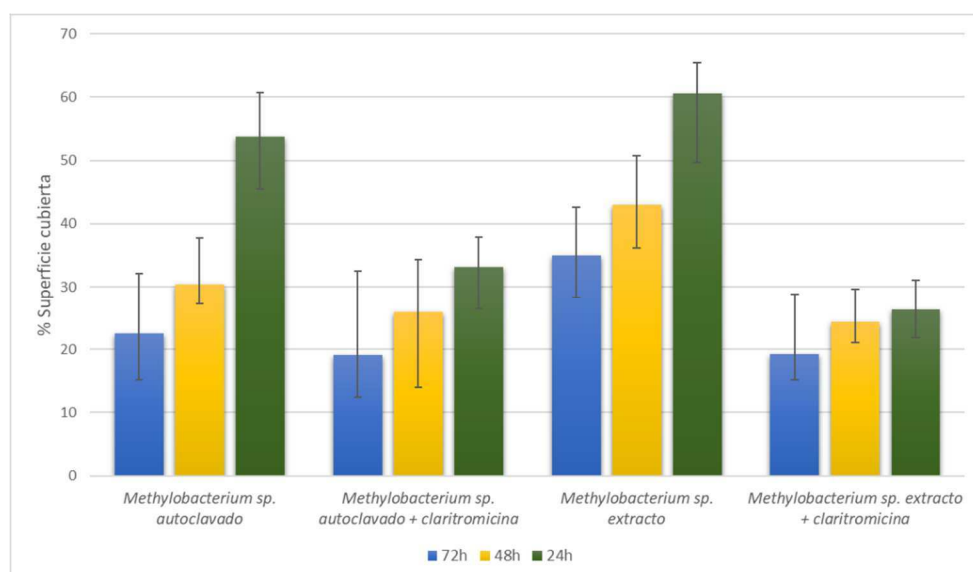


Figura 35. Efecto de *Methylobacterium sp.* (autoclavado y extracto) y la combinación de estos con claritromicina en la superficie cubierta de la biopelícula de *M. fortuitum*.

## Resultados

El porcentaje de superficie cubierta si disminuyó en todos los casos tras la adición de claritromicina, siendo esta reducción significativa a todos los tiempos con el extracto de *Methylobacterium sp.* y a 24 y 48 horas con *Methylobacterium sp.* autoclavado (Figura 35).

La autofluorescencia no sufrió variación en la mayoría de las situaciones por la adición de claritromicina. Únicamente disminuyó con la combinación de *Methylobacterium sp.* extracto y claritromicina a 24 y 72 horas de exposición (Figura 36).

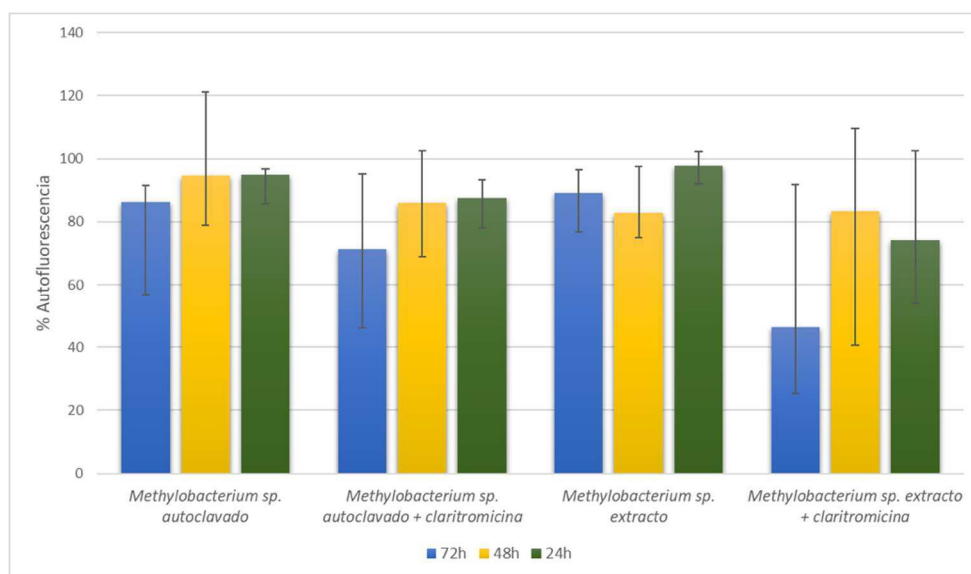


Figura 36. Efecto de *Methylobacterium sp.* (autoclavado y extracto) y la combinación de estos con claritromicina en la autofluorescencia de la biopelícula de *M. fortuitum*.

El número de micobacterias muertas fue significativamente mayor cuando se añadió claritromicina a *Methylobacterium sp.* autoclavado con respecto a *Methylobacterium sp.* autoclavado sin antibiótico a todos los tiempos. Sin embargo, el extracto de *Methylobacterium sp.* combinado con claritromicina no produjo más mortalidad de micobacterias en la biopelícula; de hecho, a las

48 y 72 horas de exposición la mortalidad fue mayor utilizando solo *Methylobacterium sp.* extracto (Figura 37).

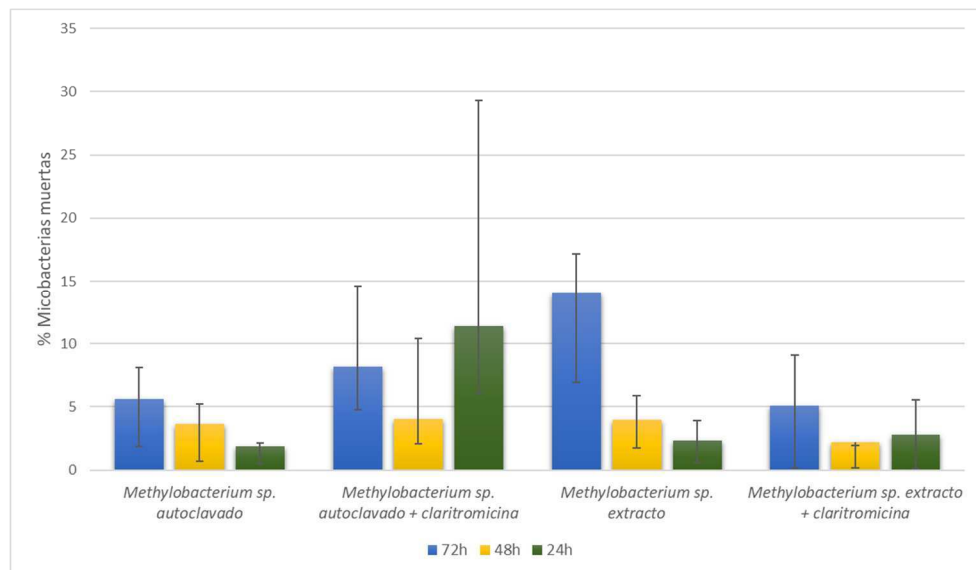


Figura 37. Efecto de *Methylobacterium sp.* (autoclavado y extracto) y la combinación de estos con claritromicina en el número de micobacterias muertas de la biopelícula de *M. fortuitum*.

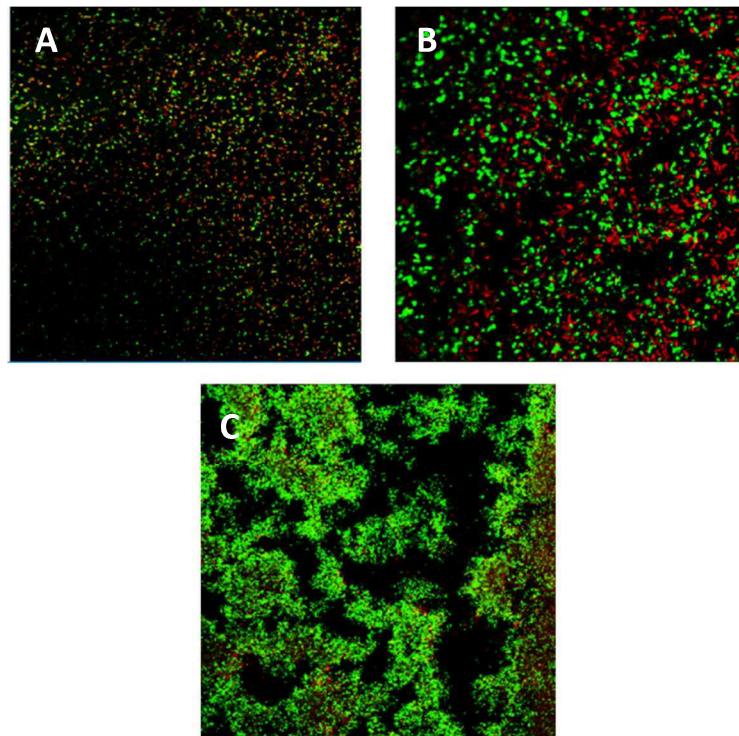


Figura 38. Diferentes biopelículas vistas con Tinción Live/Dead BacLight®. A: Biopelícula de *M. abscessus* tratada con *Methylobacterium sp.* autoclavado y claritromicina 72 horas; B: biopelícula de *M. chelonae* tratada con extracto de *Methylobacterium sp.* y claritromicina 72 horas; C: biopelícula de *M. fortuitum* tratada con *Methylobacterium sp.* autoclavado y claritromicina 72 horas.

<i>M. fortuitum</i>		<i>Methylobacterium sp.</i> autoclavado vs. <i>Methylobacterium sp.</i> autoclavado + claritromicina	<i>Methylobacterium sp.</i> extracto vs. <i>Methylobacterium sp.</i> extracto + claritromicina
Espesor (µm)	24 h	0,0162*	0,002*
	48 h	0,003*	< 0,001*
	72 h	0,2315	0,6495
% sup. cubierta	24 h	<0,001*	<0,001*
	48 h	0,0320*	<0,001*
	72 h	0,4333	<0,001*
% autofluorescencia	24 h	0,2568	0,0158*
	48 h	0,0949	0,7105
	72 h	0,3979	0,0042*
% muertas	24 h	<0,001*	0,3865
	48 h	<0,001*	0,002*
	72 h	0,0189*	0,006*

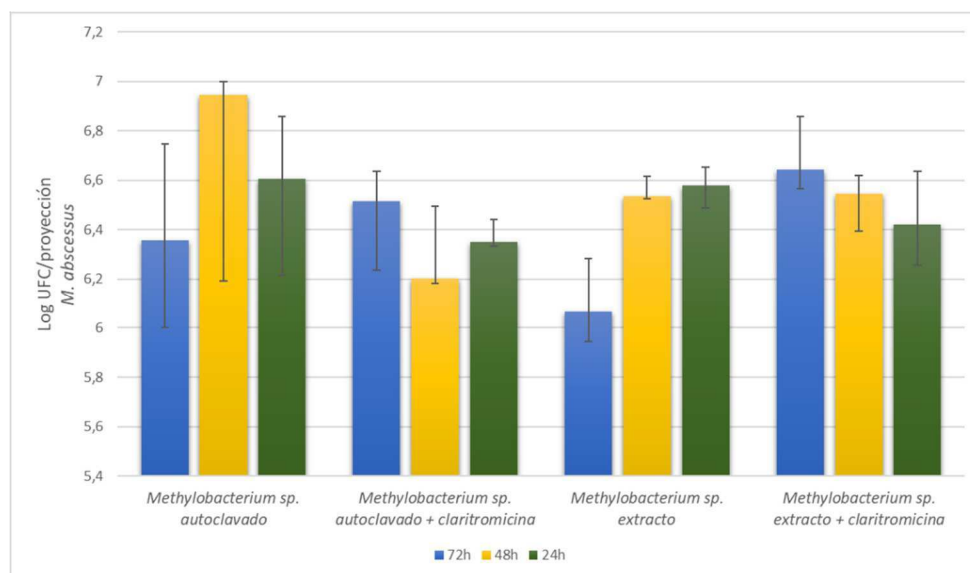
Tabla 15. Valores p obtenidos de las comparaciones entre la exposición de las biopelículas de *M. fortuitum* a *Methylobacterium sp.* autoclavado y extracto con y sin claritromicina.

### 5.3.2. Evaluación mediante recuento bacteriano utilizando el método de Calgary modificado.

Con la intención de comprobar si la combinación de claritromicina junto con *Methylobacterium sp.* supone una mejora a la hora de erradicar la biopelícula de MNPCR, se procedió al recuento de log UFC/proyección tras la exposición de las biopelículas de cada micobacteria a dos combinaciones: *Methylobacterium sp.*

autoclavado + claritromicina y *Methylobacterium sp.* extracto + claritromicina, comparándose estas combinaciones con *Methylobacterium sp.* autoclavado y *Methylobacterium sp.* extracto respectivamente.

En las biopelículas de *M. abscessus*, no hubo diferencias significativas en cuanto a una reducción en el recuento de colonias por la adición de claritromicina. La única diferencia se observó a las 72 horas de exposición entre *Methylobacterium sp.* extracto y *Methylobacterium sp.* extracto + claritromicina, pero el recuento fue mayor en la última opción (Figura 39).



**Figura 39.** Efecto de *Methylobacterium sp.* (autoclavado y extracto) y la combinación de estos con claritromicina en el recuento log UFC/proyección en las biopelículas de *M. abscessus*.

En las biopelículas de *M. chelonae*, la adición de claritromicina al extracto de *Methylobacterium sp.* conllevó una reducción significativa en el recuento de colonias con respecto a *Methylobacterium sp.* extracto sin antibiótico. La adición de claritromicina a la forma autoclavada de *Methylobacterium sp.* solo supuso una mayor reducción de la biopelícula a las 72 horas de exposición (Figura 40)

## Resultados

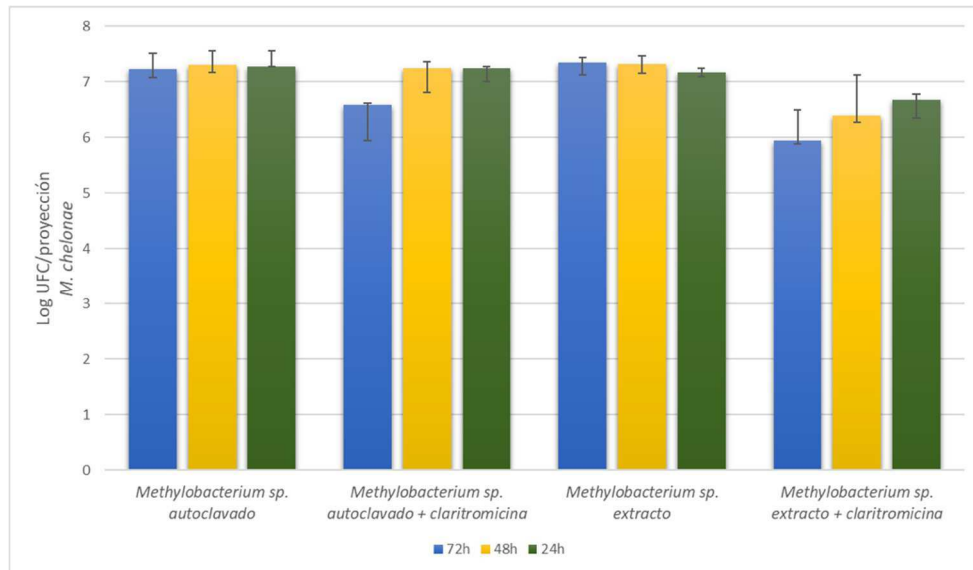


Figura 40. Efecto de *Methylobacterium sp.* (autoclavado y extracto) y la combinación de estos con claritromicina en el recuento log UFC/proyección en las biopelículas de *M. chelonae*.

En las biopelículas de *M. fortuitum*, la adición de claritromicina a *Methylobacterium sp.* autoclavado tuvo mayor efecto en la disminución del recuento de colonias de la biopelícula que *Methylobacterium sp.* autoclavado sin antibiótico a las 24 horas de exposición. Sin embargo, la adición de claritromicina a *Methylobacterium sp.* extracto tuvo mayor efecto en la disminución del recuento de colonias de la biopelícula que *Methylobacterium sp.* extracto sin claritromicina solo a las 72 horas de exposición (Figura 41).

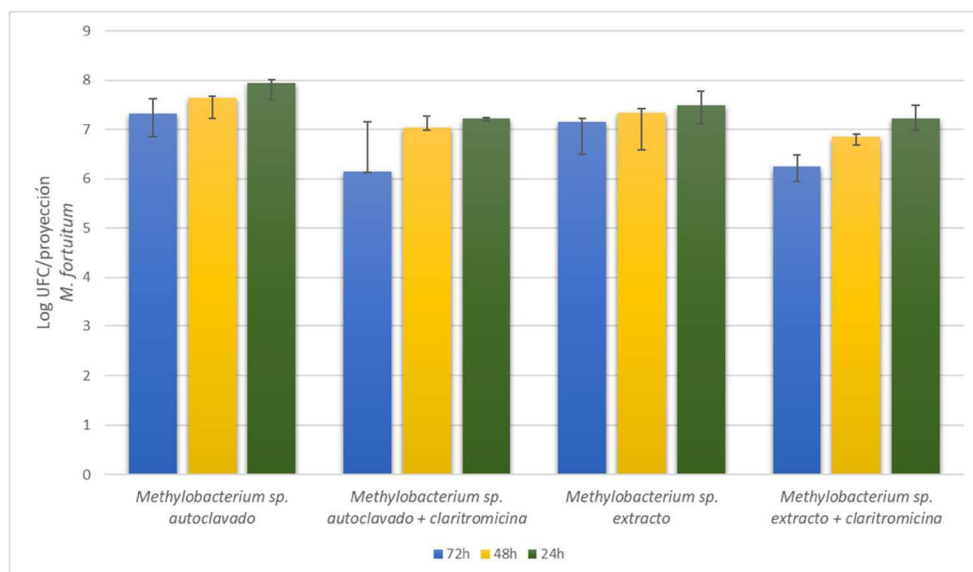


Figura 41. Efecto de *Methylobacterium sp.* (autoclavado y extracto) y la combinación de estos con claritromicina en el recuento log UFC/proyección en las biopelículas de *M. fortuitum*.

		<i>Methylobacterium sp.</i> autoclavado vs. <i>Methylobacterium sp.</i> autoclavado + claritromicina	<i>Methylobacterium sp.</i> extracto vs. <i>Methylobacterium sp.</i> extracto + claritromicina
<i>M. abscessus</i>	24 h	0,5127	0,2752
	48 h	0,2752	0,8273
	72 h	0,8273	0,0495*
<i>M. chelonae</i>	24 h	0,1046	0,0495*
	48 h	0,5127	0,0495*
	72 h	0,0495*	0,0495*
<i>M. fortuitum</i>	24 h	0,0495*	0,5127
	48 h	0,1266	0,5127
	72 h	0,1266	0,0495*

Tabla 16. Valores p obtenidos de las comparaciones entre la exposición de las biopelículas de *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum* a *Methylobacterium sp.* autoclavado y extracto con y sin claritromicina.



## 6. DISCUSIÓN



### **6.1. Evaluación de la patogenicidad de *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum* según la morfología de colonia lisa/rugosa.**

Aunque las MNPCR son normalmente consideradas como bacterias oportunistas ambientales, *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum* han sido relacionadas con enfermedad, mientras que otros miembros del grupo son aislados en el medio ambiente y raramente causan infecciones[201, 202]. Además, la evidencia epidemiológica apunta al posible papel de factores de riesgo en la capacidad de estos microorganismos para producir patología[8, 9, 74, 75]. La habilidad de las micobacterias para formar biopelículas confiere un importante factor a la hora de causar infecciones en humanos[203]. Sin embargo, hay pocos estudios que describan factores de virulencia asociados a MNPCR y la mayoría se centran en *M. abscessus*, la micobacteria más patógena de este grupo[27]. Uno de los estudios sugiere que la producción de hemolisina podría influir en la patogenicidad causada por estos microorganismos[28]. Otro estudio ha mostrado que *M. abscessus* contiene un gen (ausente en *M. chelonae*) que codifica la enzima fosfolipasa C, considerada un factor de virulencia por causar efecto citotóxico en macrófagos de ratón[29]. Otro posible factor determinante de virulencia podría estar codificado en el gen *mmpL4b* (esencial para la síntesis de GPL); ya que la delección de este gen causa una pérdida de motilidad y de la capacidad para formar biopelículas, aunque la micobacteria aumenta su capacidad de replicación en macrófagos humanos[30]. La secuenciación completa del genoma de *M. abscessus* muestra que muchas proteínas de virulencia están codificadas por los denominados “genes micobacterianos”, pero muchas otras se han adquirido horizontalmente de bacterias ambientales (por ejemplo, actinobacterias y *Pseudomonas*)[204].

## Discusión

Las micobacterias infectan y se multiplican en macrófagos, y cuando un macrófago fagocita micobacterias, estas se ubican en fagosomas rodeados por una membrana dentro del citoplasma. Estas bacterias tienen gran capacidad de adaptarse a la vida intracelular[205-207]. La fagocitosis y la capacidad de supervivencia intracelular de estas micobacterias han sido estudiadas como factores de patogenicidad, usando modelos celulares para evaluar los diferentes aspectos de las enfermedades y su posible tratamiento[14, 31-33]. Byrd y Lyons demostraron que el fenotipo de colonia rugoso de cepas de *M. abscessus* persiste y se multiplica en monocitos humanos, mientras que las variantes de colonia lisa experimentan una disminución en esta habilidad a los 5 días[14]. Roux y col. describieron el diferente comportamiento de las variantes de colonia lisa y rugosa de *M. abscessus* dentro de los macrófagos: las cepas de colonia lisa se disponían como bacterias aisladas dentro de los fagosomas, y las cepas de colonia rugosa se localizaban dentro de los fagosomas conteniendo más de dos bacilos en cada uno; además, comprobaron que las cepas de colonia lisa eran capaces de restringir la acidificación intrafagosomal e inducían menos apoptosis[33]. Por el contrario, Esteban y col. evaluaron la capacidad invasiva de cepas de MNPCR mediante un ensayo por observación de microcolonia en fibroblastos y no encontraron diferencias en cepas con fenotipo de colonia diferente[34].

En el estudio desarrollado en esta tesis, se demostró que la fagocitosis fue mayor con el fenotipo de colonia rugoso en *M. abscessus* y *M. fortuitum*, pero no se encontraron diferencias significativas entre las cepas de colonia lisa y rugosa en *M. chelonae*. Está descrito que el fenotipo liso es debido a la expresión de GPL en la pared celular bacteriana, y este GPL es mínimamente expresado por las

variantes rugosas. El estudio llevado a cabo por Howard y col. muestra que una misma cepa de *M. abscessus* puede cambiar entre morfologías de colonia lisa y rugosa[17].

En cuanto a los modelos *in vivo*, los modelos en ratón han sido los más utilizados para evaluar la patogenicidad y los fármacos antimicobacterianos[31, 208]. Actualmente, estos modelos aún son utilizados[209], pero el uso de roedores como modelos de infección se ha encontrado con obstáculos éticos y presupuestarios, y se están utilizando cada vez más modelos no mamíferos[35]. El pez cebra se ha utilizado con *M. marinum*[210] y las larvas de *G. mellonella* se han infectado con éxito con *M. tuberculosis*[211] y con micobacterias no tuberculosas[36], incluidos estudios sobre el efecto de los antimicrobianos en estos organismos[212]. El uso de *G. mellonella* no requiere aprobación ética, las larvas pueden sobrevivir a 37°C, y su corta vida útil las hace ideales para estos estudios[35]. Además, *G. mellonella* tiene una respuesta inmune celular innata en la cual están involucrados plasmocitos y células granulares, lo que lo hace ideal para el estudio de la infección por micobacterias[36].

Los resultados *in vivo* del estudio descrito en esta tesis se correlacionan con el modelo celular previamente descrito. Las larvas infectadas con el fenotipo de colonia rugoso de *M. abscessus* y *M. fortuitum* tuvieron una tasa de supervivencia más baja que las infectadas con la variante de colonia lisa. Sin embargo, no se observaron diferencias en la infección por *M. chelonae*. Para evaluar diferencias más sutiles en las larvas, se observaron la actividad, la formación de pupa y la melanización. Las mayores puntuaciones de actividad, formación de pupa y

melanización (menor coloración) correspondieron a las larvas control. Las puntuaciones de actividad y melanización fueron mayores en los grupos de larvas infectadas por cepas de colonias lisas que en las infectadas por cepas de colonias rugosas en *M. abscessus* y *M. fortuitum*, lo que se correlacionó con la tasa de supervivencia. Como se observó para la tasa de supervivencia, los parámetros de actividad y melanización del modelo de infección por *M. chelonae* no siguieron un patrón según la morfología de colonia. La formación de pupa no estuvo relacionada con los diferentes fenotipos de las colonias de MNPCR.

### **6.2. Evaluación del efecto de *Methylobacterium sp.* sobre biopelículas de *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum*.**

A pesar de que la presencia de *Methylobacterium sp.* ha sido relacionada con la ausencia de *Mycobacterium sp.* en entornos ambientales[37], y se ha desarrollado un estudio *in vitro* con *M. avium*[26], no se han realizado estudios *in vitro* para evaluar este efecto en MNPCR. El estudio expuesto en esta tesis muestra que *Methylobacterium sp.* puede inhibir la formación de biopelículas de *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum* en dos modelos *in vitro*.

Con respecto al estudio desarrollado mediante MCLB, las diferencias observadas cuando las biopelículas de micobacterias fueron expuestas a las dos o tres formas de *Methylobacterium sp.* podrían ser el resultado de las diferentes etapas de maduración de la biopelícula previas a la adición de *Methylobacterium sp.* La biopelícula expuesta durante 72 horas se desarrolló previamente durante 24 horas y la expuesta durante 24 horas se desarrolló previamente durante 72 horas. Por lo tanto, además de estar expuestas durante menos tiempo, las últimas biopelículas eran más maduras y más resistentes a la acción de *Methylobacterium sp.*

La reducción de la superficie cubierta y el espesor de las biopelículas de *M. abscessus* fue significativamente mayor cuando se expusieron a bacterias vivas comparado con las formas no vivas de *Methylobacterium sp.* En general, la reducción fue mayor con las bacterias autoclavadas que con el extracto. Sin embargo, cuando las biopelículas se expusieron durante 72 horas, no hubo diferencias estadísticamente significativas en la reducción de estos parámetros por bacterias vivas o autoclavadas, siendo ambas reducciones mayores que la obtenida por el extracto. Las diferencias entre la inhibición causada por las bacterias autoclavadas y el extracto podrían indicar que ciertos componentes de la pared celular de *Methylobacterium sp.* podrían perderse en el proceso de sonicación y podrían tener un efecto significativo en la inhibición de las biopelículas. Además, con este estudio se demuestra que la presencia de la forma viva de *Methylobacterium sp.* no es necesaria para inhibir la formación de biopelículas de *M. abscessus*, a pesar de que esta inhibición fue mayor cuando está presente una forma metabólicamente activa de la bacteria. Esto podría ser el resultado de una competencia de ambas bacterias por los nutrientes presentes en el medio, ya que *Methylobacterium sp.* está adaptado a prosperar con una baja concentración de nutrientes[213], pero también podría ser una consecuencia de una posible producción constante de la molécula responsable de la inhibición.

En las biopelículas de *M. chelonae* y *M. fortuitum* continuamos el estudio solo con *Methylobacterium sp.* autoclavado y extracto, ya que la reducción del espesor y la superficie cubierta fue estadísticamente significativa con estas formas; y con el objetivo de buscar nuevos enfoques para inhibir las biopelículas, el tratamiento de pacientes con bacterias vivas no siempre es posible. En ambas biopelículas, la

## Discusión

reducción fue mayor con *Methylobacterium sp.* autoclavado durante 72 horas de tratamiento.

En las biopelículas de *M. chelonae* se observa una mayor reducción en el espesor y en la superficie cubierta que en *M. abscessus* y *M. fortuitum*. Por otro lado, en las biopelículas de *M. fortuitum*, la reducción de estos parámetros fue menor en comparación con las biopelículas de *M. chelonae* y *M. abscessus*.

Aunque el porcentaje de micobacterias muertas no fue superior al 10% en ningún caso, la diferencia fue estadísticamente significativa con respecto al control en las tres especies, siendo las opciones más eficaces: *Methylobacterium sp.* autoclavado y extracto durante 72 horas en biopelículas de *M. abscessus*, con la forma autoclavada durante 48 horas en biopelículas de *M. chelonae* y con *Methylobacterium sp.* autoclavado durante 72 horas en las biopelículas de *M. fortuitum*. En este sentido, una limitación del estudio es el tiempo relativamente corto de tratamiento, comparado con los periodos recomendados en la literatura para manejo clínico de los pacientes, por lo que un periodo más largo de experimentación podría dar resultados diferentes.

Con respecto a la autofluorescencia, la capacidad de las MNPCR para emitir autofluorescencia azul ha sido previamente descrita[38]. La emisión de autofluorescencia en *Methylobacterium sp.* no se ha descrito, aunque se ha demostrado que las bacterias presentes en el agua potable pueden emitir fluorescencia[214]. Las coenzimas H429 y FO, involucradas en el transporte de electrones en las micobacterias, han sido señaladas como posibles responsables

de esta autofluorescencia. Cuando estas coenzimas se excitan a 405 nm, son capaces de emitir fluorescencia con una longitud de onda máxima de emisión a 470 nm[39]. La presencia de fluorescencia extracelular podría ser una consecuencia de la liberación de estas moléculas a medida que las células mueren en el proceso de formación de biopelícula[38]. Esto podría explicar el aumento de fluorescencia extracelular cuando las biopelículas de *M. abscessus* fueron expuestas a las diferentes formas de *Methylobacterium sp.*, alcanzándose un máximo tras 48 horas de exposición en todos los casos, de forma similar a lo que había sucedido en un estudio previo tras la exposición de las mismas biopelículas a antibióticos o sustancias antibiopelícula, como Tween o N-acetilcisteína[215]. Sin embargo, este efecto no se observó en biopelículas de *M. chelonae* ni *M. fortuitum*.

Con respecto al experimento realizado utilizando el método de Calgary modificado usando las placas *MBEC<sup>TM</sup> Biofilm Inoculator*, se observó que el mayor descenso en el recuento (log UFC/proyección) tuvo lugar en las biopelículas de *M. chelonae* después del tratamiento con ambas formas de *Methylobacterium sp.* Este hecho está claramente relacionado con el experimento anterior (MCLB) en el cual la máxima reducción de la superficie cubierta y el espesor fue observada en biopelículas de *M. chelonae*. En las biopelículas de *M. fortuitum*, el recuento fue significativamente más bajo con la forma autoclavada de *Methylobacterium sp.* a las 48 y 72 horas de exposición, pero no se encontraron diferencias significativas con el extracto respecto al control. Este hecho podría estar relacionado con que las biopelículas de *M. fortuitum* fueron las menos afectadas por *Methylobacterium sp.* en la reducción de los parámetros espesor y

## Discusión

superficie cubierta. Finalmente, las biopelículas de *M. abscessus* fueron reducidas significativamente en el recuento de UFC tras la exposición a *Methylobacterium sp.* autoclavado durante 72 horas, y con el extracto a todos los tiempos. En comparación con el experimento realizado con MCLB, la superficie cubierta y el espesor se redujeron significativamente a todos los tiempos con las dos formas de *Methylobacterium sp.*

Por lo tanto, podemos confirmar la hipótesis de que *Methylobacterium sp.* inhibe la formación de las biopelículas, ya que la superficie cubierta y el espesor son los parámetros más afectados. Sin embargo, también se puede observar una reducción en el recuento de UFC y un aumento de micobacterias muertas, en especial en las biopelículas de *M. chelonae*, lo que podría indicar cierto efecto bactericida.

En conclusión, la superficie cubierta y el espesor de las biopelículas de micobacterias se vieron más afectadas por *Methylobacterium sp.* que el recuento de UFC, pero existe una concordancia entre los dos experimentos. El efecto de *Methylobacterium sp.* en las biopelículas de micobacterias podría ser una consecuencia de la interrupción del *quorum sensing* micobacteriano por un compuesto presente en *Methylobacterium sp.* ya que este tipo de interacción ha sido descrito para otras especies[26].

### **6.3. Evaluación del efecto de *Methylobacterium sp.* combinado con claritromicina sobre biopelículas de *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum*.**

Las MNT son resistentes a los fármacos antituberculosos convencionales, pero son sensibles a otros antimicrobianos de amplio espectro, aunque existe gran variabilidad según especies. Este hecho motiva la realización de estudios de sensibilidad *in vitro*; si bien, algunos estudios han permitido orientar un tratamiento empírico. En MNPCR los antibióticos que se suelen ensayar son macrólidos, aminoglucósidos, fluoroquinolonas, cefoxitina, imipenem, linezolid, tigeciclina, doxicilina y trimetoprim-sulfametoxazol[73, 77, 216, 217].

Entre los macrólidos, la claritromicina tiene buena actividad frente a la mayoría de MNT convencionales[98, 217]. Es un antibiótico que inhibe la traducción de proteínas mediante la unión a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano y es uno de los tratamientos de primera elección en enfermedad por MNT[54, 117, 218]. La claritromicina tiene buena biodisponibilidad oral y tiene buena eficacia frente a MNPCR, excepto frente a *M. fortuitum* en la mayoría de los casos[40].

Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, la formación de biopelículas implica un aumento de la resistencia frente a antibióticos y desinfectantes, siendo un factor de patogenicidad clave para la supervivencia de estas bacterias[41, 42]. Por todo esto, es constante la búsqueda de nuevas sustancias antibiopelícula. Chun y Khanum probaron la eficacia de péptidos antimicrobianos (solos y en combinación con antibióticos)[43], Kalan y col. estudiaron compuestos químicos como el oxinitrato de plata[45] y Lazarini y col. testaron un compuesto

## Discusión

proveniente de un fruto de Brasil[44]. En el ámbito de las MNPCR, Muñoz-Egea y col. demostraron la eficacia de Tween 80 y N-acetilcisteína como sustancias antibiopelícula, solas y en combinación con antibióticos[215].

Como se demostró en el punto anterior, *Methylobacterium sp.* es capaz de inhibir las biopelículas de MNPCR; por lo tanto, el siguiente objetivo fue comprobar si la combinación con claritromicina tendría algún efecto sinérgico y si la reducción de la biopelícula sería mayor que solo con *Methylobacterium sp.* Como una bacteria viva no siempre es útil para un tratamiento por las posibles infecciones oportunistas, se combinó claritromicina con *Methylobacterium sp.* autoclavado y extracto.

En el experimento llevado a cabo con MCLB, el parámetro en el que hubo más diferencia al añadir claritromicina respecto a *Methylobacterium sp.* sin antibiótico fue el porcentaje de micobacterias muertas. Este porcentaje aumentó significativamente en las biopelículas de *M. abscessus* y *M. chelonae*, tanto al combinar el antibiótico con la forma autoclavada como con el extracto de *Methylobacterium sp.* Especial relevancia tuvo la adición de claritromicina a la forma autoclavada de *Methylobacterium sp.* en el caso de las biopelículas de *M. abscessus* tras la exposición durante 72 horas a esta combinación: el porcentaje de micobacterias muertas aumentó desde un 2,74% con *Methylobacterium sp.* autoclavado a un 79,03% con la combinación de *Methylobacterium sp.* autoclavado y claritromicina. En las biopelículas de *M. fortuitum* el aumento de micobacterias muertas al añadir claritromicina solo tuvo lugar cuando la forma autoclavada de *Methylobacterium sp.* estaba presente.

En cuanto al espesor de la biopelícula, solo se redujo por la adición de claritromicina a ambas formas de *Methylobacterium sp.* en las biopelículas de *M. abscessus*; no hubo reducción ni en las biopelículas de *M. chelonae* ni en las de *M. fortuitum*. Sin embargo, en el parámetro porcentaje de superficie cubierta ocurrió lo contrario; no hubo diferencias por adición de claritromicina en las biopelículas de *M. abscessus*, pero si se observó una reducción en la superficie cubierta de las biopelículas de *M. chelonae* cuando se expusieron a las combinaciones de *Methylobacterium sp.* autoclavado y claritromicina y *Methylobacterium sp.* extracto y claritromicina respecto a *Methylobacterium sp.* sin antibiótico a las 24 y 48 horas de exposición; y en el caso de las biopelículas de *M. fortuitum* con ambas combinaciones a todos los tiempos de exposición.

El porcentaje de autofluorescencia apenas sufrió variación con la adición de claritromicina, únicamente disminuyó en algunos casos.

En el experimento realizado utilizando el método de Calgary modificado usando las placas *MBEC<sup>TM</sup> Biofilm Inoculator* el recuento de colonias no se vio demasiado afectado por la adición de claritromicina. La única combinación eficaz sobre biopelículas de *M. chelonae* parece ser *Methylobacterium sp.* extracto + claritromicina, ya que disminuyó significativamente el recuento con respecto a *Methylobacterium sp.* sin antibiótico a todos los tiempos.

Por lo tanto, la adición de claritromicina no parece aportar demasiadas ventajas cuando se combina con *Methylobacterium sp.* Hay que tener en cuenta que la concentración de *Methylobacterium sp.* se redujo a la mitad en comparación con

## Discusión

los experimentos anteriores al combinarlo con claritromicina. En el estudio llevado a cabo por Muñoz-Egea y col.[215], en el que se estudiaron varios antibióticos sobre biopelículas de *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum*, se demostró que claritromicina no mostró prácticamente actividad frente a las mismas, y ciprofloxacino resultó ser el antibiótico más activo frente a estas biopelículas; por lo que, en estudios futuros, podría estudiarse la combinación de *Methylobacterium sp.* con esta fluoroquinolona.

## **7. CONCLUSIONES**



1. La morfología de colonia en cultivos *in vitro* de *M. abscessus* y *M. fortuitum* parece estar relacionada con la fagocitosis en macrófagos de estas micobacterias, siendo mayor en las cepas con fenotipo de colonia rugoso. Sin embargo, no parece que haya diferencias en la fagocitosis entre cepas de colonia lisa y rugosa en *M. chelonae*.
2. El modelo experimental con larvas de *G. mellonella* fue útil para evaluar la patogenicidad de diferentes cepas (colección y clínicas) de *M. abscessus*, *M. fortuitum* y *M. chelonae*; ya que todas las larvas infectadas presentaron mayor mortalidad que los grupos control.
3. La supervivencia a los 7 días de larvas de *G. mellonella* infectadas con cepas de colonia rugosa de *M. abscessus* y *M. fortuitum* fue menor que aquellas larvas infectadas con fenotipos de colonia lisa de ambas especies. Sin embargo, no hubo diferencias en la mortalidad en larvas infectadas con cepas de diferente fenotipo de colonia de *M. chelonae*.
4. El estudio de la actividad y melanización de larvas de *G. mellonella* infectadas con *M. abscessus*, *M. fortuitum* y *M. chelonae* apoyó los resultados de supervivencia; sin embargo, el estudio de la formación de pupa no parece útil en este modelo de infección.
5. Según los modelos desarrollados (*in vitro* e *in vivo*) la morfología de colonia en *M. abscessus* y *M. fortuitum* parece influir en la patogenicidad, por lo que podría tener implicación en el significado clínico de los aislamientos y podría ser útil en el manejo de los pacientes.
6. *Methylobacterium sp.* es capaz de reducir el espesor y la superficie cubierta de las biopelículas de *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum*; no siendo necesaria la forma viva de *Methylobacterium sp.* para esta reducción, ya que también la

## Conclusiones

producen la forma autoclavada y un extracto bacteriano obtenido por sonicación, siendo mayor la reducción de ambos parámetros con la forma autoclavada de *Methylobacterium sp.* que con el extracto.

7. El porcentaje de micobacterias muertas fue significativamente mayor con respecto al control tras la exposición de las biopelículas de *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum* a *Methylobacterium sp.* a determinados tiempos y con determinada forma de *Methylobacterium sp.* en cada especie micobacteriana.
8. El porcentaje de autofluorescencia aumentó tras la exposición de las biopelículas de *M. abscessus* a *Methylobacterium sp.* con respecto al control; sin embargo, esto no ocurrió en biopelículas de *M. chelonae* y *M. fortuitum*.
9. El recuento de UFC/proyección llevado a cabo mediante el método de Calgary modificado demostró que *Methylobacterium sp.* (autoclavado y extracto) es capaz de reducir significativamente el recuento bacteriano en las biopelículas de *M. chelonae* a todos los tiempos. Sin embargo, en biopelículas de *M. abscessus* la reducción solo fue significativa con respecto al control con *Methylobacterium sp.* autoclavado a las 72 horas de exposición y con el extracto a todos los tiempos; y en biopelículas de *M. fortuitum* solo demostró eficacia en la reducción la forma autoclavada de *Methylobacterium sp.* a las 48 y 72 horas de exposición.
10. La combinación de *Methylobacterium sp.* (autoclavado y extracto) y claritromicina no parece suponer una clara mejora en la reducción del espesor y superficie cubierta de las biopelículas de *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum* con respecto a la utilización de *Methylobacterium sp.* sin antibiótico.
11. La combinación de *Methylobacterium sp.* (autoclavado y extracto) y claritromicina aumentó la letalidad, siendo mayor el porcentaje de micobacterias muertas de las biopelículas de *M. abscessus* y *M. chelonae* con respecto a la

utilización de *Methylobacterium sp.* sin antibiótico. En las biopelículas de *M. fortuitum* este porcentaje se incrementó con la combinación de *Methylobacterium sp.* autoclavado y claritromicina, pero no con la utilización de *Methylobacterium sp.* extracto y claritromicina.



## **8. BIBLIOGRAFÍA**



1. Ahmed, I., K. Jabeen, and R. Hasan, *Identification of non-tuberculous mycobacteria isolated from clinical specimens at a tertiary care hospital: a cross-sectional study*. BMC Infect Dis, 2013. **13**: p. 493.
2. Falkinham, J.O., 3rd, *Nontuberculous mycobacteria in the environment*. Clin Chest Med, 2002. **23**(3): p. 529-51.
3. McGrath, E.E., et al., *Nontuberculous mycobacteria and the lung: from suspicion to treatment*. Lung, 2010. **188**(4): p. 269-82.
4. Kressel, A.B. and F. Kidd, *Pseudo-outbreak of Mycobacterium chelonae and Methylobacterium mesophilicum caused by contamination of an automated endoscopy washer*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2001. **22**(7): p. 414-8.
5. Kohler, P., et al., *Healthcare-associated prosthetic heart valve, aortic vascular graft, and disseminated Mycobacterium chimaera infections subsequent to open heart surgery*. Eur Heart J, 2015. **36**(40): p. 2745-53.
6. Russell, C.D., et al., *Non-tuberculous mycobacteria: a retrospective review of Scottish isolates from 2000 to 2010*. Thorax, 2014. **69**(6): p. 593-5.
7. Brown-Elliott, B.A. and R.J. Wallace, Jr., *Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria*. Clin Microbiol Rev, 2002. **15**(4): p. 716-46.
8. Benwill, J.L. and R.J. Wallace, Jr., *Mycobacterium abscessus: challenges in diagnosis and treatment*. Curr Opin Infect Dis, 2014. **27**(6): p. 506-10.
9. Qvist, T., et al., *Shifting paradigms of nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis*. Respir Res, 2014. **15**: p. 41.
10. Floto, R.A., et al., *US Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society consensus recommendations for the management of non-tuberculous*

## Bibliografia

- mycobacteria in individuals with cystic fibrosis: executive summary*. Thorax, 2016. **71**(1): p. 88-90.
11. Cho, S.Y., et al., *Mycobacterium chelonae infections associated with bee venom acupuncture*. Clin Infect Dis, 2014. **58**(5): p. e110-3.
  12. Yu, J.R., et al., *Skin and Soft Tissue Infection due to Rapidly Growing Mycobacteria: Case Series and Literature Review*. Infect Chemother, 2013. **45**(1): p. 85-93.
  13. Belisle, J.T. and P.J. Brennan, *Chemical basis of rough and smooth variation in mycobacteria*. J Bacteriol, 1989. **171**(6): p. 3465-70.
  14. Byrd, T.F. and C.R. Lyons, *Preliminary characterization of a Mycobacterium abscessus mutant in human and murine models of infection*. Infect Immun, 1999. **67**(9): p. 4700-7.
  15. Barrow, W.W. and P.J. Brennan, *Isolation in high frequency of rough variants of Mycobacterium intracellulare lacking C-mycoside glycopeptidolipid antigens*. J Bacteriol, 1982. **150**(1): p. 381-4.
  16. Eckstein, T.M., et al., *A genetic mechanism for deletion of the ser2 gene cluster and formation of rough morphological variants of Mycobacterium avium*. J Bacteriol, 2000. **182**(21): p. 6177-82.
  17. Howard, S.T., 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*. Microbiology, 2006. **152**(Pt 6): p. 1581-90.
  18. Esteban, J. and M. Garcia-Coca, *Mycobacterium Biofilms*. Front Microbiol, 2017. **8**: p. 2651.

19. Esteban, J., et al., *Biofilm development by potentially pathogenic non-pigmented rapidly growing mycobacteria*. BMC Microbiol, 2008. **8**: p. 184.
20. Gomez-Smith, C.K., T.M. LaPara, and R.M. Hozalski, *Sulfate Reducing Bacteria and Mycobacteria Dominate the Biofilm Communities in a Chloraminated Drinking Water Distribution System*. Environ Sci Technol, 2015. **49**(14): p. 8432-40.
21. Howard, S.T. and T.F. Byrd, *The rapidly growing mycobacteria: saprophytes and parasites*. Microbes Infect, 2000. **2**(15): p. 1845-53.
22. Mullis, S.N. and J.O. Falkinham, 3rd, *Adherence and biofilm formation of Mycobacterium avium, Mycobacterium intracellulare and Mycobacterium abscessus to household plumbing materials*. J Appl Microbiol, 2013. **115**(3): p. 908-14.
23. Gallego, V., M.T. Garcia, and A. Ventosa, *Methylobacterium hispanicum sp. nov. and Methylobacterium aquaticum sp. nov., isolated from drinking water*. Int J Syst Evol Microbiol, 2005. **55**(Pt 1): p. 281-7.
24. Lee, S.W., et al., *Methylobacterium dankookense sp. nov., isolated from drinking water*. J Microbiol, 2009. **47**(6): p. 716-20.
25. Feazel, L.M., et al., *Opportunistic pathogens enriched in showerhead biofilms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(38): p. 16393-9.
26. Munoz Egea, M.C., et al., *Inhibition of Adherence of Mycobacterium avium to Plumbing Surface Biofilms of Methylobacterium spp.* Pathogens, 2017. **6**(3).
27. Petrini, B., *Mycobacterium abscessus: an emerging rapid-growing potential pathogen*. APMIS, 2006. **114**(5): p. 319-28.
28. Udou, T., *Extracellular hemolytic activity in rapidly growing mycobacteria*. Can J Microbiol, 1994. **40**(4): p. 318-21.

## Bibliografia

29. Bakala N'Goma, J.C., et al., *Mycobacterium abscessus phospholipase C expression is induced during coculture within amoebae and enhances M. abscessus virulence in mice*. Infect Immun, 2015. **83**(2): p. 780-91.
30. Nessar, R., et al., *Deletion of the mmpL4b gene in the Mycobacterium abscessus glycopeptidolipid biosynthetic pathway results in loss of surface colonization capability, but enhanced ability to replicate in human macrophages and stimulate their innate immune response*. Microbiology, 2011. **157**(Pt 4): p. 1187-95.
31. Orme, I.M., et al., *Animal and cell-culture models for the study of mycobacterial infections and treatment*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1994. **13**(11): p. 994-9.
32. Shepard, C.C., *Growth characteristics in HeLa cells of the rapidly growing acid fast bacteria, Mycobacterium fortuitum, Mycobacterium phlei, and Mycobacterium smegmatis*. J Bacteriol, 1957. **73**(6): p. 722-6.
33. Roux, A.L., et al., *The distinct fate of smooth and rough Mycobacterium abscessus variants inside macrophages*. Open Biol, 2016. **6**(11).
34. Esteban, J., et al., *[Assessment of the invasiveness of rapidly-growing nonpigmented mycobacteria with the fibroblast microcolony assay]*. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2006. **24**(9): p. 551-5.
35. Tsai, C.J., J.M. Loh, and T. Proft, *Galleria mellonella infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing*. Virulence, 2016. **7**(3): p. 214-29.
36. Meir, M., T. Grosfeld, and D. Barkan, *Establishment and Validation of Galleria mellonella as a Novel Model Organism To Study Mycobacterium abscessus Infection, Pathogenesis, and Treatment*. Antimicrob Agents Chemother, 2018. **62**(4).

37. Falkinham, J.O., 3rd, et al., *Methylobacterium spp. as an indicator for the presence or absence of Mycobacterium spp.* Int J Mycobacteriol, 2016. **5**(2): p. 240-3.
38. Munoz-Egea, M.C., et al., *Autofluorescence as a tool for structural analysis of biofilms formed by nonpigmented rapidly growing mycobacteria.* Appl Environ Microbiol, 2013. **79**(3): p. 1065-7.
39. Patino, S., et al., *Autofluorescence of mycobacteria as a tool for detection of Mycobacterium tuberculosis.* J Clin Microbiol, 2008. **46**(10): p. 3296-302.
40. Alcaide F, E.J., González-Martín J, Palacios-Gutiérrez JJ, *Procedimientos de Microbiología: Micobacterias*, S.E.d.E.I.y.M.C. (SEIMC), Editor. 2005.
41. Hall-Stoodley, L., J.W. Costerton, and P. Stoodley, *Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases.* Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(2): p. 95-108.
42. Stewart, P.S., *Biophysics of biofilm infection.* Pathog Dis, 2014. **70**(3): p. 212-8.
43. Chung, P.Y. and R. Khanum, *Antimicrobial peptides as potential anti-biofilm agents against multidrug-resistant bacteria.* J Microbiol Immunol Infect, 2017. **50**(4): p. 405-410.
44. Lazarini, J.G., et al., *Bioprospection of Eugenia brasiliensis, a Brazilian native fruit, as a source of anti-inflammatory and antibiofilm compounds.* Biomed Pharmacother, 2018. **102**: p. 132-139.
45. Kalan, L.R., et al., *Targeting biofilms of multidrug-resistant bacteria with silver oxynitrate.* Int J Antimicrob Agents, 2017. **49**(6): p. 719-726.
46. Tortoli, E., *The new mycobacteria: an update.* FEMS Immunol Med Microbiol, 2006. **48**(2): p. 159-78.

## Bibliografia

47. Tortoli, E., *Microbiological features and clinical relevance of new species of the genus Mycobacterium*. Clin Microbiol Rev, 2014. **27**(4): p. 727-52.
48. Parte, A.C., *LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on*. Int J Syst Evol Microbiol, 2018. **68**(6): p. 1825-1829.
49. Koch, R., *Classics in infectious diseases. The etiology of tuberculosis: Robert Koch. Berlin, Germany 1882*. Rev Infect Dis, 1982. **4**(6): p. 1270-4.
50. Wiens, K.E., et al., *Global variation in bacterial strains that cause tuberculosis disease: a systematic review and meta-analysis*. BMC Med, 2018. **16**(1): p. 196.
51. Reibel, F., E. Cambau, and A. Aubry, *Update on the epidemiology, diagnosis, and treatment of leprosy*. Med Mal Infect, 2015. **45**(9): p. 383-93.
52. Wolinsky, E., *Nontuberculous mycobacteria and associated diseases*. Am Rev Respir Dis, 1979. **119**(1): p. 107-59.
53. Falkinham, J.O., 3rd, *Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria*. Clin Microbiol Rev, 1996. **9**(2): p. 177-215.
54. Griffith, D.E., et al., *An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases*. Am J Respir Crit Care Med, 2007. **175**(4): p. 367-416.
55. McGrath, E.E. and P.B. Anderson, *Increased prevalence of non-tuberculous mycobacteria infection*. Lancet, 2007. **370**(9581): p. 28.
56. Schulze-Robbecke, R. and R. Fischeder, *Mycobacteria in biofilms*. Zentralbl Hyg Umweltmed, 1989. **188**(3-4): p. 385-90.
57. Cummins, C.S., *Chemical composition and antigenic structure of cell walls of Corynebacterium, Mycobacterium, Nocardia, Actinomyces and Arthrobacter*. J Gen Microbiol, 1962. **28**: p. 35-50.

58. Murray PR, R.K., Pfäuer MA, *Microbiología Médica*. 6ª Edición ed, ed. E.E. Mosby. 2009.
59. Runyon, E.H., *Anonymous mycobacteria in pulmonary disease*. Med Clin North Am, 1959. **43**(1): p. 273-90.
60. van Ingen, J., et al., *Environmental sources of rapid growing nontuberculous mycobacteria causing disease in humans*. Clin Microbiol Infect, 2009. **15**(10): p. 888-93.
61. Adekambi, T., et al., *Survival of environmental mycobacteria in Acanthamoeba polyphaga*. Appl Environ Microbiol, 2006. **72**(9): p. 5974-81.
62. Eichler, S., et al., *Composition and dynamics of bacterial communities of a drinking water supply system as assessed by RNA- and DNA-based 16S rRNA gene fingerprinting*. Appl Environ Microbiol, 2006. **72**(3): p. 1858-72.
63. Henne, K., et al., *Analysis of structure and composition of bacterial core communities in mature drinking water biofilms and bulk water of a citywide network in Germany*. Appl Environ Microbiol, 2012. **78**(10): p. 3530-8.
64. Schulze-Robbecke, R., *[Mycobacteria in the environment]*. Immun Infekt, 1993. **21**(5): p. 126-31.
65. Schulze-Robbecke, R., B. Janning, and R. Fischeder, *Occurrence of mycobacteria in biofilm samples*. Tuber Lung Dis, 1992. **73**(3): p. 141-4.
66. Meyers, H., et al., *An outbreak of Mycobacterium chelonae infection following liposuction*. Clin Infect Dis, 2002. **34**(11): p. 1500-7.
67. Winthrop, K.L., et al., *An outbreak of mycobacterial furunculosis associated with footbaths at a nail salon*. N Engl J Med, 2002. **346**(18): p. 1366-71.
68. Vijayaraghavan, R., et al., *Hospital outbreak of atypical mycobacterial infection of port sites after laparoscopic surgery*. J Hosp Infect, 2006. **64**(4): p. 344-7.

## Bibliografia

69. Kennedy, B.S., et al., *Outbreak of Mycobacterium chelonae infection associated with tattoo ink*. N Engl J Med, 2012. **367**(11): p. 1020-4.
70. Guimaraes, T., et al., *Pseudooutbreak of rapidly growing mycobacteria due to Mycobacterium abscessus subsp bolletii in a digestive and respiratory endoscopy unit caused by the same clone as that of a countrywide outbreak*. Am J Infect Control, 2016. **44**(11): p. e221-e226.
71. De Groote, M.A., et al., *Relationships between Mycobacterium isolates from patients with pulmonary mycobacterial infection and potting soils*. Appl Environ Microbiol, 2006. **72**(12): p. 7602-6.
72. Behr, M.A. and J.O. Falkingham, 3rd, *Molecular epidemiology of nontuberculous mycobacteria*. Future Microbiol, 2009. **4**(8): p. 1009-20.
73. De Groote, M.A. and G. Huitt, *Infections due to rapidly growing mycobacteria*. Clin Infect Dis, 2006. **42**(12): p. 1756-63.
74. Wallace, R.J., Jr., B.A. Brown, and G.O. Onyi, *Skin, soft tissue, and bone infections due to Mycobacterium chelonae chelonae: importance of prior corticosteroid therapy, frequency of disseminated infections, and resistance to oral antimicrobials other than clarithromycin*. J Infect Dis, 1992. **166**(2): p. 405-12.
75. Ingram, C.W., et al., *Disseminated infection with rapidly growing mycobacteria*. Clin Infect Dis, 1993. **16**(4): p. 463-71.
76. Griffith, D.E., W.M. Girard, and R.J. Wallace, Jr., *Clinical features of pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria. An analysis of 154 patients*. Am Rev Respir Dis, 1993. **147**(5): p. 1271-8.
77. Han, X.Y., I. De, and K.L. Jacobson, *Rapidly growing mycobacteria: clinical and microbiologic studies of 115 cases*. Am J Clin Pathol, 2007. **128**(4): p. 612-21.

78. Arend, S.M., D. van Soolingen, and T.H. Ottenhoff, *Diagnosis and treatment of lung infection with nontuberculous mycobacteria*. *Curr Opin Pulm Med*, 2009. **15**(3): p. 201-8.
79. Olivier, K.N., et al., *Nontuberculous mycobacteria. I: multicenter prevalence study in cystic fibrosis*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003. **167**(6): p. 828-34.
80. Centers for Disease, C. and Prevention, *Mycobacterium chelonae infections associated with face lifts--New Jersey, 2002-2003*. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2004. **53**(9): p. 192-4.
81. Centers for Disease, C. and Prevention, *Nontuberculous mycobacterial infections after cosmetic surgery--Santo Domingo, Dominican Republic, 2003-2004*. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2004. **53**(23): p. 509.
82. van Dissel, J.T. and E.J. Kuijper, *Rapidly growing mycobacteria: emerging pathogens in cosmetic procedures of the skin*. *Clin Infect Dis*, 2009. **49**(9): p. 1365-8.
83. Winthrop, K.L., et al., *The clinical management and outcome of nail salon-acquired Mycobacterium fortuitum skin infection*. *Clin Infect Dis*, 2004. **38**(1): p. 38-44.
84. Wagner, D. and L.S. Young, *Nontuberculous mycobacterial infections: a clinical review*. *Infection*, 2004. **32**(5): p. 257-70.
85. Swanson, D.S., *Central venous catheter-related infections due to nontuberculous Mycobacterium species*. *Pediatr Infect Dis J*, 1998. **17**(12): p. 1163-4.
86. Reilly, A.F. and K.L. McGowan, *Atypical mycobacterial infections in children with cancer*. *Pediatr Blood Cancer*, 2004. **43**(6): p. 698-702.

## Bibliografia

87. Hu, Y.L., et al., *Mycobacterium fortuitum* causing infection of a biventricular pacemaker/implantable cardioverter defibrillator. *Int J Mycobacteriol*, 2012. 1(4): p. 221-3.
88. Eid, A.J., et al., *Prosthetic joint infection due to rapidly growing mycobacteria: report of 8 cases and review of the literature*. *Clin Infect Dis*, 2007. 45(6): p. 687-94.
89. El Helou, G., et al., *Management of rapidly growing mycobacterial bacteremia in cancer patients*. *Clin Infect Dis*, 2013. 56(6): p. 843-6.
90. *Mycobacterioses and the acquired immunodeficiency syndrome. Joint Position Paper of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control*. *Am Rev Respir Dis*, 1987. 136(2): p. 492-6.
91. Dorman, S.E. and S.M. Holland, *Interferon-gamma and interleukin-12 pathway defects and human disease*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2000. 11(4): p. 321-33.
92. Casanova, J.L. and L. Abel, *Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model*. *Annu Rev Immunol*, 2002. 20: p. 581-620.
93. Iseman, M.D., D.L. Buschman, and L.M. Ackerson, *Pectus excavatum and scoliosis. Thoracic anomalies associated with pulmonary disease caused by Mycobacterium avium complex*. *Am Rev Respir Dis*, 1991. 144(4): p. 914-6.
94. Fulton, S.A., et al., *Interleukin-12 production by human monocytes infected with Mycobacterium tuberculosis: role of phagocytosis*. *Infect Immun*, 1996. 64(7): p. 2523-31.
95. Fregnan, G.B. and D.W. Smith, *Description of various colony forms of mycobacteria*. *J Bacteriol*, 1962. 83: p. 819-27.

96. Schaefer, W.B., C.L. Davis, and M.L. Cohn, *Pathogenicity of transparent, opaque, and rough variants of Mycobacterium avium in chickens and mice*. Am Rev Respir Dis, 1970. **102**(4): p. 499-506.
97. van Ingen, J., *Microbiological diagnosis of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease*. Clin Chest Med, 2015. **36**(1): p. 43-54.
98. Garcia-Martos, P. and L. Garcia-Agudo, *[Infections due to rapidly growing mycobacteria]*. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2012. **30**(4): p. 192-200.
99. Alcaide Fernandez de Vega, F., *[New methods for mycobacteria identification]*. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2006. **24 Suppl 1**: p. 53-7.
100. Hall, L., et al., *Evaluation of the MicroSeq system for identification of mycobacteria by 16S ribosomal DNA sequencing and its integration into a routine clinical mycobacteriology laboratory*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(4): p. 1447-53.
101. Ringuet, H., et al., *hsp65 sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria*. J Clin Microbiol, 1999. **37**(3): p. 852-7.
102. Adekambi, T., P. Colson, and M. Drancourt, *rpoB-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(12): p. 5699-708.
103. Uslan, D.Z., et al., *Skin and soft tissue infections due to rapidly growing mycobacteria: comparison of clinical features, treatment, and susceptibility*. Arch Dermatol, 2006. **142**(10): p. 1287-92.
104. van Ingen, J., *Diagnosis of nontuberculous mycobacterial infections*. Semin Respir Crit Care Med, 2013. **34**(1): p. 103-9.
105. Kurahara, Y., et al., *Mixed pulmonary infection with three types of nontuberculous mycobacteria*. Intern Med, 2013. **52**(4): p. 507-10.

## Bibliografia

106. Alvarez-Uria, G., *Lung disease caused by nontuberculous mycobacteria*. *Curr Opin Pulm Med*, 2010. **16**(3): p. 251-6.
107. van Ingen, J., et al., *Clinical relevance of non-tuberculous mycobacteria isolated in the Nijmegen-Arnhem region, The Netherlands*. *Thorax*, 2009. **64**(6): p. 502-6.
108. Gubler, J.G., M. Salfinger, and A. von Graevenitz, *Pseudoepidemic of nontuberculous mycobacteria due to a contaminated bronchoscope cleaning machine. Report of an outbreak and review of the literature*. *Chest*, 1992. **101**(5): p. 1245-9.
109. Ghosh, R., et al., *Biofilm colonization of Mycobacterium abscessus: New threat in hospital-acquired surgical site infection*. *Indian J Tuberc*, 2017. **64**(3): p. 178-182.
110. Fine, P.E., et al., *Environmental mycobacteria in northern Malawi: implications for the epidemiology of tuberculosis and leprosy*. *Epidemiol Infect*, 2001. **126**(3): p. 379-87.
111. Bhatta, H., E.M. Goldys, and R.P. Learmonth, *Use of fluorescence spectroscopy to differentiate yeast and bacterial cells*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006. **71**(1): p. 121-6.
112. Alimova, A., et al., *Native fluorescence and excitation spectroscopic changes in Bacillus subtilis and Staphylococcus aureus bacteria subjected to conditions of starvation*. *Appl Opt*, 2003. **42**(19): p. 4080-7.
113. Woods GL, B.-E.B., Desmond EP et al. , *Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes; approved standard*. , C.a.L.S.I. (CLSI), Editor. 2003.
114. Woods, G.L., et al., *Multisite reproducibility of results obtained by the broth microdilution method for susceptibility testing of Mycobacterium abscessus*,

- Mycobacterium chelonae*, and *Mycobacterium fortuitum*. J Clin Microbiol, 1999. **37**(6): p. 1676-82.
115. Woods, G.L., *Susceptibility testing for mycobacteria*. Clin Infect Dis, 2000. **31**(5): p. 1209-15.
116. van Ingen, J., et al., *Resistance mechanisms and drug susceptibility testing of nontuberculous mycobacteria*. Drug Resist Updat, 2012. **15**(3): p. 149-61.
117. van Ingen, J., et al., *In vitro drug susceptibility of 2275 clinical non-tuberculous Mycobacterium isolates of 49 species in The Netherlands*. Int J Antimicrob Agents, 2010. **35**(2): p. 169-73.
118. Lambert, P.A., *Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in gram-positive bacteria and mycobacteria*. Symp Ser Soc Appl Microbiol, 2002(31): p. 46S-54S.
119. Bastian, S., et al., *Assessment of clarithromycin susceptibility in strains belonging to the Mycobacterium abscessus group by erm(41) and rrl sequencing*. Antimicrob Agents Chemother, 2011. **55**(2): p. 775-81.
120. Ainsa, J.A., et al., *Molecular cloning and characterization of Tap, a putative multidrug efflux pump present in Mycobacterium fortuitum and Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol, 1998. **180**(22): p. 5836-43.
121. Wallace, R.J., Jr., et al., *Genetic basis for clarithromycin resistance among isolates of Mycobacterium chelonae and Mycobacterium abscessus*. Antimicrob Agents Chemother, 1996. **40**(7): p. 1676-81.
122. Esteban, J., et al., *Detection of lfrA and tap efflux pump genes among clinical isolates of non-pigmented rapidly growing mycobacteria*. Int J Antimicrob Agents, 2009. **34**(5): p. 454-6.

## Bibliografia

123. Nessar, R., et al., *Genetic analysis of new 16S rRNA mutations conferring aminoglycoside resistance in Mycobacterium abscessus*. J Antimicrob Chemother, 2011. **66**(8): p. 1719-24.
124. Nash, K.A., et al., *Molecular basis of intrinsic macrolide resistance in clinical isolates of Mycobacterium fortuitum*. J Antimicrob Chemother, 2005. **55**(2): p. 170-7.
125. Nash, K.A., B.A. Brown-Elliott, and R.J. Wallace, Jr., *A novel gene, erm(41), confers inducible macrolide resistance to clinical isolates of Mycobacterium abscessus but is absent from Mycobacterium chelonae*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(4): p. 1367-76.
126. Nash, K.A., et al., *Intrinsic macrolide resistance in rapidly growing mycobacteria*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(10): p. 3476-8.
127. Brown-Elliott, B.A., K.A. Nash, and R.J. Wallace, Jr., *Antimicrobial susceptibility testing, drug resistance mechanisms, and therapy of infections with nontuberculous mycobacteria*. Clin Microbiol Rev, 2012. **25**(3): p. 545-82.
128. Wallace, R.J., Jr., et al., *Treatment of nonpulmonary infections due to Mycobacterium fortuitum and Mycobacterium chelonae on the basis of in vitro susceptibilities*. J Infect Dis, 1985. **152**(3): p. 500-14.
129. El Helou, G., et al., *Rapidly growing mycobacterial bloodstream infections*. Lancet Infect Dis, 2013. **13**(2): p. 166-74.
130. Esteban, J., et al., *Epidemiology of infections due to nonpigmented rapidly growing mycobacteria diagnosed in an urban area*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2008. **27**(10): p. 951-7.

131. Yang, S.C., et al., *High prevalence of antimicrobial resistance in rapidly growing mycobacteria in Taiwan*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003. **47**(6): p. 1958-62.
132. Celdran, A., et al., *Wound infections due to Mycobacterium fortuitum after polypropylene mesh inguinal hernia repair*. *J Hosp Infect*, 2007. **66**(4): p. 374-7.
133. Costerton, J.W., G.G. Geesey, and K.J. Cheng, *How bacteria stick*. *Sci Am*, 1978. **238**(1): p. 86-95.
134. Costerton, J.W., et al., *Microbial biofilms*. *Annu Rev Microbiol*, 1995. **49**: p. 711-45.
135. O'Toole, G., H.B. Kaplan, and R. Kolter, *Biofilm formation as microbial development*. *Annu Rev Microbiol*, 2000. **54**: p. 49-79.
136. Geesey, G.G., et al., *Microscopic examination of natural sessile bacterial populations from an alpine stream*. *Can J Microbiol*, 1977. **23**(12): p. 1733-6.
137. Dunne, W.M., Jr., *Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?* *Clin Microbiol Rev*, 2002. **15**(2): p. 155-66.
138. Petrova, O.E. and K. Sauer, *Sticky situations: key components that control bacterial surface attachment*. *J Bacteriol*, 2012. **194**(10): p. 2413-25.
139. Rosenberg, M., et al., *Role of Thin Fimbriae in Adherence and Growth of Acinetobacter calcoaceticus RAG-1 on Hexadecane*. *Appl Environ Microbiol*, 1982. **44**(4): p. 929-37.
140. Hernandez, R.T., et al., *Fimbrial adhesins produced by atypical enteropathogenic Escherichia coli strains*. *Appl Environ Microbiol*, 2011. **77**(23): p. 8391-9.
141. Cucarella, C., et al., *Bap, a Staphylococcus aureus surface protein involved in biofilm formation*. *J Bacteriol*, 2001. **183**(9): p. 2888-96.

## Bibliografia

142. Toledo-Arana, A., et al., *The enterococcal surface protein, Esp, is involved in Enterococcus faecalis biofilm formation*. Appl Environ Microbiol, 2001. **67**(10): p. 4538-45.
143. Costerton, J.W., *Biofilm theory can guide the treatment of device-related orthopaedic infections*. Clin Orthop Relat Res, 2005(437): p. 7-11.
144. Simoes, L.C., M. Simoes, and M.J. Vieira, *Biofilm interactions between distinct bacterial genera isolated from drinking water*. Appl Environ Microbiol, 2007. **73**(19): p. 6192-200.
145. Waters, C.M. and B.L. Bassler, *Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2005. **21**: p. 319-46.
146. Mah, T.F., *Biofilm-specific antibiotic resistance*. Future Microbiol, 2012. **7**(9): p. 1061-72.
147. Donlan, R.M., *Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process*. Clin Infect Dis, 2001. **33**(8): p. 1387-92.
148. Stewart, P.S. and J.W. Costerton, *Antibiotic resistance of bacteria in biofilms*. Lancet, 2001. **358**(9276): p. 135-8.
149. Patel, R., *Biofilms and antimicrobial resistance*. Clin Orthop Relat Res, 2005(437): p. 41-7.
150. Mah, T.F. and G.A. O'Toole, *Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents*. Trends Microbiol, 2001. **9**(1): p. 34-9.
151. Zhang, L. and T.F. Mah, *Involvement of a novel efflux system in biofilm-specific resistance to antibiotics*. J Bacteriol, 2008. **190**(13): p. 4447-52.
152. De Kievit, T.R., et al., *Multidrug efflux pumps: expression patterns and contribution to antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa biofilms*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(6): p. 1761-70.

153. Miyaue, S., et al., *Bacterial Memory of Persisters: Bacterial Persister Cells Can Retain Their Phenotype for Days or Weeks After Withdrawal From Colony-Biofilm Culture*. Front Microbiol, 2018. **9**: p. 1396.
154. Du, J., C. Zhao, and X. Wang, [*Research progresses on the pathogenesis of bacterial biofilm in chronic rhinosinusitis*]. Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi, 2013. **27**(8): p. 446-8.
155. Costerton, J.W., P.S. Stewart, and E.P. Greenberg, *Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections*. Science, 1999. **284**(5418): p. 1318-22.
156. Donlan, R.M., *Biofilms: microbial life on surfaces*. Emerg Infect Dis, 2002. **8**(9): p. 881-90.
157. Maki, D.G., C.E. Weise, and H.W. Sarafin, *A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection*. N Engl J Med, 1977. **296**(23): p. 1305-9.
158. Donlan, R.M. and J.W. Costerton, *Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms*. Clin Microbiol Rev, 2002. **15**(2): p. 167-93.
159. Kite, P., et al., *Evaluation of a novel endoluminal brush method for in situ diagnosis of catheter related sepsis*. J Clin Pathol, 1997. **50**(4): p. 278-82.
160. Raad, II, et al., *Quantitative tip culture methods and the diagnosis of central venous catheter-related infections*. Diagn Microbiol Infect Dis, 1992. **15**(1): p. 13-20.
161. Sherertz, R.J., et al., *Three-year experience with sonicated vascular catheter cultures in a clinical microbiology laboratory*. J Clin Microbiol, 1990. **28**(1): p. 76-82.
162. Trampuz, A., et al., *Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection*. N Engl J Med, 2007. **357**(7): p. 654-63.

## Bibliografia

163. Prieto-Borja, L., et al., *Evaluation of the use of sonication of retrieved implants for the diagnosis of prosthetic joint infection in a routine setting*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2018. **37**(4): p. 715-722.
164. Richards, J.P. and A.K. Ojha, *Mycobacterial Biofilms*. Microbiol Spectr, 2014. **2**(5).
165. Zamora, N., et al., *In-vitro evaluation of the adhesion to polypropylene sutures of non-pigmented, rapidly growing mycobacteria*. Clin Microbiol Infect, 2007. **13**(9): p. 902-7.
166. Ojha, A., et al., *GroEL1: a dedicated chaperone involved in mycolic acid biosynthesis during biofilm formation in mycobacteria*. Cell, 2005. **123**(5): p. 861-73.
167. Menozzi, F.D., et al., *Identification of a heparin-binding hemagglutinin present in mycobacteria*. J Exp Med, 1996. **184**(3): p. 993-1001.
168. Ojha, A.K., et al., *Growth of Mycobacterium tuberculosis biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria*. Mol Microbiol, 2008. **69**(1): p. 164-74.
169. Vess, R.W., et al., *The colonization of solid PVC surfaces and the acquisition of resistance to germicides by water micro-organisms*. J Appl Bacteriol, 1993. **74**(2): p. 215-21.
170. Ridgway, H.F., M.G. Rigby, and D.G. Argo, *Adhesion of a Mycobacterium sp. to cellulose diacetate membranes used in reverse osmosis*. Appl Environ Microbiol, 1984. **47**(1): p. 61-7.
171. Recht, J. and R. Kolter, *Glycopeptidolipid acetylation affects sliding motility and biofilm formation in Mycobacterium smegmatis*. J Bacteriol, 2001. **183**(19): p. 5718-24.

172. Recht, J., et al., *Genetic analysis of sliding motility in Mycobacterium smegmatis*. J Bacteriol, 2000. **182**(15): p. 4348-51.
173. Maya-Hoyos, M., et al., *Sliding Motility, Biofilm Formation, and Glycopeptidolipid Production in Mycobacterium colombiense Strains*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 419549.
174. Wallace, R.J., Jr., et al., *Spectrum of disease due to rapidly growing mycobacteria*. Rev Infect Dis, 1983. **5**(4): p. 657-79.
175. Qvist, T., et al., *Chronic pulmonary disease with Mycobacterium abscessus complex is a biofilm infection*. Eur Respir J, 2015. **46**(6): p. 1823-6.
176. Hakim, A., N. Hisam, and P.D. Reuman, *Environmental mycobacterial peritonitis complicating peritoneal dialysis: three cases and review*. Clin Infect Dis, 1993. **16**(3): p. 426-31.
177. Cutay, A.M., et al., *Infection of epicardial pacemaker wires due to Mycobacterium abscessus*. Clin Infect Dis, 1998. **26**(2): p. 520-1.
178. Verghese, S., et al., *Pacemaker implant site infection caused by atypical mycobacteria*. Indian Heart J, 1998. **50**(2): p. 201-2.
179. Bouchiat, C., et al., *Nontuberculous Mycobacteria: An Underestimated Cause of Bioprosthetic Valve Infective Endocarditis*. Open Forum Infect Dis, 2015. **2**(2): p. ofv047.
180. Hall-Stoodley, L., et al., *Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2012. **65**(2): p. 127-45.
181. Greendyke, R. and T.F. Byrd, *Differential antibiotic susceptibility of Mycobacterium abscessus variants in biofilms and macrophages compared to that of planktonic bacteria*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(6): p. 2019-26.

## Bibliografia

182. Ortiz-Perez, A., et al., *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*, 2011. **29**(2): p. 79-84.
183. Munoz-Egea, M.C., M. Garcia-Pedrazuela, and J. Esteban, *[In vitro susceptibility of rapidly growing mycobacteria biofilms against different antimicrobials]*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2015. **33**(2): p. 136-7.
184. Lynch, M.J., A.E. Wopat, and L. O'Connor M, *Characterization of two new facultative methanotrophs*. *Appl Environ Microbiol*, 1980. **40**(2): p. 400-7.
185. Gallego, V., M.T. Garcia, and A. Ventosa, *Methylobacterium isbiliense sp. nov., isolated from the drinking water system of Sevilla, Spain*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005. **55**(Pt 6): p. 2333-7.
186. Gallego, V., M.T. Garcia, and A. Ventosa, *Methylobacterium variabile sp. nov., a methylotrophic bacterium isolated from an aquatic environment*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005. **55**(Pt 4): p. 1429-33.
187. Ochsner, A.M., et al., *Methylobacterium extorquens: methylotrophy and biotechnological applications*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015. **99**(2): p. 517-34.
188. Konovalova, H.M., S.O. Shylin, and P.V. Rokytko, *[Characteristics of carotenoids of methylotrophic bacteria of Methylobacterium genus]*. *Mikrobiol Z*, 2007. **69**(1): p. 35-41.
189. Hiraishi, A., et al., *Phenotypic and genetic diversity of chlorine-resistant Methylobacterium strains isolated from various environments*. *Appl Environ Microbiol*, 1995. **61**(6): p. 2099-107.

190. Li, L., J.J. Tarrand, and X.Y. Han, *Microbiological and clinical features of four cases of catheter-related infection by Methylobacterium radiotolerans*. J Clin Microbiol, 2015. **53**(4): p. 1375-9.
191. Fernandez, M., et al., *Methylobacterium mesophilica as a cause of persistent bacteremia in a child with lymphoma*. Pediatr Infect Dis J, 1997. **16**(10): p. 1007-8.
192. Sanders, J.W., et al., *Methylobacterium mesophilicum infection: case report and literature review of an unusual opportunistic pathogen*. Clin Infect Dis, 2000. **30**(6): p. 936-8.
193. Mori, M., et al., *Biofilm-forming activity of bacteria isolated from toilet bowl biofilms and the bactericidal activity of disinfectants against the isolates*. Biocontrol Sci, 2013. **18**(3): p. 129-35.
194. Baltch, A.L., et al., *Antibacterial activities of gemifloxacin, levofloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin and erythromycin against intracellular Legionella pneumophila and Legionella micdadei in human monocytes*. J Antimicrob Chemother, 2005. **56**(1): p. 104-9.
195. Lefebvre, A.L., et al., *Bactericidal and intracellular activity of beta-lactams against Mycobacterium abscessus*. J Antimicrob Chemother, 2016. **71**(6): p. 1556-63.
196. Herigstad, B., M. Hamilton, and J. Heersink, *How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria*. J Microbiol Methods, 2001. **44**(2): p. 121-9.
197. Loh, J.M., et al., *Galleria mellonella larvae as an infection model for group A streptococcus*. Virulence, 2013. **4**(5): p. 419-28.
198. MC, M.-E., *Análisis estructural y presencia de autofluorescencia en biopelículas formadas por micobacterias no pigmentadas de crecimiento rápido*. 2014.

## Bibliografía

199. Ceri, H., et al., *The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms*. J Clin Microbiol, 1999. **37**(6): p. 1771-6.
200. Esteban-López, M., *Efecto de Methylobacterium sp. sobre biopelículas de M. abscessus*. 2015.
201. Esteban, J., et al., *Current treatment of nontuberculous mycobacteriosis: an update*. Expert Opin Pharmacother, 2012. **13**(7): p. 967-86.
202. Vaerewijck, M.J., et al., *Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health*. FEMS Microbiol Rev, 2005. **29**(5): p. 911-34.
203. Hall-Stoodley, L. and P. Stoodley, *Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens*. Trends Microbiol, 2005. **13**(1): p. 7-10.
204. Ripoll, F., et al., *Non mycobacterial virulence genes in the genome of the emerging pathogen Mycobacterium abscessus*. PLoS One, 2009. **4**(6): p. e5660.
205. Edwards, D. and C.H. Kirkpatrick, *The immunology of mycobacterial diseases*. Am Rev Respir Dis, 1986. **134**(5): p. 1062-71.
206. McGarvey, J. and L.E. Bermudez, *Pathogenesis of nontuberculous mycobacteria infections*. Clin Chest Med, 2002. **23**(3): p. 569-83.
207. Hirsch, C.S., et al., *Complement receptor-mediated uptake and tumor necrosis factor-alpha-mediated growth inhibition of Mycobacterium tuberculosis by human alveolar macrophages*. J Immunol, 1994. **152**(2): p. 743-53.
208. Doi, N., *[Development of the intratracheal infection model of experimental murine mycobacteriosis: comparison with the intravenous infection model]*. Kekkaku, 1998. **73**(5): p. 339-47.

209. Dong, H., et al., *Differences in pathogenicity of three animal isolates of Mycobacterium species in a mouse model*. PLoS One, 2017. **12**(8): p. e0183666.
210. Chen, Z., et al., *Mycobacterium marinum Infection in Zebrafish and Microglia Imitates the Early Stage of Tuberculous Meningitis*. J Mol Neurosci, 2018. **64**(2): p. 321-330.
211. Li, Y., et al., *Galleria mellonella - a novel infection model for the Mycobacterium tuberculosis complex*. Virulence, 2018. **9**(1): p. 1126-1137.
212. Entwistle, F.M. and P.J. Coote, *Evaluation of greater wax moth larvae, Galleria mellonella, as a novel in vivo model for non-tuberculosis Mycobacteria infections and antibiotic treatments*. J Med Microbiol, 2018. **67**(4): p. 585-597.
213. Yano, T., et al., *Stress tolerance of Methylobacterium biofilms in bathrooms*. Microbes Environ, 2013. **28**(1): p. 87-95.
214. Bridgeman, J., et al., *Portable LED fluorescence instrumentation for the rapid assessment of potable water quality*. Sci Total Environ, 2015. **524-525**: p. 338-46.
215. Munoz-Egea, M.C., et al., *Effect of Antibiotics and Antibiofilm Agents in the Ultrastructure and Development of Biofilms Developed by Nonpigmented Rapidly Growing Mycobacteria*. Microb Drug Resist, 2016. **22**(1): p. 1-6.
216. Set, R., et al., *Antimicrobial susceptibility testing of rapidly growing mycobacteria by microdilution - experience of a tertiary care centre*. Indian J Med Microbiol, 2010. **28**(1): p. 48-50.
217. Ruiz-Aragon, J., et al., *[Susceptibility to antimicrobial agents of rapidly growing mycobacteria]*. Rev Esp Quimioter, 2007. **20**(4): p. 429-32.
218. Cowman, S., et al., *The antimicrobial susceptibility of non-tuberculous mycobacteria*. J Infect, 2016. **72**(3): p. 324-31.



## **9. ANEXOS**



**PUBLICACIONES ORIGINALES Y PRESENTACIONES EN CONGRESOS  
RELACIONADOS CON LA TESIS**

**PUBLICACIONES**

1. Non-pigmented rapidly growing mycobacteria smooth and rough colony phenotypes pathogenicity evaluated using in vitro and experimental models. Marta García-Coca, John-Jairo Aguilera-Correa, Arancha Ibáñez Apesteguía, Graciela Rodríguez-Sevilla, David Romera-García, Ignacio Mahíllo-Fernández, Gabriel Reina, Mirian Fernández-Alonso, José Leiva, M.<sup>a</sup> Carmen Muñoz-Egea, José Luis Del Pozo, Jaime Esteban. Under review.
2. Inhibition of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium fortuitum* biofilms by *Methylobacterium sp.* Marta García Coca, Graciela Rodríguez Sevilla, Andrea Pérez Domingo, John-Jairo Aguilera Correa, Jaime Esteban, M.<sup>a</sup> Carmen Muñoz Egea. Under review.
3. Historical evolution of the diseases caused by non-pigmented rapidly growing mycobacteria in a University Hospital. Marta García Coca, Graciela Rodríguez Sevilla, M.<sup>a</sup> Carmen Muñoz Egea, Concepción Pérez Jorge, Nerea Carrasco Antón, Jaime Esteban. Submitted.
4. *Mycobacterium* biofilms. Jaime Esteban and Marta García Coca. *Frontiers of Microbiology*. January 2018.

## COMUNICACIONES EN CONGRESOS INTERNACIONALES

1. Evaluation of *Galleria mellonella* larvae for studying the virulence of *Mycobacterium abscessus*. Marta García Coca, John Aguilera Correa, David Romera, Jaime Esteban. Poster. 28<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Madrid, Spain, 21-24 April 2018.

2. Historical evolution of diseases caused by non-pigmented rapidly growing mycobacteria in a university hospital. Poster. Marta García Coca, Nerea Carrasco Antón, M.<sup>a</sup> Carmen Muñoz Egea, Concepción Pérez Jorge, Graciela Rodríguez Sevilla, Jaime Esteban. 28<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Madrid, Spain, 21-24 April 2018.

3. Inhibition of *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium fortuitum* biofilms by *Methylobacterium sp.* Poster. Marta García Coca, Graciela Rodríguez Sevilla, John Aguilera Correa, Jaime Esteban, M.<sup>a</sup> Carmen Muñoz Egea. 28<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Madrid, Spain, 21-24 April 2018.

4. Effect of *Methylobacterium sp.* combined with clarithromycin on *Mycobacterium abscessus* biofilms. Poster. Marta García Coca, Andrea Pérez Domingo, Jaime Esteban, M.<sup>a</sup> Carmen Muñoz Egea. 28<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Madrid, Spain, 21-24 April 2018.

**COMUNICACIONES EN CONGRESOS NACIONALES**

1. Evaluación del modelo de larvas de *Galleria mellonella* para el estudio de la virulencia de *Mycobacterium abscessus*. Póster. Marta García Coca, John Aguilera Correa, David Romera, Jaime Esteban. XXII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Bilbao, 24-26 mayo 2018.
  
2. Inhibición de biopelículas de *Mycobacterium chelonae* y *Mycobacterium fortuitum* por *Methylobacterium sp.* Comunicación oral. Marta García Coca, Graciela Rodríguez Sevilla, John Aguilera Correa, Alicia Macías Valcayo, Llanos Salar Vidal, Jaime Esteban, M<sup>a</sup> Carmen Muñoz Egea. XXII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Bilbao, 24-26 mayo 2018.
  
3. Efecto de *Methylobacterium sp.* combinado con claritromicina en biopelículas de *Mycobacterium abscessus*. Póster. Marta García Coca, Andrea Pérez Domingo, M.<sup>a</sup> Carmen Muñoz Egea, Jaime Esteban. XXII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Bilbao, 24-26 mayo 2018.
  
4. Evolución histórica de las enfermedades causadas por micobacterias no pigmentadas de crecimiento rápido en un Hospital Universitario. Póster. Marta García Coca, M.<sup>a</sup> Carmen Muñoz Egea, Concepción Pérez Jorge, Graciela Rodríguez Sevilla, Jaime Esteban. XXI Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Málaga, 11-13 mayo 2017.

## OTRAS PUBLICACIONES ORIGINALES Y PRESENTACIONES EN CONGRESOS SOBRE MICOBACTERIAS

### PUBLICACIONES

1. Antimicrobial treatment provides a competitive advantage to *Mycobacterium abscessus* in a dual species biofilm with *Pseudomonas aeruginosa*. Graciela Rodríguez Sevilla, Marta García Coca, John-Jairo Aguilera Correa, Aurelie Crabbé, Jaime Esteban, Concepción Pérez Jorge. Submitted.

2. Non-Tuberculous Mycobacteria multispecies biofilms in cystic fibrosis: development of an in vitro *Mycobacterium abscessus* and *Pseudomonas aeruginosa* dual species biofilm model. Graciela Rodríguez Sevilla, Marta García Coca, David Romera, John Aguilera Correa, Ignacio Mahillo Fernández, Jaime Esteban, Concepción Pérez Jorge. International Journal of Medical Microbiology. April 2018.

### COMUNICACIONES EN CONGRESOS INTERNACIONALES

1. Effect of antibiotic therapy on *Mycobacterium abscessus* and *Pseudomonas aeruginosa* dual-species biofilms. Poster. Graciela Rodríguez Sevilla, Marta García Coca, Jaime Esteban, Concepción Pérez Jorge. 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Madrid, Spain, 21-24 April 2018.

### COMUNICACIONES EN CONGRESOS NACIONALES

1. Efecto del tratamiento antibiótico en biofilms duales de *Mycobacterium abscessus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Comunicación oral. XXII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Bilbao, 24-26 mayo 2018. Graciela Rodríguez Sevilla, Marta García Coca, Jaime Esteban, Concepción Pérez Jorge.

## **BECAS**

### **BECA ESTANCIA CIENTÍFICA**

Beneficiaria de una ayuda otorgada por la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) para realizar una estancia del 1 al 28 de febrero de 2018 en el Servicio de Microbiología de la Clínica Universidad de Navarra (Pamplona) con el objetivo de aprender técnicas de cultivo celular y aplicación de las mismas al cultivo intracelular de micobacterias no pigmentadas de crecimiento rápido y tratamiento antibiótico.