

**Efecto anti-*biofilm* del extracto de
Methylobacterium sp. CECT 7180 sobre la
cepa *Mycobacterium chimaera* contaminante en
origen de equipos de oxigenación extracorpórea**

Inés Pradal Álvarez-Prida

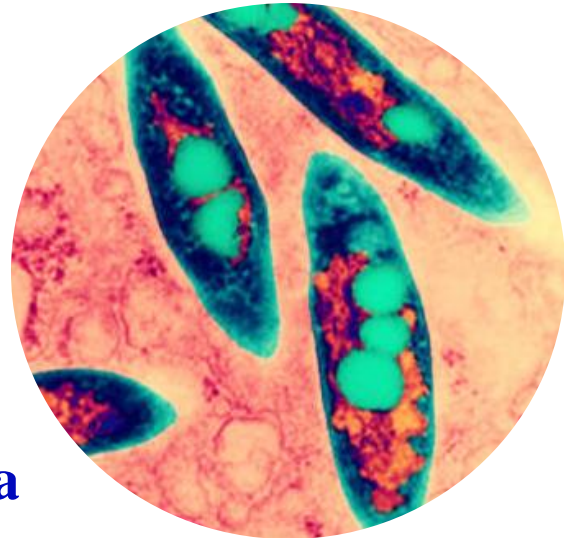
Máster en Microbiología



MÁSTERES
DE LA UAM
2018 - 2019

Facultad de Ciencias

Efecto anti-*biofilm* del extracto de *Methylobacterium sp.* CECT 7180 sobre la cepa *Mycobacterium chimaera* contaminante en origen de equipos de oxigenación extracorpórea



© @ ISED S.p.A.

Inés Pradal Álvarez-Prida¹

Director: John Jairo Aguilera Correa¹

Tutor académico: Jaime Esteban Moreno¹

¹ Departamento de Microbiología Clínica. Instituto de Investigación Sanitaria-Fundación Jiménez-Díaz. Universidad Autónoma de Madrid.

Resumen

Mycobacterium chimaera es una micobacteria no-tuberculosa de crecimiento lento perteneciente al complejo *M. avium-intracellulare*. La prevalencia de las infecciones causadas por especies de este complejo está aumentando. En los últimos años, la relevancia de *M. chimaera* surge de una serie de casos de infecciones en pacientes que han sido sometidos a operaciones cardíacas, debido a la contaminación en origen de la membrana de oxigenación de equipos de circulación extracorpórea (*extracorporeal membrane oxygenator*, ECMO) LivaNova 3T HCD por *biofilms* de *M. chimaera*. Actualmente, se está estudiando el empleo de *Methylobacterium spp.* como estrategia en contra de los *biofilms* de micobacterias. En este trabajo se evaluó el desarrollo del *biofilm* de una cepa de *M. chimaera* contaminante en origen de la membrana de oxigenación de equipos de circulación extracorpórea aislada de un equipo 3T HCD y la capacidad anti-*biofilm* del extracto de *Methylobacterium sp.* CECT 7180 sobre la adherencia, la formación y como tratamiento de *biofilm* de esta cepa. Para ello, se realizaron ensayos de adherencia sobre una superficie control y una superficie tratada con el extracto, ensayos de formación del *biofilm* durante cinco días sobre ambos tipos de superficie, se caracterizó este proceso de formación de *biofilms* mediante microscopía láser confocal y el posible uso del extracto como tratamiento de *biofilms* de cinco días sometidos a diferentes tiempos de desecación (24, 48, 72, 96 o 120 h). Estos ensayos permitieron determinar que el extracto de *Methylobacterium sp.* CECT 7180 no alteró la adherencia de esta cepa, pero que el tratamiento de la superficie con este extracto fue capaz de evitar la formación del *biofilm* de esta cepa debido a la inhibición de la formación de matriz exopolimérica del *biofilm*, y que este extracto actuaría como tratamiento de *biofilms* sometidos a 96 y 120 h de desecación. Por tanto, se puede afirmar que el extracto de *Methylobacterium sp.* CECT 7180 adsorbido sobre una superficie tiene capacidad anti-*biofilm* de *M. chimaera* ECMO tanto en *biofilms* en desarrollo como sobre *biofilms* ya formados debido a su capacidad de *quorum quenching*, además de que la desecación podría favorecer este efecto en *biofilms*, al menos de *M. chimaera* ECMO.

Palabras clave: *Mycobacterium chimaera*, LivaNova 3T HCD, *biofilm*, *Methylobacterium*

Índice

Introducción	3
1. Género <i>Mycobacterium</i>	4
2. <i>Mycobacterium chimaera</i>	6
Manifestaciones clínicas.....	7
Tratamiento	7
3. <i>Biofilms</i> y micobacterias	8
4. Prevención.....	11
Material y métodos.....	12
1. Cepas bacterias, medios y condiciones de cultivo.....	12
2. Cultivo de <i>M. chimaera</i>	12
3. Extracto de <i>Methylobacterium sp. CECT 7180</i>	12
4. Estudio de la adherencia de <i>M. chimaera</i> ECMO	12
5. Estudio de la inhibición de la formación del <i>biofilm</i> de <i>M. chimaera</i> ECMO	13
6. Estudio de la resistencia a la desecación del <i>biofilm</i> de <i>M. chimaera</i> ECMO	13
7. Formación de <i>biofilm</i> de <i>M. chimaera</i> ECMO.....	13
8. Análisis estadísticos	15
Resultados y discusión	15
El extracto de <i>Methylobacterium sp. CECT 7180</i> no inhibe la adherencia de <i>M. chimaera</i> ECMO	15
Inhibición de la formación del <i>biofilm</i> de <i>M. chimaera</i> ECMO por el extracto de <i>Methylobacterium sp. CECT 7180</i>	15
Efecto del tratamiento con el extracto de <i>Methylobacterium sp. CECT 7180</i> en <i>biofilms</i> de <i>M. chimaera</i> ECMO sometidos a diferentes tiempos de desecación.....	19
Bibliografía.....	20
Anexos.....	24

2.000 pacientes de Irlanda del Norte en alerta por una infección tras una cirugía cardíaca

22 marzo 2017

Catherine Smyth Health BBC News NI

Cerca de 2.000 pacientes de Irlanda del Norte (Reino Unido) que habían sido operados de corazón han podido estar expuestos a una infección.

La Fundación de Salud y Asistencia Social de Belfast ha escrito a todos aquellos pacientes que se han sometido a una operación de corazón desde enero de 2013. En la carta se alertaba acerca del riesgo de una infección por una bacteria rara asociada al equipo médico empleado.

En total, se han descrito 28 casos en Reino Unido y 15 muertes por la infección antes del 2015. Basado en el comunicado de la Fundación de la Salud y Asistencia Social de Belfast, la BBC entendió que ningún habitante de Irlanda del Norte se vio afectado.

Sin embargo, las investigaciones en Reino Unido están buscando la relación entre *Mycobacterium chimaera* y un aparato empleado para controlar la temperatura de la sangre durante la operación, el cual es esencial en ciertos tipos de operaciones cardíacas [...]

Introducción

En junio de 2011, se ingresó en el Hospital Universitario de Zúrich a un paciente de 58 años que tres años antes había sido sometido a una reconstrucción aórtica y mitral con la implantación de un anillo de anuloplastia aórtica y mitral por una dificultad respiratoria grave. En junio de 2010, un año antes, este paciente ya había sido ingresado por presentar fiebre intermitente, pérdida de peso y dificultad respiratoria, pero se descartó la infección de las prótesis vasculares debido a la negatividad de los hemocultivos y un ecocardiograma transesofágico que mostró solo una insuficiencia moderada de las válvulas mitral y aórtica, sin que nada fuera sugestivo de endocarditis infecciosa. Además, al paciente hacía tiempo se le había diagnosticado una sarcoidosis sistémica tratada inicialmente con una dosis de prednisona que hubo que incrementar debido a la persistencia de la fatiga y edema. El ecocardiograma transesofágico de este último ingreso (en 2011) y el examen físico reveló evidencias de sepsis, sibilancias pulmonares y una infección crónica sinusal pilonidal tratada con amoxicilina-ácido clavulánico y reveló evidencias claras de una insuficiencia valvular aórtica y mitral severas. Por ello, el paciente fue remitido al servicio de cirugía cardiotorácica para reemplazar las válvulas previamente colocadas. Tras la cirugía, la terapia antibiótica consistió en vancomicina y piperacilina-tazobactam para prevenir una neumonía asociada a ventilación mecánica y

tratar empíricamente los hallazgos intraoperatorios sugestivos de endocarditis infecciosa. El examen histopatológico de las muestras del tejido adyacente a las válvulas mostró una necrosis y una inflamación con numerosos macrófagos espumosos repletos de bacilos ácido-alcohol resistentes. Los cultivos del anillo protésico mitral permitieron la identificación mediante la secuenciación del gen ARNr 16S de *Mycobacterium chimaera*. La infección diseminada por esta micobacteria se detectó también en muestras de secreción traqueal y hemocultivos. A pesar de la terapia antibiótica dirigida con claritromicina, rifabutina y etambutol, el paciente falleció a los 15 días del ingreso¹.

Dos meses después de este caso, en el mismo hospital se detectó un caso prácticamente idéntico donde el agente infeccioso aislado fue de nuevo *M. chimaera*, una cepa relacionada genéticamente con la aislada del primer caso. El único factor común entre ambos casos era que ambos pacientes habían sido sometidos a una operación cardíaca¹.

La cercanía temporal de los casos y la relación genética entre las cepas impulsó a investigar ambos casos hasta llegar al foco de infección mediante el análisis de los puntos en común entre los dos pacientes¹. Gracias a estas investigaciones, se logró detectar *M. chimaera* en la membrana de oxigenación de una unidad de circulación extracorpórea 3T HCD (LivaNova, Londres, Reino Unido) que había sido usada en ambas intervenciones. Estos

equipos médicos son necesarios para el mantenimiento de la circulación sanguínea y la temperatura corporal de los pacientes durante el *by-pass* cardiopulmonar que requieren muchas de las intervenciones cardiacas (Figura 1.B).². Solamente en Suiza, entre agosto de 2008 y mayo del 2011, 3.706 pacientes fueron sometidos a procedimientos quirúrgicos cardiacos en los cuales se emplearon equipos 3T HCD. Seis de ellos desarrollaron una infección por *M. chimaera*³.

Tras los ocho casos detectados solo en Suiza, saltaron las alarmas al conocerse nuevos casos en diferentes partes del mundo³. En el Hospital Universitario de Freiburg (Alemania) se detectó el primer caso fuera de Suiza, seguido de un caso pediátrico en Rotterdam (Países Bajos)³. Hasta la fecha, han surgido casos en países de todo el mundo, detectando al menos hasta 16 casos en Suiza^{4,5}, cinco en Alemania⁵⁻⁷, cuatro en los Países Bajos⁵, 18 en Dinamarca⁸, 25 en Reino Unido^{5,6,9}, cuatro en Irlanda⁵, tres en Francia^{5,10}, uno en Italia¹¹, uno en España¹², 17 en Estados Unidos^{6,13}, dos en Canadá¹³, 15 en Australia y Nueva Zelanda⁶ y uno en China¹⁴ (Figura 2). Sin embargo, el número de casos puede estar infraestimado debido a que no todos los casos ocurridos en los hospitales se publican en artículos científicos.

En todos los casos se había empleado el mismo equipo 3T HCD de circulación extracorpórea (LivaNova)¹⁵, aparato que tenía un 70% de cuota de mercado hasta el 2018¹⁶. El origen de la cepa es lo que se conoce como una

contaminación en origen, es decir, la contaminación se originó en fábrica donde se ensambló el equipo, lo que explica que todas las cepas de los diferentes casos estén relacionadas genéticamente^{17,18}. Por el tiempo transcurrido desde la intervención con el equipo contaminado hasta la aparición de los primeros síntomas de la infección, se cree que todavía existen casos por manifestarse¹⁶, de hecho, teniendo en cuenta solo el número de casos en Suiza, el número de operaciones a corazón abierto que tienen lugar y la población de Europa, se estima que la incidencia anual podría encontrarse entre 156 y 282 casos en Europa¹⁶.

Los equipos de circulación extracorpórea 3T HCD contienen una membrana de oxigenación, situada entre los tanques de agua que permiten el mantenimiento de la temperatura del líquido de cardioplegia y de la sangre, así como la oxigenación de ésta (Figura 1.B.). Esta membrana fue el foco de contaminación donde se encontraba *M. chimaera*. Gracias a los estudios realizados con este equipo, se observó que desde esta membrana se forman aerosoles que contienen células de *M. chimaera* y que, de esta forma, alcanzaban la sangre del paciente^{2,19} (Figura 1.B.).

1. Género *Mycobacterium*

Este género, del latín *Myco*, «hongo», y *bakterium* «bacteria»²⁰, pertenece a la familia Mycobacteriaceae, al orden Corynebacteriales, a la clase Actinobacteria, al filo Actinobacteria y al dominio Bacteria²¹. Es un género de

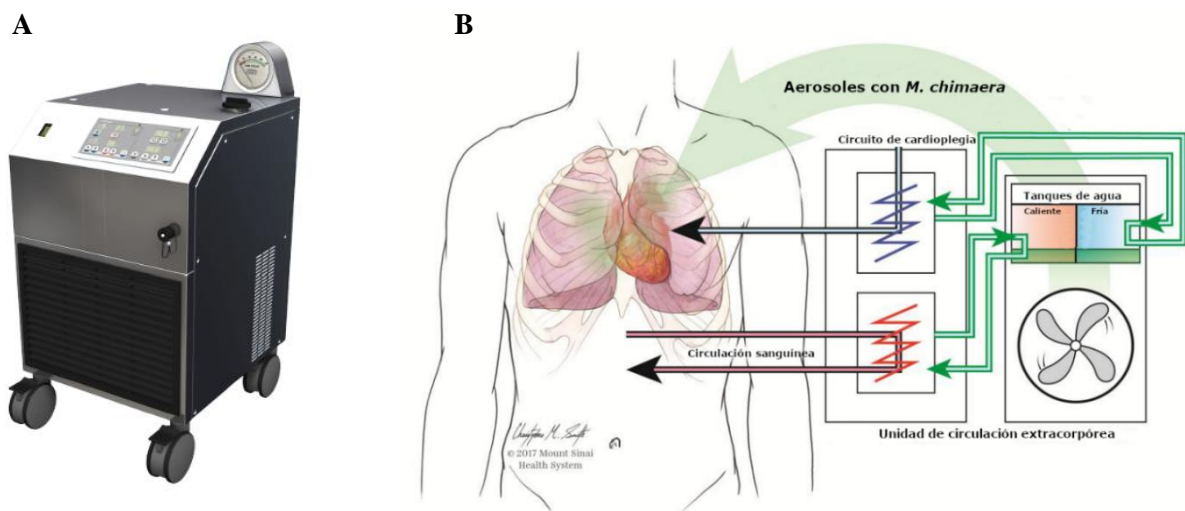


Figura 1. A. Equipo LivaNova 3T HCD. B. Funcionamiento de un equipo de circulación extracorpórea y forma de infección desde la membrana de oxigenación. Modificada de Nihn y colaboradores (2017)¹⁹.

bacterias filogenéticamente grampositivas con alto contenido C+G de entre 61-71%, con una pared rica en ácidos micólicos.

Las especies pertenecientes a este género son aerobias estrictas, pleomórficas, aunque predominantemente bacilares, sin motilidad ni flagelos (a excepción de *M. marinum*) y no-esporógenas. Su característica pared está formada por cuatro capas (de dentro de fuera): capa de peptidoglicano, capa de arabinogalactanos, capa de ácidos micólicos, y capa de lípidos y mucósidos (Figura 3). Esta composición es clave en la eficacia de los diferentes tratamientos aplicados en las enfermedades causadas por este género y la responsable de la escasa permeabilidad que, a su vez, les confiere una mayor resistencia ante ácidos, álcalis o desinfectantes²¹. A pesar de esta resistencia a diferentes compuestos bactericidas, la radiación UV sí tiene capacidad letal frente a las especies de este género. En cuanto a su crecimiento, la temperatura óptima está entorno a los 35-37°C (a excepción de *M. marinum* que crece a temperatura ambiente), se ve favorecido por la presencia de CO₂ en la estufa y ácidos grasos en el medio de cultivo²¹.

Según las manifestaciones clínicas producidas se dividen en tres grandes complejos: el complejo *Mycobacterium tuberculosis*, formado por *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* y *M. microti*; el complejo de *Mycobacterium leprae*, y el complejo de micobacterias no-tuberculosas^{21,22}. Dentro del complejo de micobacterias no-tuberculosas se incluyen más de 172 especies con diferentes

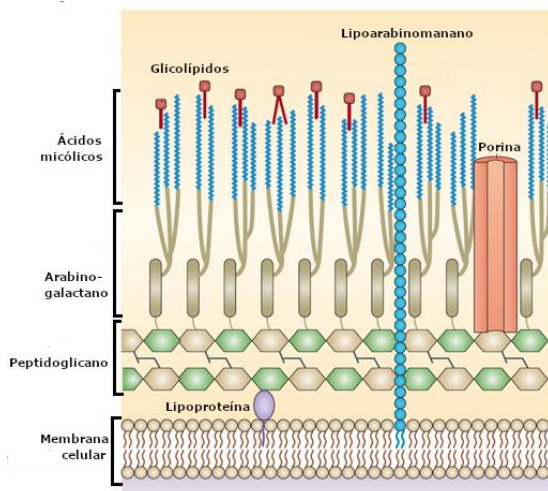


Figura 3. Composición de la pared de las micobacterias⁷³.

grados de patogenicidad, siendo, en su mayoría, patógenos oportunistas ambientales²³.

Además, las especies del género *Mycobacterium* de relevancia clínica también se pueden clasificar en función de su crecimiento en: micobacterias de crecimiento rápido y de crecimiento lento. Las primeras requieren menos de siete días para producir colonias visibles en cultivo en medio sólido y las segundas requieren más de siete días (y hasta 56 días). A su vez, dentro de las de crecimiento lento existen dos grupos según la capacidad de producir pigmentos o no: cromógenas y no-cromógenas. Las primeras producen pigmentos que les dan color y las segundas carecen de esta capacidad. Dentro de las micobacterias cromógenas, se denominan escotocromógenas a aquellas especies que sintetizan pigmentos en ausencia de luz y fotocromógenas, a aquellas que lo hacen tras haber sido expuestas previamente a la luz²³.

2. *Mycobacterium chimaera*



Figura 4. Crecimiento de *M. chimaera* en medio agar Middlebrook 7H10.

Mycobacterium chimaera es una micobacteria no-tuberculosa de crecimiento lento escotocromógena, ya que produce colonias de color amarillo-anaranjado en medio sólido sin necesidad de haber sido expuesta a luz (Figura 4). En un principio, el nombre de *M. chimaera* se usó para designar aquellas cepas que pertenecían al complejo *M. avium-intracellulare*, pero eran diferentes a *M. avium*, *M. intracellulare* o *M. scrofulaceum*. Posteriormente, se describió como nueva especie. El nombre de la especie proviene de la quimera, un animal mitológico formado por partes de tres animales, león, cabra y serpiente²⁴. El complejo *M. avium-*

intracellulare está formado por *M. chimaera* junto con otras especies como *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. colombiense*, *M. marseillense*, *M. timonense* y *M. ituriense*²⁵. Especies del complejo *M. avium-intracellulare* se han aislado de diferentes ambientes naturales como el suelo, el agua, de plantas y animales²¹⁻²³. Al igual que el resto de micobacterias de crecimiento lento, no se contagia entre humanos, por lo que el contagio es desde sus reservorios ambientales^{22,25} mediante la inhalación de aerosoles, ingestión o eventos traumáticos que comprometan barreras físicas primarias²³. Las especies del complejo *M. avium-intracellulare* predominan en países occidentales y europeos, donde está incrementando su prevalencia^{23,25}, siendo de mayor importancia en todos los pacientes inmunocomprometidos como pacientes con el virus de la inmunodeficiencia humana, con trastornos autoinmunes, inflamatorios crónicos y/o cáncer. Sin embargo, también existe un incremento de la incidencia asociado a material médico en personas inmunocompetentes. En el caso de estas últimas infecciones, cobran gran relevancia los *biofilms* que permiten la persistencia de las bacterias adheridas a materiales de uso clínico (ver en el apartado 3)²³.

Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas de las micobacterias no-tuberculosas más comunes son: fibrocavitaciones y bronquiectasia nodular acompañadas de una serie de síntomas inespecíficos respiratorios^{22,26}.

Sin embargo, en el caso de las infecciones por *M. chimaera* asociadas a los equipos 3T HCD LivaNova, la manifestación principal fue endocarditis de las válvulas prostéticas implantadas debido a la vía de entrada (Figura 5.A.). Además, se encontraron manifestaciones extracardiacas, como: osteoartritis, espondilodiscitis, infección del esternón, hepatitis colestática, nefritis y bacteremia³. A nivel histológico, en cualquiera de sus localizaciones, se pueden observar agregados de macrófagos espumosos rellenos de bacilos ácido-resistentes (Figura 5.B. y Figura 5.C.)¹.

Según los reportes médicos hasta la fecha, desde la operación cardiaca en la que se empleara la unidad 3T HCD LivaNova hasta la aparición de las manifestaciones pueden llegar a pasar desde

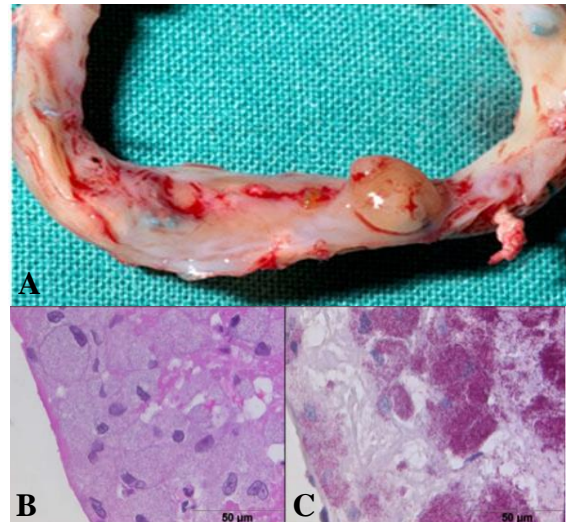


Figura 5. A. Endocarditis de anillo mitral debida a la formación de *biofilm* de *M. chimaera*. B. Agregados de macrófagos (tinción hematoxilina y eosina). C. Bacilos ácido-resistentes (tinción Ziehl-Neelsen)^{1,3}.

cinco meses hasta 38 meses, lo que hace que el diagnóstico y tratamiento se retrasen en estos pacientes⁴.

Tratamiento

El tratamiento para *M. chimaera* es largo y complejo por diversos factores. Uno de ellos es la falta de un algoritmo optimizado de identificación a nivel de especie, lo que dificulta la decisión del tratamiento a seguir entre las diferentes especies de micobacterias no-tuberculosas, ya que los síntomas no suelen ser específicos de cada una²³. Otro de los factores más importantes, es la alta resistencia a los diferentes antibióticos, incluso a aquellos que ha presentado sensibilidad *in vitro*. Esta falta de correspondencia entre la sensibilidad *in vitro* y la respuesta clínica es uno de los mayores problemas en clínica en estas infecciones²². En el caso de cepas resistentes a macrólidos, el pronóstico suele ser desfavorable ya que no hay una alternativa eficaz²².

Para el tratamiento de *M. chimaera* se emplea combinaciones de un macrólido (como claritromicina o azitromicina), con etambutol, rifampicina y/o un aminoglucósido vía intravenosa^{22,25,26}. La duración del tratamiento recomendada es de seis meses consecutivos después de la negativización de los cultivo de esputo^{22,26}. En el caso de infección por *M. chimaera* debido a una operación cardiaca en la que se hubiera empleado la unidad 3T HCD LivaNova, el tratamiento intravenoso que se suele emplear es claritromicina, rifabutina

(usada principalmente en las especies del complejo *M. avium-intracellulare*) y etambutol³. El tratamiento total, desde el ingreso del paciente hasta su curación, dura al menos unos dos años y pasa por más fármacos debido a la dificultad de identificación de la especie y de la diseminación de la infección.

3. *Biofilms* y micobacterias

Un *biofilm* (del griego *bíos*, «vida», y del inglés *film* «película/lámina») es un conglomerado de células microbianas de al menos una especie que se asocia o no a una superficie o interfase y están embebidas en una matriz de sustancias extracelulares producidas por ellas mismas²⁷, donde imperan numerosas y complejas interacciones sociomicrobiológicas²⁸.

La matriz es un gel de diferentes polímeros conocidos como sustancias exopoliméricas (*extracellular polymeric substances*, EPS) secretados en su mayoría por las bacterias²⁹. Su componente principal es el agua, suponiendo hasta el 97% de la matriz³⁰. Las sustancias exopoliméricas están formadas principalmente por polisacáridos, los cuales pueden ser homopolímeros y heteropolímeros lineales o ramificados con carga o sin carga y que pueden

contener sustituyentes orgánicos o inorgánicos; proteínas, tanto estructurales como enzimas; ADN extracelular procedente de la lisis bacteriana y lípidos, todas ellos sintetizados y excretados por las bacterias, y otras moléculas presentes en el ambiente²⁹.

Debido a la complejidad de la matriz, su producción por parte de las bacterias es costosa energéticamente; sin embargo, este coste energético puede estar justificado evolutivamente debido a todas las funciones que tiene (Tabla 1)^{29,30}.

Las bacterias están embebidas en la matriz estableciendo microconsorcios²⁹ heterogéneos debido a las diferentes condiciones locales que se generan dentro del *biofilm*³⁰. Por las características de la matriz, en el *biofilm* se forman diferentes gradientes responsables de la formación de comunidades microbianas con diferentes metabolismos (Figura 6)³⁰.

En los ambientes copiotrópicos donde abundan los nutrientes, el gradiente que impera es el del oxígeno, provocando que los microorganismos aerobios crezcan en la superficie del *biofilm*, por debajo de estos los fermentadores y en la parte

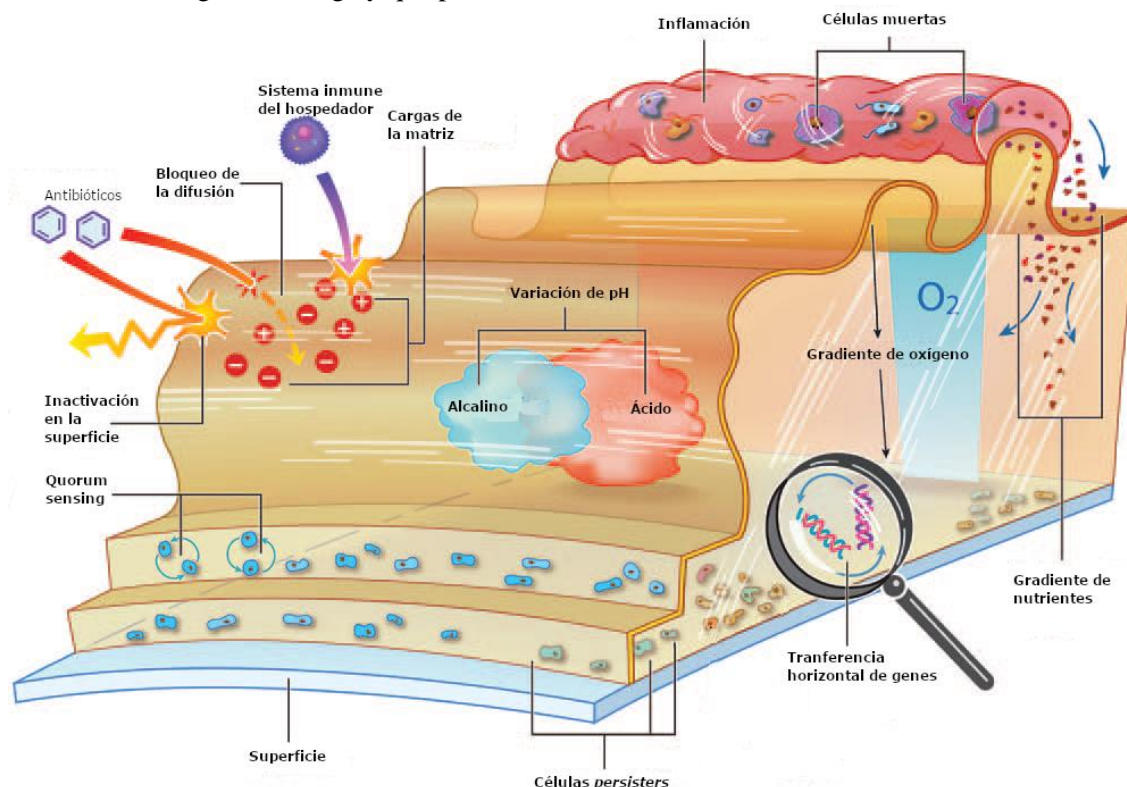


Figura 6 . Ventajas de supervivencia para las bacterias que forman un *biofilm* como la inactivación de antibióticos/antisépticos, protección frente al sistema inmune del hospedador, bloqueo de la difusión, *quorum sensing*, intercambio genético, gradientes de pH, oxígeno y nutrientes y células *persisters*³⁰.

más profunda los anaerobios (Figura 6)³⁰. Sin embargo, en el caso de ambientes oligotróficos, donde escasean los nutrientes, el gradiente de éstos es el más importante, haciendo que en la parte más externa del *biofilm* crezcan las bacterias metabólicamente activas, pero en el interior haya bacterias dormantes, *persisters* y células muertas (Figura 6)³⁰.

Independientemente de cómo sea el ambiente, también se establecen otros gradientes, como el

de pH o el de *quorum sensing*, entre otros (Figura 6)³⁰. El primero es debido a los ácidos producidos por las bacterias fermentadoras. El *quorum sensing* es un mecanismo de comunicación intercelular que permite a las bacterias detectar la densidad de células de su especie y regular una expresión genética que da lugar a la adquisición de nuevos fenotipos de forma coordinada como los *biofilms*³⁰⁻³².

Tabla 1. Funciones de la matriz de un *biofilm*.^{29,30}.

Función	Componente implicado	Relevancia en el <i>biofilm</i>
Adhesión	Polisacáridos, proteínas y ADN	Colonización de diferentes superficies y adhesión irreversible del <i>biofilm</i> a éstas.
Agregación	Polisacáridos, proteínas y ADN	Unión entre células, inmovilización temporal de las comunidades y desarrollo de altas densidades de células.
Cohesión	Polisacáridos, proteínas y ADN	Formación de la red de polisacáridos de la matriz que estabiliza el <i>biofilm</i> , determina la arquitectura de éste y permite la comunicación entre células.
Retención de agua	Polisacáridos hidrofílicos y posiblemente proteínas	Mantenimiento del ambiente altamente hidratado dando resistencia a la desecación.
Barrera protectora	Polisacáridos y proteínas	Resistencia frente las defensas del hospedador, antimicrobianos, radiación UV, etc.
Absorción de compuestos orgánicos	Polisacáridos hidrofóbicos o cargados y proteínas	Acumulación de nutrientes del ambiente y absorción de xenobióticos (detoxificación del ambiente).
Adsorción de iones inorgánicos	Polisacáridos cargados y proteínas	Formación del gel de polisacáridos, intercambio iónico, formación de minerales y acumulación de iones metálicos tóxicos (detoxificación del ambiente).
Actividad enzimática	Proteínas	Digestión exógena de macromoléculas para la adquisición de nutrientes y la rotura de los EPS para la liberación de las células.
Fuente de nutrientes	Toda la matriz	Fuente de compuestos con carbono, nitrógeno y fosfato que pueden usar las bacterias.
Intercambio de información genética	ADN	Facilita el intercambio de genes entre células.
Donadores/Aceptores de electrones	Proteínas y posiblemente sustancias húmicas	Actividad redox.
Exportación de componentes celulares	Vesículas membranosas que contengan ADN, enzimas, lipopolisacáridos y fosfolípidos	Liberación de material celular como resultado del <i>turn-over</i> metabólico.
Almacén del exceso de energía	Polisacáridos	Almacén del exceso de carbono.
Retención de enzimas	Polisacáridos y proteínas	Acumulación, retención y estabilización de enzimas por interacción con polisacáridos.

Por último, el tercer componente son las relaciones sociomicrobiológicas que se establecen entre las bacterias que forman un *biofilm*. Un comportamiento social es aquel que tiene consecuencias en el *fitness* de una especie de los individuos que tienen un comportamiento determinado (actores) y de los individuos que se benefician del comportamiento (receptores). Los comportamientos sociales se pueden dividir en cuatro tipos: mutualismo en el caso de que un comportamiento del actor beneficie tanto a él como al receptor, egoísmo si un comportamiento del actor lo beneficia pero perjudica al receptor, altruismo si un comportamiento del actor lo perjudica pero beneficia al receptor y antagonismo en el caso de que un comportamiento del actor perjudica tanto a él como al receptor³¹.

Teóricamente, la formación de *biofilms* consta de al menos tres fases: adhesión, maduración y dispersión (Figura 7)^{33,34}. En la primera etapa tiene lugar la transición del estado planctónico a un estado sésil o adherido a una superficie, gracias a una adhesión inicial y reversible, seguida inmediatamente de una adhesión irreversible. En estas etapas, dependientes tanto de las características de la superficie, como de las células³⁵, son esenciales genes que regulan o codifican para proteínas de adhesión, apéndices filamentosos como pili o flagelos, y EPS³³. En la etapa de maduración, tiene lugar la formación del *biofilm* en sentido estricto, y se caracteriza por la proliferación de las bacterias adheridas y la síntesis de EPS que le permitirá crecer formando cuerpos tridimensionales de bacterias con distintas

funciones y estados metabólicos³³. Finalmente, la última etapa está caracterizada por la liberación de bacterias que se liberarán del *biofilm* e iniciarán el ciclo de nuevo, colonizando un nuevo nicho³³. Esta dispersión puede ser: pasiva, cuando es causada tanto por perturbaciones externas, como por ejemplo aumento del flujo de agua, o activas, cuando es provocada por fuerzas internas³³, como por la degradación enzimática de la matriz^{29,30,33}.

Los *biofilms* de micobacterias tienen algunas particularidades³⁷. La matriz, se caracteriza por presentar glucopeptolípidos, ácidos micólicos de la pared y la coenzima F420³⁷. La regulación de las diferentes etapas de la formación de sus *biofilms* están reguladas por los nutrientes, iones (Ca^{2+} , Mg^{2+} y Zn^{2+}) y las fuentes de carbono presentes (glucosa y peptonas)^{37,38}.

El primer caso de infección causada por un *biofilm* de una micobacteria fue descrito por Falkinham III y colaboradores³⁹, donde se relacionó directamente la infección pulmonar provocada por *M. avium* en una paciente de 41 años con la existencia de un *biofilm* de esta micobacteria en la ducha de su casa³⁹. Desde entonces, se ha descrito la capacidad de muchas especies de micobacterias de formar *biofilms* tanto en el ambiente natural como en patologías clínicas, por ejemplo, en infecciones pulmonares producidas por *M. avium*⁴⁰ y *Mycobacterium abscessus*⁴¹, en válvulas prostéticas y en furunculosis por *Mycobacterium fortuitum*⁴², en dacriocistitis por *Mycobacterium chelonae*⁴³ y en la úlcera de Buruli producidas por *M. ulcerans*⁴⁴.

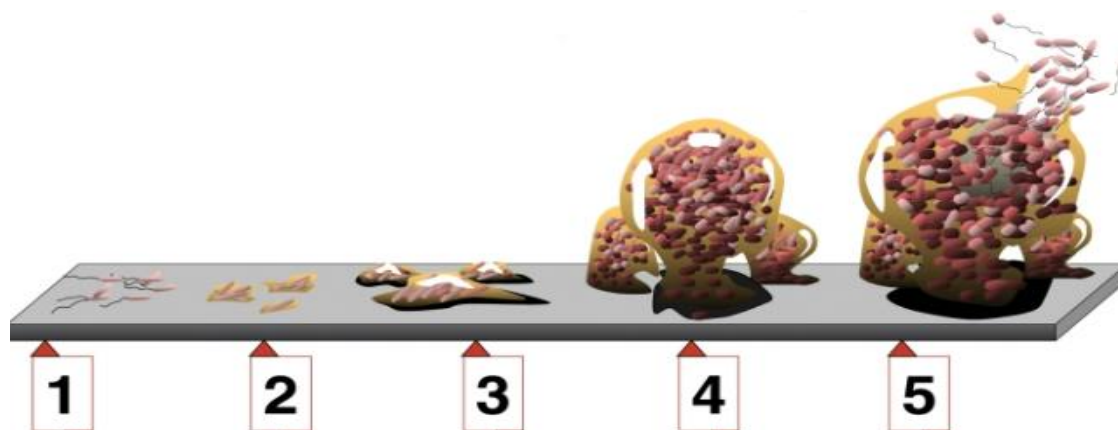


Figura 7. Etapas de un *biofilm*. 1. Adherencia reversible. 2. Adherencia irreversible. 3. Maduración temprana. 4. Maduración tardía. 5. Dispersión. ³⁶.

Además, la formación de *biofilms* sería la responsable de la resistencia a los antimicobacterianos que llevan al fracaso de los tratamientos terapéuticos y la desinfección de los diferentes equipos y materiales médicos³⁷.

4. Prevención

Uno de los últimos casos de infecciones por micobacterias no-tuberculosas asociadas a *biofilms* es el asociado a los equipos de circulación extracorpórea 3T HCD LivaNova. La fuente de infección en estos casos estaba asociada directamente al uso de los mismos, por lo que la primera medida de prevención de nuevas infecciones se centró en cesar por completo el uso de estos aparatos y, en segundo lugar, intentar descontaminarlos^{45,46}.

Tras la alarma que saltó debido al número de casos de infecciones de *M. chimaera* asociados a los equipos 3T HCD LivaNova, el fabricante cambió las indicaciones de desinfección de los equipos^{46,47}. En estas nuevas indicaciones se disminuyó el tiempo entre los cambios de agua del circuito (pasando de ser cada dos semanas, a ser cada semana), el tiempo entre cada desinfección con peróxido de hidrógeno (pasando de ser cada cinco días, a ser diariamente) y las condiciones de la desinfección total (pasando de ser cada tres meses, a ser cada dos semanas y de usar hipoclorito sódico a usar ácido peracético y peróxido de hidrógeno). Sin embargo, estos cambios fueron insuficientes y aparecieron nuevos casos de *M. chimaera* asociados a los equipos. Por ello, se cambiaron de nuevo las indicaciones y se consiguió eliminar *M. chimaera* de los aerosoles producidos (aunque no del agua del equipo) cambiando los módulos y los tubos diariamente, añadiendo peróxido de oxígeno diariamente, y desinfectando cada dos semanas con ácidos peracético y peróxido de hidrógeno^{46,48}. Sin embargo, la desinfección sigue siendo complicada debido a la resistencia característica de los *biofilms* por lo que, para operar de manera más segura, el fabricante recomienda situar los equipos fuera de la sala de operación abriendo un hueco en la pared para el paso de los tubos del equipo (evitando así la alteración de la ventilación de la habitación por abrir la

puerta para el paso de éstos) o, si esto no fuera posible, colocar el equipo en un contenedor de acero inoxidable con un conducto en la parte posterior que lo conecta con el sistema de ventilación de la sala de operaciones de manera que la presión negativa atrae los aerosoles que se generan. Cualquiera de las dos alternativas evitaría que, si la desinfección ha fallado, los aerosoles generados puedan llegar al paciente⁴⁶⁻⁴⁸.

Además de estas precauciones, el fabricante hizo cambios en la fabricación de nuevos equipos del mismo tipo. Se añadieron a éstos un indicador de vacío y un tubo unido a un generador de vacío, que debe ser cambiado cada tres días, evitando así la dispersión de los aerosoles^{46,47}.

A pesar de estas nuevas medidas, no se descartan nuevos casos debido a la latencia desde el momento de infección hasta las manifestaciones clínicas y la resistencia de los *biofilms* a los desinfectantes. Por lo que, en definitiva, la mejor prevención es no usar el aparato⁴⁶.

Por todo ello, es necesario el desarrollo de nuevas estrategias que permitan tanto evitar la infección como tratar eficazmente este tipo de infecciones³⁷.

Las estrategias para hacer frente a los *biofilms* pueden actuar a diferentes niveles: evitando la adherencia de las bacterias a la superficie, evitando la formación del *biofilm* o penetrando en el *biofilm* y matando a las bacterias⁴⁹. Una nueva estrategia anti-*biofilm* micobacterianos estudiada actualmente es el empleo de *Methylobacterium spp*³⁷.

El género *Methylobacterium* es un grupo de bacterias gramnegativas pertenecientes al filo Proteobacteria y la clase α -Proteobacteria, descrito por T. E. Patt y colaboradores. (1978)⁵⁰. Es un género estrictamente aerobio, metilotrófico facultativo y de crecimiento lento. Las colonias formadas por las especies de este género suelen ser pequeñas y de color rosa cuya temperatura óptima de crecimiento es 25-30°C, pero no es capaz de crecer a más de 42°C⁵¹. Normalmente se encuentra en los sistemas de distribución de agua domésticos

y hospitalarios^{37,52}. Algunas de las especies pertenecientes al género pueden causar infecciones sistémicas en personas inmunocomprometidas debido a la contaminación de material hospitalario pero no se ha reportado ningún caso en personas inmunocompetentes⁵¹. Actualmente las especies de este género están cobrando importancia ya que parecen impedir el desarrollo normal de los *biofilm* de micobacterias no-tuberculosas independientemente de su viabilidad, por lo que se elimina la posibilidad de contaminación.⁵³.

Así, el objetivo de este trabajo fue evaluar el desarrollo del *biofilm* de una cepa de *M. chimaera* contaminante en origen de la membrana de oxigenadores de circulación extracorpórea aislada de un equipo 3T HCD y la capacidad anti-*biofilm* del extracto de *Methylobacterium sp* CECT 7180 sobre la adherencia, la formación y como tratamiento de *biofilm* de esta cepa.

Material y métodos

1. Cepas bacterias, medios y condiciones de cultivo

El trabajo se realizó con una cepa *Mycobacterium chimaera* ECMO, aislada el 27 de junio de 2018 en el Hospital Rey Juan Carlos I de Móstoles (Comunidad de Madrid), de un equipo 3T HCD (LivaNova, Londres, Reino Unido).

Se emplearon los medios agar Middlebrook 7H10 (BD, New Jersey, Estados Unidos) y caldo Middlebrook 7H9 (BD, New Jersey, Estados Unidos), preparados según las indicaciones de la casa comercial.

Las condiciones de crecimiento fueron 37°C y 5% de CO₂, independientemente del medio empleado y el experimento.

2. Cultivo de *M. chimaera*

La cepa se mantuvo por pase sucesivos en placas de agar Middlebrook 7H10 a 37°C y 5% de CO₂ con al menos cinco días de crecimiento.

Previamente a cada experimento, se realizó una suspensión 2 McF en suero salino 0.9% de una placa de agar Middlebrook 7H10 de

M. chimaera. De esta suspensión se inoculó 0,5 ml en una botella de Bact/Alert MP (Biomérieux, Îlle de France, Francia) (Figura 8) suplementada con 0,5 ml de suplemento antibiótico de acuerdo con las instrucciones de la casa comercial y se dejó incubar a 37°C durante 120 h.



Figura 8. Botella Bact/Alert MP empleada en el cultivo de *M. chimaera* ECMO.

3. Extracto de *Methylobacterium sp.* CECT 7180

Para la preparación del extracto de *Methylobacterium sp.* CECT 7180 se realizó una suspensión 4 McF de esta cepa en tampón buffer salino (*phosphate buffer saline*, PBS) (Biomérieux, Îlle de France, Francia). La suspensión se sonicó tres veces a 100 Amp durante 30 s rodeada de hielo, dejando 5 min entre cada sonicación. El sonicado resultante se centrifugó a 5.000g a 4°C durante 10 min. El sobrenadante fue alicuotado y congelado a -25°C para ser empleado en los experimentos.

4. Estudio de la adherencia de *M. chimaera* ECMO

El contenido líquido de las botellas Bact/Alert MP de 120 h realizado se centrifugó a 3.500 rpm durante 10 minutos y se lavó tres veces con PBS a fin de obtener un pellet de micobacterias limpio de medio de cultivo. Con el pellet obtenido de micobacteria, se realizó una suspensión 0.5 McF.

Paralelamente, se trataron cuatro pocillos de una placa de seis pocillos (Fisher Scientific, Pensilvania, Estados Unidos): dos con 1 ml

de PBS (superficie control) y otros dos con 1 ml de extracto de *Methylobacterium sp.* CECT 7180 durante 15 min a temperatura ambiente. Tras la incubación, se retiró el sobrenadante y se lavó cada pocillo con 3 ml de PBS.

De la suspensión 0.5 McF, se depositó 1 ml en cada uno de los pocillos tratados y se incubó a 37°C y 5% de CO₂ durante 90 min. Tras la incubación, se retiró el sobrenadante y se lavó una vez con PBS. A continuación, se añadieron 3 ml de PBS en cada pocillo y se sonicó a 50-60 Hz durante 5 min a temperatura ambiente empleando el sonicador FB 15053 (Thermo Fisher Scientific, Pensilvania, Estados Unidos) y se cuantificó la concentración de bacteria por área mediante el método *drop plate* descrito previamente⁵⁴ en placas de agar Middlebrook 7H10 que se dejaron incubar durante al menos 10 días (Figura 9).



Figura 9. Cuantificación por el método *drop plate*.

5. Estudio de la inhibición de la formación del *biofilm* de *M. chimaera* ECMO

Se realizó el protocolo de adherencia descrito previamente hasta terminar la incubación de 90 min. Tras ésta, se retiró el



Figura 10. *Biofilm* de *M. chimaera* formado tras 120 h de incubación a 37°C y 5% de CO₂.

sobrenadante, se lavó una vez con PBS, se añadieron 5 ml de medio Middlebrook 7H9 y se incubó a 37°C y 5% de CO₂ durante 120 h.

Transcurrido la incubación, se retiró el medio y cada pocillo se lavó una vez con PBS. A continuación, se rasparon los *biofilms* formados en el fondo de cada pocillo (Figura 10) con depresores de madera estériles y se depositaron en tubos Falcon (Falcon, Corning, Nueva York, Estados Unidos) de 50 ml de fondo cónico sin faldón con 10 ml (control) o 5 ml (tratado) de PBS. Los depresores linguales se sonicaron en los Falcon durante 5 min a temperatura ambiente y se cuantificó la concentración de bacteria por área mediante el método *drop plate* descrito previamente⁵⁴ en placas de agar Middlebrook 7H10 que se dejaron incubar durante al menos 10 días (Figura 9).

6. Estudio de la resistencia a la desecación del *biofilm* de *M. chimaera* ECMO

Siguiendo el protocolo anteriormente descrito en superficie sin ningún tratamiento, se crearon los *biofilm* de *M. chimaera* de 120 h (Figura 10) en cuatro pocillos de una placa de seis pocillos con el fondo sin ningún tratamiento.

Transcurrida la incubación, se descartó el medio, se lavó una vez con PBS y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24, 48, 72, 96 y 120 h. Tras cada tiempo de desecación, se trataron dos pocillos con PBS y otros dos con el extracto de *Methylobacterium sp.* CECT 7180 a temperatura ambiente durante 15 min. Tras esta incubación, se retiró el sobrenadante y se lavó cada pocillo una vez con PBS. A continuación, se rasparon los *biofilms* con depresores de madera estériles y continuó con el protocolo descrito anteriormente.

7. Formación de *biofilm* de *M. chimaera* ECMO

Para el estudio de la formación y su inhibición por el extracto de *Methylobacterium sp.* a nivel microscópico de un *biofilm* de *M. chimaera* ECMO se usó un protocolo modificado al descrito por Muñoz-Egea y colaboradores⁵⁵. Para ello, el

contenido líquido de las botellas Bact/Alert MP de 120 h realizado se centrifugó a 3.500 rpm durante 10 min y se lavó tres veces con PBS. Con el pellet de células obtenido, se realizó una suspensión 0.5 McF.

Paralelamente se trataron dos pocillos de una placa de ocho pocillos (Ibidi GmbH, Martinsried, Alemania): con 300 µl de PBS (superficie control) y con 300 µl de extracto de *Methylobacterium sp.* CECT 7180 (superficie tratada) durante 15 min, se retiró el sobrenadante y se lavó con 300 µl de PBS.

De la suspensión 0.5 McF, se depositaron 300 µl en cada uno de los pocillos tratados y se incubó a 37°C y 5% de CO₂ durante 30 min. Tras la incubación, se retiró el sobrenadante y se lavó una vez con PBS.

A continuación, se añadieron 300 µl de medio Middelbrook 7H9 en cada pocillo y se incubó en estufa con agitación a 80 rpm a 37°C durante 24, 48, 72, 96 o 120 h logrando la formación de *biofilms* de diferentes

edades y se lavó cada pocillo una vez con 300 µl de PBS.

Para el estudio de las características de los *biofilms* formados se tiñó una fila de pocillos de cada experimento con 25 µl de LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit for microscopy (Thermo Fisher Scientific, Pensilvania, Estados Unidos) y la otra fila con 25 µl de Nile Red (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO): la primera se empleó para medir la tinción LIVE/DEAD BacLight (Figura 11. A. y B.), mientras que la segunda se empleó para la tinción Nile Red (Figura 11. C.) y la autofluorescencia (Figura 11. D.).

La placa teñida se fotografió usando microscopía confocal laser de barrido Leica DM IRB (Leica, Wetzlar, Alemania). Se tomaron 10 alturas (espesores), una serie tomando una sección cada 0.17 µm, y 10 fotos de cada pocillo mediante microscopía confocal. El análisis de las fotografías se

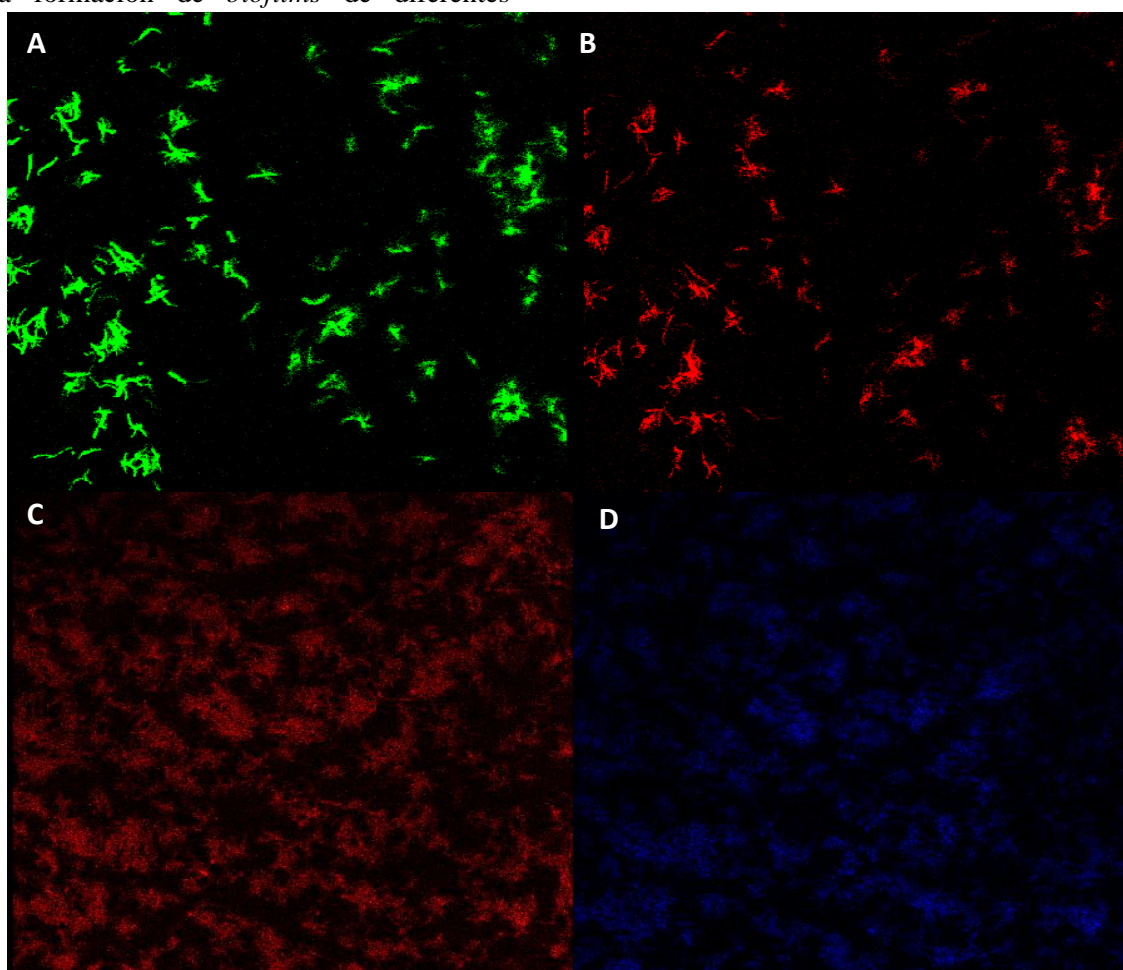


Figura 11. A. Micobacterias vivas (tinción Live/Dead BacLight). B. Micobacterias muertas (Live/Dead BacLight). C. Superficie cubierta (tinción Red Nile). D. Autofluorescencia.

llevó a cabo mediante el *software* ImageJ (Instituto Nacional de Salud, Bethesda, MD, USA). A través del análisis, se calculó: la viabilidad (medida como porcentaje de células vivas respecto células totales determinadas gracias a la tinción Live/Dead BacLight), la superficie cubierta (tinción Nile Red), y la autofluorescencia relativa (expresada como tanto por uno la autofluorescencia respecto la superficie cubierta), además de una reconstrucción tridimensional de un *biofilm* característico de los *biofilms* a cada tiempo/condición.

8. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos de los resultados se realizaron utilizando *Stata Statistical Software: Release 11* (StataCorp 2009). Se aplicó el test no-paramétrico de Wilcoxon unilateral para la comparación de dos grupos de datos y el test no-paramétrico de Kruskal-Wallis para la comparación de más de dos grupos de datos. Se consideró significativo un nivel de significación estadística de p -valor < 0,05. Todos los datos se citan y representan como mediana y rango intercuartílico.

Resultados y discusión

El extracto de *Methylobacterium sp.* CECT 7180 no inhibe la adherencia de *M. chimaera* ECMO

No se detectaron diferencias significativas entre la adherencia sobre una superficie control y sobre la superficie tratada con el extracto de *Methylobacterim sp.* CECT

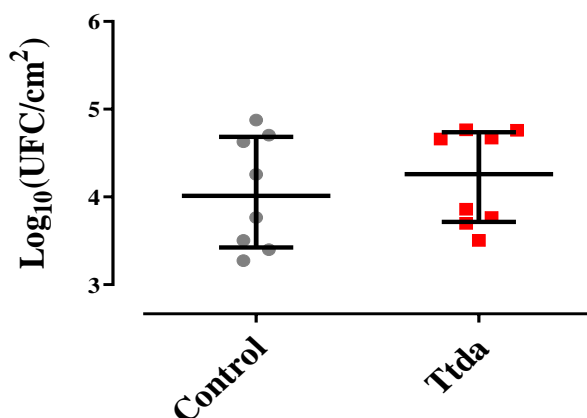


Figura 12. Unidades formadoras de colonia por área (UFC/cm²) de *M. chimaera* ECMO adheridas a una superficie control (gris) y una superficie tratada (Ttda) con extracto de *Methylobacterium sp.* CECT 7180 (rojo). Se muestra mediana y rango intercuartílico.

7180. ($z = -0.210$, p -valor = 0.8336) (Figura 12). Así, de acuerdo a nuestros resultados, el extracto de *Methylobacterium sp.* CECT 7180 no ejercería un efecto anti-adherente contra *M. chimaera* ECMO.

En contraste con esto, el extracto de *Methylobacterim sp.* CECT 7180 sí tuvo capacidad anti-adherente durante la formación del *biofilm* de *M. avium*⁵², así como otras moléculas: el péptido de catelicidina LL37 humano sobre *biofilms* de *Staphylococcus epidermidis*⁵⁶, la citopina sobre *biofilms* de estafilococos⁵⁷ y la melimina sobre *biofilms* de estafilococos y *Pseudomonas aeruginosa*⁵⁸.

Inhibición de la formación del *biofilm* de *M. chimaera* ECMO por el extracto de *Methylobacterium sp.* CECT 7180

El tratamiento de la superficie con el extracto de *Methylobacterium sp.* CECT 7180 resultó en la inhibición de la formación del *biofilm*. Ésta se pudo observar tanto macroscópicamente (Figura 13.A.) como por el recuento de unidades formadoras de colonia por área del *biofilm* formado sobre la superficie control, $\text{Log}_{10}(\text{UFC}/\text{cm}^2) = 6.836$, y del formado sobre la superficie tratada con el extracto de *Methylobacterim sp.* CECT 7180, $\text{Log}_{10}(\text{UFC}/\text{cm}^2) = 4.357$, (Figura 13.B.) ($z = 3.361$, p -valor = 0.0008).

Esta actividad anti-*biofilm* del extracto de *Methylobacterium sp.* CECT 7180 ha sido descrita también en otras micobacterias no-tuberculosas de crecimiento rápido como *M. fortuitum*, *M. chelonae* y *M. abscessus*^{53,59}. *Methylobacterium sp.* CECT 7180 no es el único extracto bacteriano cuya actividad anti-*biofilm* ha sido estudiada, extractos de *Delftia tsuruhatensis* también han mostrado esta actividad sobre *biofilms* de *P. aeruginosa*⁶⁰.

Además, existen estudios que reportan una actividad similar de otros tipos de moléculas de diversa naturaleza y origen: el ciprofloxacino inhibe la formación de *biofilms* de micobacterias de crecimiento rápido⁶¹, el cinamaldeído y la D-angeloxima inhibe la formación del *biofilm* de *Staphylococcus epidermidis*^{62,63}, el aspartato y péptidos derivados de la catelicidina inhibe la formación del *biofilm*

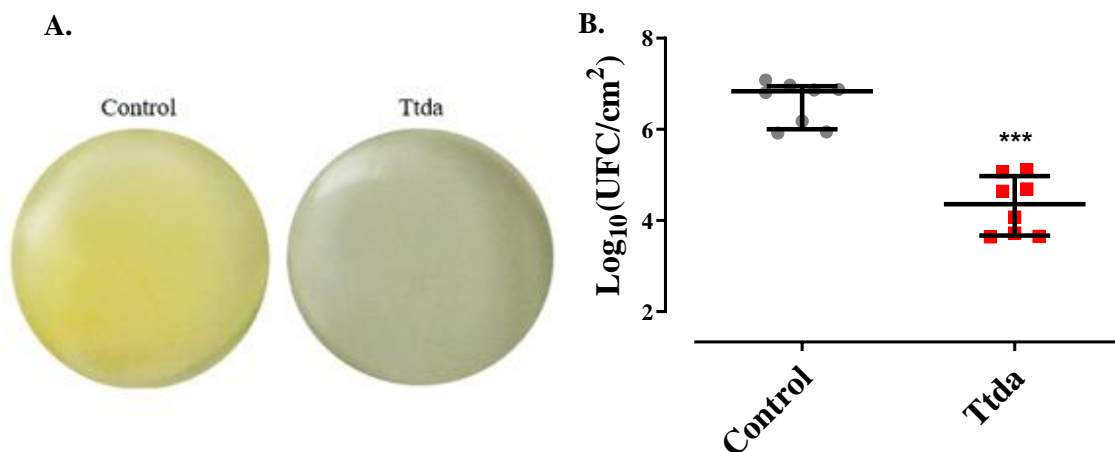


Figura 13. A. *Biofilm* de cinco días *M. chimaera* ECMO formado sobre una superficie control (izquierda) y una superficie tratada (derecha). **B.** Unidades formadoras de colonias en un *biofilm* de cinco días formado sobre una superficie control (gris) y una superficie tratada (rojo). Cada punto muestra una réplica y las barras representan la mediana y el rango intercuartílico. ***: p-valor < 0.001 para el test de Wilcoxon entre la superficie control y la tratada.

de *S. aureus*^{64,65} y el meloxicam y la partenolida inhiben la formación del *biofilm* de *P. aeruginosa*^{66,67}.

Posteriormente, en este trabajo se realizó la caracterización microscópica confocal del proceso de formación de un *biofilm* a lo largo de cinco días, tanto en la superficie control como en la superficie tratada (p-valores para el test de Wilcoxon indicados en **Anexos: Tabla 2**). Las reconstrucciones de los *biofilms* generados se muestran en la **Figura 14**.

En el caso de la formación sobre una superficie control, se determinó que: a las 48 h hubo un descenso de la viabilidad (p-valor < 0.0001), la cual se recuperó a las 72h (p-valor = 0.0057) sin mostrar cambios a las 96 h (p-valor = 0.3219) y finalmente descendió de nuevo a las 120 h (p-valor = 0.0101) (**Figura 15.A**). La altura aumentó significativamente a las 48 h (p-valor = 0.0078), se mantuvo a las 72 h (p-valor = 0.3910), aumentó de nuevo a las 96 h (p-valor = 0.005) y no volvió a mostrar cambios a las 120 h (p-valor = 0.0771) (**Figura 15.B**). En el caso de la superficie cubierta no hubo diferencias significativas a lo largo del tiempo (p-valor del test de Krustal-Wallis = 0.3669) (**Figura 15.C**). Por último, la autofluorescencia relativa se mantuvo sin diferencias significativas hasta las 48 h (p-valor = 0.6789) pero en los tiempos posteriores aumentó linealmente hasta

alcanzar un máximo a las 120 h (p-valores < 0.0001) (**Figura 15.D**).

El crecimiento en altura descrito en este trabajo para el *biofilm* de *M. chimaera* ECMO es similar al de *Mycobacterium peregrinum*⁵² y la ausencia de crecimiento en superficie se ha descrito también en *biofilms* de *Mycobacterium megeritense*⁵². Por el contrario a este tipo de crecimiento, en el *biofilm* de *M. abscessus* ocurre en superficie pero a penas en altura⁵². Sin embargo, el cambio de la viabilidad celular no muestra parecidos respecto a los descritos en especies de micobacterias no-tuberculosas de crecimiento rápido⁵². Por otro lado, en el caso de la formación del *biofilm* sobre una superficie tratada con el extracto de *Methylobacterium sp.* CECT 7180: hubo un descenso significativo de la viabilidad a las 48 h (p-valor = 0.0026), la cual se mantuvo durante las 48, 72, y 96 h (p-valor = 0.3215 para el test de Krustal Wallis) y finalmente descendió drásticamente a las 120 h (p-valor = 0.0001) (**Figura 15.A**). En cuanto a la altura, se mantuvo a lo largo del tiempo (p-valor = 0.9611) hasta las 120 h donde descendió significativamente (p-valor = 0.0223) (**Figura 15.B**). Sin embargo, la superficie cubierta aumentó significativamente a las 48 h (p-valor = 0.0163), pero se mantuvo sin diferencias en el resto de tiempos (p-valor = 0.9611 para el test de Krustal Wallis) (**Figura 15.C**). Por último, la autofluorescencia aumentó significativamente a las 48 h (p-valor =

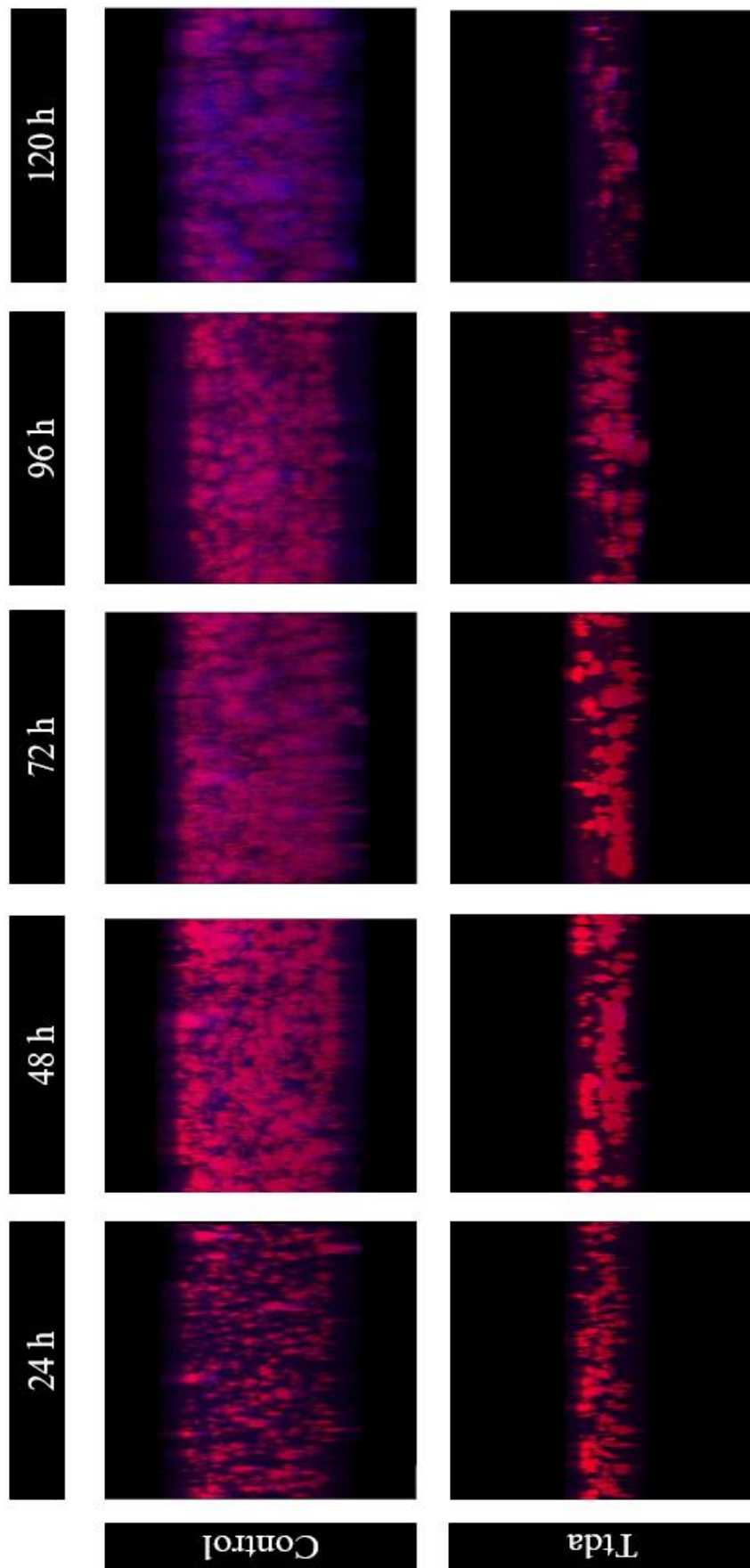


Figura 14. Reconstrucciones tridimensionales de los *biofilms* de diferentes edades (24, 48, 72, 96 y 120 h) de *M. chimaera* ECMO formados sobre una superficie control (control) o una tratada con el extracto de *Methylobacterium* sp. CECT 7180 (Ttda). En rojo tinción Red Nile y en azul autofluorescencia.

0.0004), se mantuvo a las 72 h (p-valor = 0.2871), pero aumentó de nuevo en a las 96 h (p-valor = 0.0078) y se mantuvo posteriormente a las 120 h (p-valor < 0.0001) (Figura 15.D).

Entre ambos experimentos se detectaron las siguientes diferencias (p-valores para el test de Wilcoxon indicados en Anexos: Tabla 3): la viabilidad a las 48 h del *biofilm* formado sobre la superficie control fue menor que el formado en la superficie tratada (p-valor = 0.0005), y a las 120 h la viabilidad del formado en la superficie control fue mayor que la del formado en la tratada (p-valor = 0.0009) (Figura 15.A.). Tanto la altura (Figura 15.B.) como la superficie cubierta (Figura 15.C) del *biofilm* formado sobre la superficie control fueron mayores que los del *biofilm* formado en una superficie tratada (p-valores < 0.0008), excepto la superficie a las 48 h donde no se vieron diferencias significativas entre ambos *biofilms* (p-valor = 0.3953). En la autofluorescencia no hubo diferencias significativas en las 24 h y 48 h (p-valor > 0.05) pero sí se observó una disminución en el formado en una superficie

tratada respecto al formado en el control en el resto de los tiempos (p-valor < 0.0001) (Figura 15.D.).

De los cuatro parámetros analizados, el menos afectado por el tratamiento de *Methylobacterium sp.* CECT 7180 es la viabilidad, lo que indica que el extracto bacteriano empleado no es bactericida, de forma análoga a la D-angeloxima sobre el *biofilm* de *S. epidermidis*⁶⁸.

Los otros tres parámetros (altura, superficie y autofluorescencia) se ven reducidos en el *biofilm* formado en una superficie tratada respecto a los descritos en el *biofilm* formado sobre la superficie control. Debido a que la autofluorescencia es causada por la presencia de la coenzima F420 tanto en la pared bacteriana como en la matriz³⁷, y teniendo en cuenta que los resultados de este trabajo indican que el extracto de *Methylobacterium sp.* CECT 7180 adsorbido sobre una superficie no es bactericida, el descenso de la autofluorescencia entre el *biofilm* formado sobre la superficie control y la superficie tratada se debe a una disminución de la

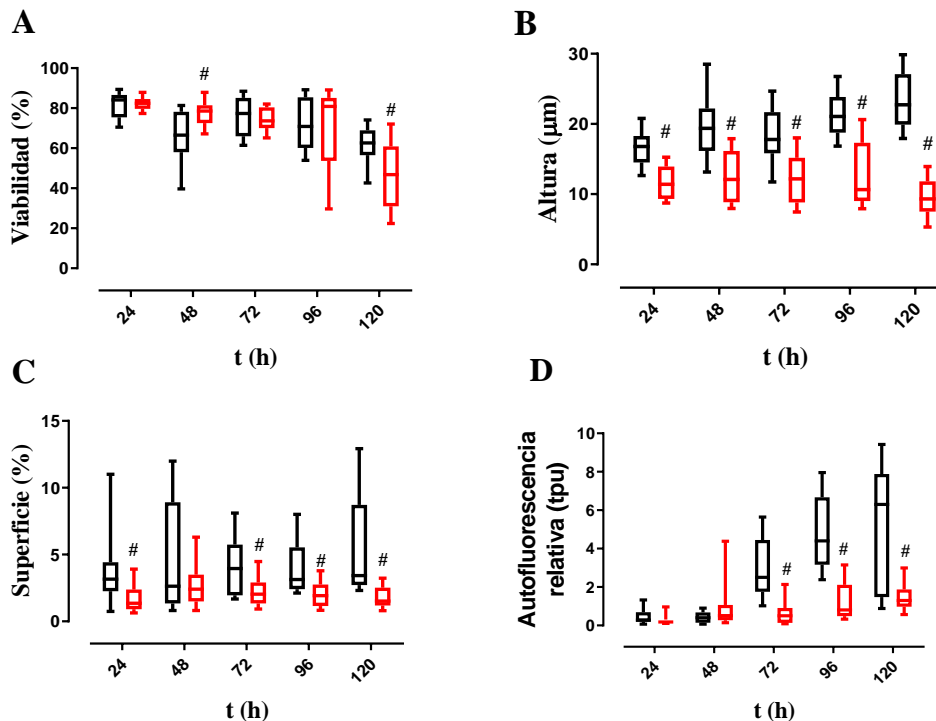


Figura 15. Efecto del tratamiento de la superficie con el extracto de *Methylobacterium sp.* CECT 7180 sobre la formación de *biofilms* de 120 h. El *biofilm* formado sobre la superficie control se muestra en negro y el formado sobre la superficie trata se muestra en rojo. **A.** Efecto en la viabilidad celular (%) a lo largo de 120h. **B.** Efecto en la altura (µm) de *biofilms* de diferentes edades. **C.** Efecto en la superficie (%) del pocillo cubierta por los *biofilms* de diferentes edades. **D.** Efecto en la autofluorescencia relativa (%) (medida como autofluorescencia/superficie) de los *biofilms* de diferentes edades. Se muestra mediana, rango intercuartílico y percentiles 10 y 90. #: p-valor < 0.001 para el test de Wilcoxon entre la superficie control y la tratada.

producción de matriz. Consecuentemente, ya que la matriz es uno de los componentes principales del *biofilm*²⁹, la altura y la superficie ocupada por el *biofilm* tratado se ven también disminuidas. La formación de matriz está regulada por el *quorum sensing*^{31,32,31,32}, por lo que al menos una de las moléculas que contiene el extracto podría ser una molécula inhibidora de este fenómeno, es decir, una molécula con actividad de *quorum quenching*. El proceso de *quorum sensing* es muy conocido en muchas gram-negativas y gram-positivas, pero en el caso de las micobacterias es bastante desconocido, ya que en muchos casos faltan evidencias experimentales para los resultados obtenidos bioinformáticamente⁶⁹. Los autoinductores implicados en el *quorum sensing* difieren enormemente entre especies, en el caso de las micobacterias, se cree que los segundos mensajeros, en especial el diGMPc, cuyos niveles regulan diversas vías de señalización intracelular que responden a cambios en el ambiente como puede ser la formación de *biofilms*^{69,70}, lo que se ha demostrado en otras micobacterias no-tuberculosas de crecimiento rápido como *M. smegmatis*⁷⁰. Sin embargo, también hay estudios que demuestran la capacidad de afectar a la formación de *biofilms* de autoinductores no sintetizados por las propias micobacterias. Es el caso del autoinductor universal AI-2 que actúa como parainductor en *M. avium* incrementando la formación de *biofilms* de esta especie por la inducción de estrés oxidativo⁷¹.

Este no es el primer trabajo que describe una posible actividad de *quorum quenching* de moléculas de diferente naturaleza, incluso producidas por otros microorganismos, sino que describen moléculas anti-*biofilm* con actividades de *quorum quenching*, como la partenolida o el meloxicam que pueden inhibir la formación en *biofilms* de *P. aeruginosa*, el aspartato la formación del *biofilm* de *S. aureus* debido a su efecto en la producción de matriz⁶⁵⁻⁶⁷ o la producción de una lactonasa por *M. avium* capaz de degradar autoinductores de tipo lactona tan comunes en bacterias gramnegativas⁷². Además, el extracto de *D. tsuruhatensis* también ejerce su actividad anti-*biofilm* sobre *P. aeruginosa* debido a su capacidad

de *quorum quenching*⁶⁰. Estos estudios sustentan la posible actividad de *quorum quenching* de una o varias moléculas presentes en el extracto de *Methylobacterium* CECT 7180 se adherirían sobre la superficie tratada, para después inhibir el desarrollo del *biofilm* de *M. chimaera* ECMO.

Efecto del tratamiento con el extracto de *Methylobacterium sp.* CECT 7180 en *biofilms* de *M. chimaera* ECMO sometidos a diferentes tiempos de desecación

Por último en este trabajo. se probó el extracto de *Methylobacterium sp.* CECT 7180 como tratamiento sobre *biofilms* sometidos a diferentes tiempos de desecación.

La desecación de 24, 48, 72 y 96 h no supuso un descenso en el \log_{10} (UFC/cm²) (p-valor= 0.1239 para el test de Krustal Wallis), pero, sin embargo, tras 120 h de desecación sí se observó un descenso significativo (p-valor = 0.0008) (p-valores para el test de Wilcoxon indicados en **Anexos: Tabla 4**) (**Figura 16.B.**, en gris).

El tratamiento con *Methylobacterium sp.* CECT 7180 de los *biofilms* desecados 24 h, 48 h y 72 h no mostró una disminución significativa ni macroscópicamente (**Figura 16.A.**), ni cuantitativamente (p-valor = 0.5588 para el test de Krustal Wallis) (**Figura 16.B.**). Por el contrario, el tratamiento de los *biofilms* sometidos a 96 h y 120 h de desecación sí mostró cambios macroscópicos (**Figura 16.A.**) así como una disminución en las unidades formadoras de colonia por área (p-valor = 0.0008 y 0.0007, respectivamente) (**Figura 16.B.**) (p-valores para el test de Wilcoxon en **Anexos: Tabla 5**). Al igual que este estudio, hay otros que describen moléculas capaces de inhibir no solo la formación de *biofilms* sino también de tener efecto sobre *biofilm* ya formados. Es el caso del cinamaldehído sobre el *biofilm* de *S. epidermidis*⁶² y el asparato sobre *S. aureus*⁶⁵.

El extracto de *Methylobacterium* CECT 7180 podría ser utilizado como pretratamiento de 15 minutos antes de una descontaminación de los equipos 3T HCD

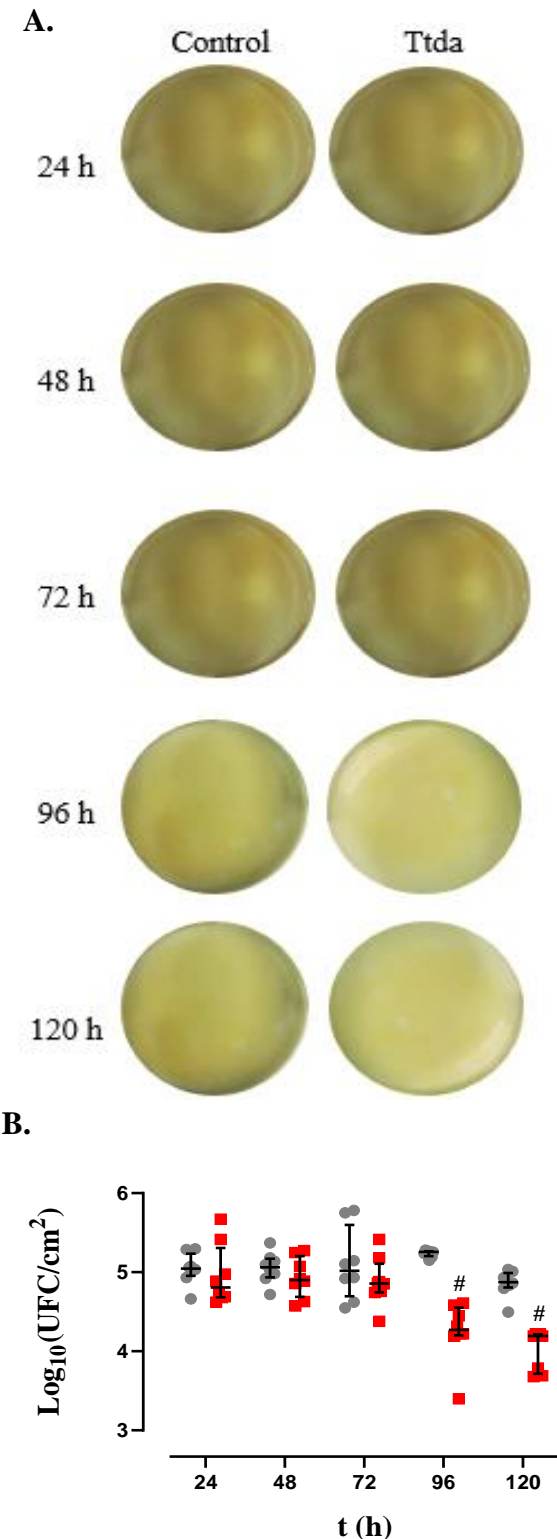


Figura 16. A. Biofilms de cinco días de *M.chimaera* ECMO sometidos a diferentes tiempos de desecación (24, 48, 72, 96 y 120 h) y a un tratamiento de PBS (control) o del extracto de *Methylobacterium sp.* CECT 7180 (Ttda). **B.** Log₁₀(UFC/cm²) presentes tras el tiempo indicado de desecación y el tratamiento correspondiente (control en gris y tratamiento en rojo). Se muestra mediana y rango intercuartílico. #: p-valor < 0.001 para el test de Wilcoxon entre la superficie control y la tratada.

LivaNova, tras someter a los equipos a cuatro-cinco días de desecación de aire a temperatura ambiente para favorecer la capacidad anti-*biofilm* de la descontaminación.

Conclusiones

A la luz de estos resultados, se puede afirmar que el extracto de *Methylobacterium sp.* CECT 7180 adsorbido sobre una superficie tiene capacidad anti-*biofilm* de *M. chimaera* ECMO: (1) inhibiendo el desarrollo de su *biofilm* y (2) disminuyendo la viabilidad del *biofilm* desecado. La primera actividad podría ser debida por la inhibición de la producción de matriz a causa del bloqueo de algún sistema de *quorum sensing* o *quorum quenching*, sin embargo, el segundo efecto podría ser debido a que el extracto favorece la disgregación del *biofilm* desecado.

A pesar de los resultados obtenidos, sería necesario continuar con estudios moleculares que permitan dilucidar acerca de la molécula o las moléculas del extracto que son responsables de las actividades descritas.

Bibliografía

1. Achermann, Y. *et al.* Prosthetic valve endocarditis and bloodstream infection due to *Mycobacterium chimaera*. *J. Clin. Microbiol.* **51**, 1769–1773 (2013).
2. Sommerstein, R. *et al.* Transmission of *Mycobacterium chimaera* from heater-cooler units during cardiac surgery despite an ultraclean air ventilation system. *Emerg. Infect. Dis.* **22**, 2–7 (2016).
3. 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.* **36**, 2745–2753 (2015).
4. Sax, H. *et al.* Prolonged outbreak of *Mycobacterium chimaera* infection after open-chest heart surgery. *Clin. Infect. Dis.* (2015). doi:10.1093/cid/civ198
5. European Centre for Disease Prevention and Control. Invasive cardiovascular infection by *Mycobacterium chimaera* associated with the 3T heater-cooler system used during open-heart surgery. (2016).
6. Schreiber, P. W. & Sax, H.

- Mycobacterium chimaera* infections associated with heater-cooler units in cardiac surgery. *Curr. Opin.* **30**, (2017).
7. Haller, S. *et al.* Contamination during production of heater-cooler units by *Mycobacterium chimaera* potential cause for invasive cardiovascular infections: results of an outbreak investigation in Germany, April 2015 to February 2016. *Surveill. outbreak Rep.* (2016).
 8. Walker, J. *et al.* Microbiological problems and biofilms associated with *Mycobacterium chimaera* in heater-cooler units used for cardiopulmonary bypass. *J. Hosp. Infect.* **96**, 209–220 (2017).
 9. Chand, M. *et al.* Insidious risk of severe *Mycobacterium chimaera* infection in cardiac surgery patients. *Clin. Infect. Dis.* **64**, 335–342 (2017).
 10. Cai, Y., Landolfo, K. & Renew, J. R. *Mycobacterium* infection from a cardiopulmonary bypass heater-cooler unit in a patient with steroid-induced immunosuppression. *Can J Anesth* **64**, 513–516 (2017).
 11. Cazzadori, A. & Lanzafame, M. Disseminated *Mycobacterium chimaera* infection after open heart surgery in an Italian woman: a case report and a review. *Le Infez. Med.* **3**, 267–269 (2017).
 12. Dominguez, F., Forteza, A., Garcia-pavia, P. & Ramos-martinez, A. Successful treatment of healthcare-associated *Mycobacterium chimaera* prosthetic infective endocarditis: the first Spanish case report. *Eur. Heart J.* **2**, 1–6 (2018).
 13. Tan, N., Sampath, R., Saleh, O. M. A. & Tweet, M. S. Disseminated *Mycobacterium chimaera* infection after cardiothoracic surgery. *Open Forum Infect. Dis.* **3**, 1–3 (2016).
 14. Zhang, X., Lin, J., Feng, Y., Wang, X. & McNally, A. Identification of *Mycobacterium chimaera* in heater-cooler units in China. *Sci. Rep.* 1–5 (2018). doi:10.1038/s41598-018-26289-5
 15. Acosta, F. *et al.* Fast update of undetected *Mycobacterium chimaera* infections to reveal unsuspected cases. *J. Hosp. Infect.* **152**, (2018).
 16. Sommerstein, R. *et al.* Global health estimate of invasive *Mycobacterium chimaera* infections associated with heater-cooler devices in cardiac surgery. *Emerg. Infect. Dis.* **24**, 1–3 (2018).
 17. Schreiber, P. W. *et al.* Reemergence of *Mycobacterium chimaera* in heater-cooler units despite intensified cleaning and disinfection protocol. *Emerg. Infect. Dis.* **22**, 2–5 (2016).
 18. Stewardson, A. J., Stuart, R. L. & Cheng, A. C. *Mycobacterium chimaera* and cardiac surgery. *Med. J. Aust.* **206**, 132–135 (2016).
 19. Nihn, A., Weiner, M. & Goldberg, A. Healthcare-associated *Mycobacterium chimaera* infection subsequent to heater-cooler device exposure during cardiac surgery. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* (2017). doi:10.1053/j.jvca.2017.05.028
 20. Murray, P. R., Rosenthal, K. S. & Michael A, P. *Microbiología médica.* (Elsevier-Mosby, 2009).
 21. Alcaide Fernández de Vega, F., Moreno, J. E., Martín, J. G. & Gutiérrez, J. J. P. *Procedimientos en microbiología clínica.* (2005).
 22. Daley, C. L. & Griffith, D. E. *Nontuberculous mycobacterial infections. Murray and Nadel's Textbook of Respiratory Medicine, 2-Volume Set* (Elsevier Inc., 2016). doi:10.1016/B978-1-4557-3383-5.00036-1
 23. Faria, S., Joao, I. & Jordao, L. General overview on nontuberculous mycobacteria, biofilms, and human infection. *J. Pathog.* **2015**, 2–10 (2015).
 24. Wengenack, N. An update on *Mycobacterium chimaera* and cardiac surgery infections. *Mayo Clinic Labs News* (2018). Available at: <https://news.mayocliniclabs.com/2018/02/19/update-mycobacterium-chimaera-cardiac-surgery-infections/>. (Accessed: 26th June 2019)
 25. Johnson, M. M. & Odell, J. A. Nontuberculous mycobacterial pulmonary infections. *J. Thorac. Dis.* **6**, 210–220 (2014).
 26. Ryu, Y. J., Koh, W. & Daley, C. L. Diagnosis and treatment of nontuberculous mycobacterial lung disease: clinicians' perspectives. *Tuberc. Respir. Dis. (Seoul)*. **79**, 74–84 (2016).
 27. Costerton, J. W. & Lewandowski, Z. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**, 711–745 (1995).
 28. West, S. A., Griffin, A. S., Gardner, A. & Diggle, S. P. Social evolution theory for microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 597–607 (2006).
 29. Flemming, H. & Wingender, J. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 623–633 (2010).
 30. Flemming, H., Wingender, J., Szewzyk,

- U., Steinberg, P. & Rice, S. A. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 563–575 (2016).
31. Diggle, S. P. Microbial communication and virulence: lessons from evolutionary theory. *Micobiology* **156**, 3503–3512 (2010).
32. Dong, Y., Wang, L. & Zhang, L. Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications. *Philos. Trans. R. Soc.* **362**, 1201–1211 (2007).
33. Hall-stoodley, L., Costerton, J. W. & Stoodley, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infection diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 95–108 (2004).
34. Ramos, S. *et al.* Nanotechnology-based drug delivery systems for control of microbial biofilms: a review. *Int. J. Nanomedicine* **13**, 1179–1213 (2018).
35. Ojha, A. K. Targeting drug tolerance in mycobacteria: a perspective from mycobacterial biofilms. *Expert Rev.* 1055–1066 (2012).
36. Monroe, D. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. *PLoS Biol.* **5**, 2458–2461 (2007).
37. Esteban, J. & García-coca, M. *Mycobacterium* biofilms. *Front. Microbiol.* **8**, 1–8 (2018).
38. Chakraborty, P. & Kumar, A. The extracellular matrix of mycobacterial biofilms: could we shorten the treatment of mycobacterial infections? *Microb. Cell* **6**, 105–122 (2019).
39. Falkinham III, J. O., Iseman, M. D., Haas, P. De & Soolingen, D. Van. *Mycobacterium avium* in a shower linked to pulmonary disease. *J. Water Health* 209–213 (2008). doi:10.2166/wh.2008.032
40. McNabe, M., Tennant, R., Danelishvili, L., Young, L. & Bermudez, L. E. *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* biofilm is composed of distinct phenotypes and influenced by the presence of antimicrobials. *Clin. Microbiol. Infect.* **17**, 697–703 (2012).
41. Fennelly, K. P. *et al.* Biofilm formation by *Mycobacterium abscessus* in a lung cavity. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **193**, 692–693 (2016).
42. Bosio, S. *et al.* *Mycobacterium fortuitum* prosthetic valve endocarditis: a case for the pathogenetic role of biofilms. *Cardiovasc. Pathol.* **21**, 361–364 (2012).
43. Meyer, A., Prasad, K. G. & Antisdell, J. *Mycobacterium chelonae* dacryocystitis after endoscopic dacryocystorhinostomy. *Allergy Rhinol.* **5**, 87–90 (2014).
44. Marsollier, L. *et al.* Impact of *Mycobacterium ulcerans* biofilm on transmissibility to ecological niches and Buruli ulcer pathogenesis. *PLoS Pathog.* **3**, (2007).
45. Garvey, M. I., Phillips, N. & Bradley, C. W. Decontamination of an extracorporeal membrane oxygenator contaminated with *Mycobacterium chimaera*. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 8–10 (2017).
46. Martí, M. C., Bermejo, B. B. & Gil, L. A. Infections with *Mycobacterium chimaera* and open chest surgery. An unresolved problem. *Med. Clin. (Barc.)* **152**, 317–323 (2019).
47. Sommerstein, R. *et al.* *Mycobacterium chimaera* outbreak associated with Heater-Cooler Devices: piecing the puzzle together. **38**, (2017).
48. Walker, A. J. *et al.* A review of the microbiological problems and biofilms associated with *Mycobacterium chimaera* in heater cooler units used for cardiopulmonary bypass. *J. Hosp. Infect.* (2017). doi:10.1016/j.jhin.2017.04.014
49. del Pozo, J. L. Biofilm-related disease. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 1–15 (2017). doi:10.1080/14787210.2018.1417036
50. Patt, T. E., Cole, G. C. & Hanson, R. S. *Methylobacterium*, a new genus of facultatively methylotrophic bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **26**, 226–229 (1976).
51. Kovaleva, J., Degener, J. E. & Mei, C. Van Der. *Methylobacterium* and its role in health care-associated infection. *J. Clin. Microbiol.* **52**, 1317–1321 (2014).
52. Muñoz Egea, M. C., Ji, P., Pruden, A. & Falkinham III, J. O. Inhibition of adherence of *Mycobacterium avium* to plumbing surface biofilms of *Methylobacterium* spp. *Pathogens* **6**, 1–11 (2017).
53. García-Coca, M., Rodríguez-Sevilla, G., Aguilera-Correa, J.-J., Esteban-Moreno, J. & Muñoz-Egea, M.-C. Inhibition of *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium fortuitum* biofilms by *Methylobacterium* sp. in *European Congress of Clinical Microbiology and Infectious diseases* (2018).
54. Herigstad, B., Hamilton, M. & Heersink, J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *J. Microbiol. Methods* **44**, 121–129 (2001).
55. Muñoz-Egea, M.-C., García-Pedrazuela, M., Mahillo, I., García, M. J. & Esteban,

- J. Autofluorescence as a tool for structural analysis of biofilms formed by nonpigmented rapidly growing Mycobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 1065–1067 (2013).
56. Hell, É., Giske, C. G., Nelson, A., Rómling, U. & Marchini, G. Human cathelicidin peptide LL37 inhibits both attachment capability and biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Lett. Appl. Microbiol.* **50**, 211–215 (2010).
57. Cirioni, O. *et al.* Citropin 1.1-treated central venous catheters improve the efficacy of hydrophobic antibiotics in the treatment of experimental staphylococcal catheter-related infection. *Peptides* **27**, 1210–1216 (2006).
58. Willcox, M. D. P., Hume, E. B. H., Aliwarga, Y., Kumar, N. & Cole, N. A novel cationic-peptide coating for the prevention of microbial colonization on contact lenses. *J. Appl. Microbiol.* **105**, 1817–1825 (2008).
59. Muñoz-Egea, M., Esteban, M. & Esteban, J. Inhibition of *Mycobacterium abscessus* biofilms by *Methylobacterium sp.* in *European Congress of Clinical Microbiology and Infectious diseases* (2018).
60. Singh, V. K., Mishra, A. & Jha, B. Anti-quorum sensing and anti-biofilm activity of *Delftia tsuruhatensis* extract by attenuating the quorum sensing-controlled virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**, 1–16 (2017).
61. María Carmen Muñoz-Egea, García-Pedrazuela, M., Mahillo, I. & Esteban, J. Effect of ciprofloxacin in the ultrastructure and development of biofilms formed by rapidly growing mycobacteria. *BioMedCentral Microbiology* **15**, 1–6 (2015).
62. Albano, M., Crulhas, B. P., Cristina, F. & Alves, B. Antibacterial and anti-biofilm activities of cinnamaldehyde against *S. epidermidis*. *Microb. Pathog.* **126**, 231–238 (2018).
63. Stowe, S. D. *et al.* Anti-biofilm compounds derived from marine sponges. *Mar. Drugs* **9**, 2010–2035 (2011).
64. Dean, S. N., Bishop, B. M. & Hoek, M. L. Van. Natural and synthetic cathelicidin peptides with anti-microbial and anti-biofilm activity against *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol.* **114**, (2011).
65. Yang, H., Wang, M., Yu, J. & Wei, H. Aspartate inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *FEMS Microbiol. Lett.* **362**, 1–7 (2015).
66. She, P. *et al.* Meloxicam inhibits biofilm formation and enhances antimicrobial agents efficacy by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Open* 1–9 (2018). doi:10.1002/mbo3.545
67. Kalia, M. *et al.* Exploring the impact of parthenolide as anti-quorum sensing and anti-biofilm agent against *Pseudomonas aeruginosa*. *Life Sci.* **199**, 96–103 (2018).
68. Martínez-Gutierrez, F. *et al.* Anti-biofilm activity of silver nanoparticles against different microorganisms. *Biofouling* **26**, 651–660 (2013).
69. Polkade, A. V., Mantri, S. S., Patwekar, U. J. & Jangid, K. Quorum sensing: an under-explored phenomenon in the phylum Actinobacteria. *Front. Microbiol.* **7**, 1–13 (2016).
70. Sharma, I. M., Petchiappan, A. & Chatterji, D. Quorum sensing and biofilm formation in Mycobacteria: role of c-di-GMP and methods to study this second messenger. *Int. Union Biochem. Mol. Biol.* **66**, 823–834 (2014).
71. Geier, H., Mostowy, S., Cangelosi, G. A., Behr, M. A. & Ford, T. E. Autoinducer-2 triggers the oxidative stress response in *Mycobacterium avium*, leading to biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 1798–1804 (2008).
72. Chow, J. Y., Wu, L. & Yew, W. S. Directed evolution of a quorum-quenching lactonase from *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis K-10 in the amidohydrolase superfamily. *Biochemistry* **48**, 4344–4353 (2009).
73. Brown, L., Wolf, J. M., Prados-rosales, R. & Casadevall, A. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 620–630 (2016).

Anexos

Tabla 2. Resultados obtenidos de la comparación por el test de Wilcoxon de cada característica (altura, viabilidad, superficie y autofluorescencia) de los *biofilms* de diferentes edades de *M. chimaera* ECMO (24, 48, 72, 96 y 120 h). ¥: p-valor no significativo en el test de Krustal-Walis realizado previamente al test de Wilcoxon.

		Altura	Viabilidad	Superficie	Autofluorescencia relativa	
Control	24 h - 48 h	z	-2.662	4.82	¥	-0.414
		p-valor	0.0078	<0.0001	¥	0.6789
	24 h - 72 h	z	-1.693	2.085	¥	-6.077
		p-valor	0.0904	0.0371	¥	<0.0001
	24 h - 96 h	z	-4.704	2.617	¥	-6.579
		p-valor	<0.0001	0.0089	¥	<0.0001
	24 h - 120 h	z	5.353	-6.047	¥	6.047
		p-valor	<0.0001	<0.0001	¥	<0.0001
	48 h - 72 h	z	0.858	-2.765	¥	-6.476
		p-valor	0.3910	0.0057	¥	<0.0001
	48 h - 96 h	z	-1.878	-1.434	¥	-6.653
		p-valor	0.0606	0.1515	¥	<0.0001
	48 h - 120 h	z	3.076	-1.774	¥	6.38
		p-valor	0.0021	0.0760	¥	<0.0001
	72 h - 96 h	z	-2.804	0.991	¥	-3.090
		p-valor	0.005	0.3219	¥	0.002
	72 h - 120 h	z	3.89	-4.110	¥	2.336
		p-valor	0.0001	<0.0001	¥	0.0195
96 h - 120 h	z	1.768	-2.572	¥	0.887	
	p-valor	0.0771	0.0101	¥	0.375	
Tratamiento	24 h - 48 h	z	-0.606	3.016	-2.403	-3.533
		p-valor	0.5443	0.0026	0.0163	0.0004
	24 h - 72 h	z	-0.399	4.864	-2.085	-1.937
		p-valor	0.6897	<0.0001	0.0371	0.0528
	24 h - 96 h	z	-0.096	1.597	-1.508	5.115
		p-valor	0.9234	0.1103	0.1316	<0.0001
	24 h - 120 h	z	-2.455	-6.210	0.739	5.648
		p-valor	0.0141	<0.0001	0.4598	<0.0001
	48 h - 72 h	z	-0.377	1.405	0.769	1.064
		p-valor	0.7061	0.1602	0.4420	0.2871
	48 h - 96 h	z	-0.067	-0.089	1.375	-1.981
		p-valor	0.9469	0.9293	0.1691	0.0476
	48 h - 120 h	z	-2.529	-5.855	-2.085	3.430
		p-valor	0.0114	<0.0001	0.0371	0.0006
	72 h - 96 h	z	-0.089	-1.198	0.702	-2.661
		p-valor	0.9293	0.2311	0.4825	0.0078
	72 h - 120 h	z	-2.426	-5.633	-1.464	4.125
		p-valor	0.0153	<0.0001	0.1433	<0.0001
96 h - 120 h	z	-2.285	-3.947	-0.813	1.345	
	p-valor	0.0223	0.0001	0.4161	0.1785	

Tabla 3. Resultados obtenidos al comparar por el test de Wilcoxon las características (altura, viabilidad, superficie y autofluorescencia) de los *biofilms* de cada edad (24, 48, 72, 96 y 120 h) formados sobre la superficie control con las de los formados sobre la superficie tratada con el extracto de *Methylobacterium sp.* CECT 7180.

		Altura	Viabilidad	Superficie	Autofluorescencia relativa
24 h	z	5.057	0.355	3.356	1.745
	p-valor	<0.0001	0.7227	0.0008	0.0811
48 h	z	5.131	-3.460	0.850	-1.804
	p-valor	<0.0001	0.0005	0.3953	0.0713
72 h	z	4.799	0.887	3.356	5.648
	p-valor	<0.0001	0.3750	0.0008	<0.0001
96 h	z	5.170	0.044	4.273	5.973
	p-valor	<0.0001	0.9646	<0.0001	<0.0001
120 h	z	6.536	3.326	5.278	3.962
	p-valor	<0.0001	0.0009	<0.0001	0.0001

Tabla 4. Resultados obtenidos al comparar por el test de Wilcoxon el $\log_{10}(\text{UFC}/\text{cm}^2)$ de *biofilms* de *M. chimaera* ECMO sometidos a diferentes tiempos de desecación (24, 48, 72, 96 y 120 h).

			$\log_{10}(\text{UFC}/\text{cm}^2)$				$\log_{10}(\text{UFC}/\text{cm}^2)^2$
Control	24 h – 48 h	z	-0.053	Tratamiento	24 h – 48 h	z	-0.053
		p-valor	0.9581			p-valor	0.9581
	24 h – 72 h	z	0.158		24 h – 72 h	z	-0.053
		p-valor	0.8747			p-valor	0.9581
	24 h – 96 h	z	-1.682		24 h – 96 h	z	3.363
		p-valor	0.0927			p-valor	0.0008
	24 h - 120 h	z	-2.209		24 h-120h	z	-3.373
		p-valor	0.0272			p-valor	0.0007
	48 h – 72 h	z	0.158		48 h – 72 h	z	0.630
		p-valor	0.8747			p-valor	0.5286
	48 h - 96 h	z	-2.417		48 h – 96 h	z	3.153
		p-valor	0.0156			p-valor	0.0016
	48 h – 120 h	z	-1.995		48 h - 120 h	z	-3.373
		p-valor	0.0460			p-valor	0.0007
	72 h – 96 h	z	-1.682		72 h – 96 h	z	3.048
		p-valor	0.0927			p-valor	0.0023
	72 h - 120 h	z	-1.314		72 h - 120 h	z	-3.373
		p-valor	0.1889			p-valor	0.0007
96 h – 120 h	z	-3.363	96 h – 120 h	z	-1.972		
	p-valor	0.0008		p-valor	0.04786		

Tabla 5. Resultados obtenidos al comparar por el test de Wilcoxon el $\log_{10}(\text{UFC}/\text{cm}^2)$ de los *biofilms* de *M. chimaera* ECMO sometidos a diferentes tiempos de desecación (24, 48, 72, 96, y 120 h) y a un tratamiento control (PBS) con los sometidos al mismo tiempo de desecación y al tratamiento con el extracto de *Methylobacterium sp.* CECT 7180.

		$\log_{10}(\text{UFC}/\text{cm}^2)$
24 h	z	1.050
	p-valor	0.2936
48 h	z	1.155
	p-valor	0.2480
72 h	z	1.050
	p-valor	0.2936
96 h	z	3.366
	p-valor	0.0008
120 h	z	3.373
	p-valor	0.0007