

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO

FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA HUMANA



TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO CIRUJANO

“Efecto de la ciprofloxacina sobre *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente en crecimiento planctónico o en biofilm”

Área de Investigación:

Enfermedades infecciosas y tropicales.

Autora:

Br. Torres Rios, Milagros Elvira.

Jurado evaluador:

Presidente: Araujo Jiménez, Armando.

Secretaria: Córdova Paz Soldán, Ofelia Magdalena.

Vocal: Mercado Martínez, Pedro Estuardo.

Asesor:

González Cabeza, Jose Guillermo.

Código Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-3022-9423>

Trujillo – Perú

2020

Fecha de sustentación: 2020/09/15

DEDICATORIA

A mi sueño de realizar un proyecto en un laboratorio científico, el cual surgió a mis 8 años y persistió hasta ser realizado.

A la ciencia, como base para más logros.

A mi asesor, por guiarme y apoyarme.

AGRADECIMIENTO

A mi núcleo familiar, por siempre impulsarme a luchar por mis sueños.

A mis compañeros de laboratorio, por compartir conmigo sus conocimientos y su tiempo.

ÍNDICE

RESUMEN.....	5
ABSTRACT.....	6
INTRODUCCIÓN.....	8
MATERIAL Y MÉTODOS.....	15
RESULTADOS.....	22
DISCUSIÓN.....	31
CONCLUSIONES.....	33
RECOMENDACIONES	34
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
ANEXOS.....	38

I. RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria oportunista causante de diversas enfermedades infecciosas difíciles de tratar, puede presentarse en forma de biofilm o crecimiento planctónico y mostrar o no resistencia a antibióticos.

Objetivo: Evaluar el efecto de ciprofloxacina sobre el biofilm y poblaciones planctónicas de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente.

Materiales y métodos: Realizamos un estudio experimental básico, prospectivo, analítico, con siete cepas de *Pseudomonas aeruginosa* en el Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología – UPAO. Tras obtener las cepas, se las hizo crecer en placas, de las cuales, se fueron prepararon los overnigth conforme se fue trabajando; así mismo, se elaboró la solución stock y diluciones de la ciprofloxacina; y, por último, expusimos las bacterias al antibiótico para poder valorar sus efectos. Con respecto al estudio de análisis estadístico, se realizó prueba T de student.

Resultados: Las cepas control, ATCC-27853 y ATCC-10145, y AO-523, presentaron mayor sensibilidad frente a ciprofloxacina. Así mismo, las cepas control desarrollaron biofilms con mayor rapidez. Y, tras haberlas expuesto a la ciprofloxacina, se observó que dicho antibiótico, indujo un declive en las curvas de ambas formas de crecimiento, especialmente en la formación de biofilms de todas las cepas trabajadas.

Conclusión: Tras exponer la forma planctónica y formación de biofilms a la ciprofloxacina, observamos mayor declive en las curvas de formación de biofilm. Por lo tanto, la ciprofloxacina presenta mayor efecto sobre el

biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente, que en su crecimiento planctónico.

Palabras Clave: *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente, ciprofloxacina, crecimiento planctónico, biofilm.

II. ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic bacterium that causes various infectious diseases that are difficult to treat. It can appear as biofilm or planktonic form and may or may not show resistance to antibiotics.

Objective: To assess the effect of ciprofloxacin on the planktonic form and biofilm of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*.

Material and methods: We carried out a basic experimental, prospective and analytical study with seven strains of *Pseudomonas aeruginosa* at the "Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología – UPAO". After obtaining the strains, they were grown on plates, of which the longest ones were prepared as work was done; likewise, the stock solution and dilutions of ciprofloxacin were prepared; and finally, we exposed the bacteria to the antibiotic in order to assess its effects. Regarding the statistical analysis study, the student T test was performed.

Results: The control strains, ATCC-27853 and ATCC-10145, and AO-523, showed higher sensitivity against ciprofloxacin, which developed biofilms more quickly. And, after having exposed them to ciprofloxacin, it

was observed that said antibiotic induced a decline in the curves of both forms of especially in the formation of biofilms of all the strains studied.

Conclusion: After exposing the planktonic form and biofilm formation to ciprofloxacin, we observed a greater decline in the biofilm formation curves. Therefore, ciprofloxain has a greater effect onthe biofilm of multidrugresistant *Pseudomonas aeruginosa*, tan on its planktonic form.

Keywords: Pseudomonas aeruginosa, multiresistant, ciprofloxacin, planktonic form, biofilm.

III. INTRODUCCIÓN

La ciprofloxacina es una quinolona de segunda generación, usada para el tratamiento de diversos tipos de infecciones extra e intrahospitalarias, de gran disponibilidad, razones por las cuales son consideradas muy importantes, especialmente en países subdesarrollados. [1,2]

Este grupo de antimicrobianos sintéticos son de amplio espectro, tienen como objetivo establecer complejos ternarios de DNA – DNA Girasa – Quinolona, e interferir en la síntesis del DNA y RNA, generar alteraciones cromosómicas y así conducir a la muerte celular. Para ello, interactúan con enzimas como la DNA girasa en el caso de las bacterias Gram negativas, y con la topoisomerasa IV con las Gram positivos. [1]

Autores como Álvarez, Segreti, Shaw y sus grupos, explican que “la cirpofloxacina también actúa en la membrana celular bacteriana, desintegrando las membranas interna y externa, cuando se encuentran en altas concentraciones, debido a la acción de agentes quelantes que remueven cationes, predominantemente iones de Mg^{2+} . Esto conlleva a un incremento del 35% aproximadamente en la hidrofobicidad celular y en la sensibilidad hacia la lisis mediada por dodecilsulfato sódico y otros detergentes.” [1,3,4]

Ortega y su equipo realizaron un estudio sobre la respuesta de diversos uropatógenos frente a varios tipos de antibióticos, demostraron que *Escherichia coli* fue la bacteria que presentó mayor resistencia con 58% en total y 42% específicamente a ciprofloxacina; así mismo, fue la más formadora de biofilms. De igual manera, *Pseudomonas aeruginosa* también desarrolló biofilm y resistencia a ciprofloxacina, entre otros antibióticos utilizados en dicho estudio. [5]

Neupane y sus colaboradores, realizaron un estudio en un hospital de Nepal sobre cepas de *E. coli* uropatógenas y describen que esta bacteria presenta multidrogorresistencia gracias a que tiene betalactamasas de espectro extendido (ESBL), además de formar biofilms lo cual incrementa su resistencia a cefalexina y amoxicilina. [6]

El crecimiento de formas sésiles de bacterias en diversas superficies ha sido descrito desde principios del siglo XX. El término “biopelícula o biofilm” ha sido utilizado desde 1975 y se define como una comunidad compleja de microorganismos que habitan diversas superficies vivas o inertes, en las cuales podemos encontrar una o múltiples especies. [7] Además, están rodeadas por una matriz extracelular (ECM) secretada por las mismas bacterias, la cual está compuesta por exopolisacáridos (EPS), DNA extracelular, RNA, proteínas y lípidos. [7,8]

Los biofilms son una fuente de infecciones persistentes muy difíciles de erradicar, pues la ECM los protege de ambientes hostiles, ya sean sustancias antimicrobianas, desinfectantes y al sistema inmunológico del huésped. [7,10] Los microorganismos que conforman una biopelícula son significativamente más resistentes a los antimicrobianos que los que crecen planctónicamente. [26,27] Incluso, se ha demostrado que son hasta mil veces más tolerantes a dichas sustancias en comparación con sus homólogos planctónicos. [5]

La OMS publicó una lista de bacterias de prioridad crítica, donde incluyen: *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y varias enterobacteriáceas como *Klebsiella*, *E. coli*, *Serratia*, y *Proteus*. Durante la última década, se ha observado la aparición de aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* los cuales son multirresistentes (PAMR); es decir, resistentes a 3 familias o más de antimicrobianos; y las cuales están asociadas con diversas enfermedades infecciosas en el ser humano. [7,11]

Pseudomonas aeruginosa ha sido reconocida como un patógeno oportunista, [7,9,12,13] comúnmente asociado con áreas hospitalarias y centros de cuidados, como asilos. [11] Esta es causante de diversas infecciones con alta mortalidad, como fibrosis quística, neumonía asociada al ventilador, endocarditis, meningitis, quemaduras, heridas infectadas, sepsis y enfermedades asociadas a dispositivos médicos.

[7,9,10,12,13]

Ello es producto de su gran plasticidad ecológica, lo que le ha valido adaptarse a diversos ambientes y la subsecuente aparición constante de resistencias; esta bacteria representa una gran amenaza para la salud, pues aumenta la tasa de ocurrencia de enfermedades y mortalidad, es considerada el mayor agente causal de infecciones intrahospitalarias y la segunda causa más común de neumonía asociada al ventilador.

[12,13,21]

Se conoce que *P. aeruginosa* posee diversos factores de virulencia como flagelos [15], pili tipo IV [7,9,16], proteasa alcalina, elastasa, lipopolisacáridos, fosfolipasa, exotoxina A, piroidina, pyochelin, piocianinas, señales de quinolonas (QPS), incluso algunos autores describen que hay muchos aspectos indeterminados respecto a su virulencia. [7,17-20]

P. aeruginosa cuenta con diversos mecanismos que le permiten contrarrestar los antibióticos, los más importantes se clasifican como intrínsecos y adquiridos. Los primeros consisten en la baja permeabilidad de la membrana externa y expresión de bombas de flujo de salida; y de otro lado los adquiridos, que se logran mediante la transferencia horizontal de genes de resistencia y mutación [22]; y resistencia adaptativa gracias a su capacidad de formar biofilm. [12]

El desarrollo de biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* consta de 3 etapas: fijación inicial, maduración y desprendimiento de la biopelícula. La primera es la fijación, en la cual participan diversas estructuras bacterianas como adhesinas, pili tipo IV, lipopolisacáridos, las cuales están mediadas por señales ambientales, quienes aumentan el c-di-GMP, un mensajero que activa la producción de adhesinas y diversos productos de ECM; además, están involucradas las fuerzas de Van der Waals y la proteína receptora WspA, quien reconoce el contacto con la superficie.^[9,16] Seguida de la etapa de maduración, conforme las bacterias se van adhiriendo, crecen y forman microcolonias, producen ECMs y forman estructuras y canales de agua, van sufriendo cambios fisiológicos y se vuelven más resistentes, este proceso está relacionado a un sistema de señalización llamado “detección de *quórum sensing*” (QS), el cual es uno de los más importantes en la formación de la biopelícula. ^[7,8] Por último, tenemos la etapa de desprendimiento de biofilm, este tiene varios mecanismos, como desprendimiento, erosión y dispersión, los cuales son indispensables para la formación de nuevos biofilm; además, contribuyen a comportarse como quelantes de metales, cis-2-ácido decenoico, antranilato y otros surfactantes. ^[23-25]

Las infecciones por biofilm son un importante problema sanitario, representan entre un 65-80% de todas las infecciones. ^[14] este tipo de infecciones son difíciles de diagnosticar, y comprometen la salud de los pacientes que usan algún dispositivo biomédico; actualmente, aún

existen dudas en cuanto a su manejo terapéutico óptimo [28], en los últimos años se han implementado y probado en diferentes especies de bacterias modelos de desarrollo de biopelícula *in vitro*. [26]

Justificación:

Puesta la facilidad de desarrollo de *Pseudomonas aeruginosa* en forma planctónica y biofilm, pertenece a la lista de agentes infecciosos más importantes en nuestro medio. Según un estudio realizado en Lima, causa el 32,3% de neumonía asociada al ventilador, entre otras infecciones nosocomiales; lo que pone en riesgo a nuestros pacientes, aumentando su ocurrencia y mortalidad.[33] Por lo cual, se estudió el efecto de la ciprofloxacina puesto que, tiene gran disponibilidad en países en vías de desarrollo como el nuestro, y permite la reducción de costos en tratamientos.

Problema de investigación:

¿Cuál es el efecto de la ciprofloxacina sobre *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente (PAMR), tanto en crecimiento planctónico como en biofilm?

Objetivo general:

- Evaluar el efecto de la ciprofloxacina sobre el biofilm y poblaciones planctónicas de PAMR.

Objetivos específicos:

- Estimar la concentración mínima inhibitoria (MIC) a ciprofloxacina de cada cepa con la que trabajamos.
- Determinar la curva de crecimiento de población planctónico y formación de biofilm.
- Comparar el efecto de la ciprofloxacina sobre ambos tipos de crecimiento de la bacteria.

Postulamos las siguientes hipótesis

- **Hiótesis de investigación:** La ciprofloxacina inhibe el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente, a predominio en su crecimiento planctónica, que en su biofilm.
- **Hipótesis nula:** La ciprofloxacina inhibe el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente, a predominio en su biofilm, que en su crecimiento planctónico.

IV. MATERIAL Y MÉTODO:

A. Diseño de estudio:

Este es un estudio experimental básico, prospectivo, analítico

B. Población, muestra y muestreo:

La población a trabajar es *Pseudomona aeruginosa* multirresistente, incluyendo su crecimiento planctónico y formación de biofilm.

Se trabajó con 2 cepas control, ATCC®- 27853 (sensible a: amikacina, colistina, gentamicina, polimixina B, y a tobramicina [34]) y ATCC®-10145 (cepa sensible, usada para el control de pruebas con colorantes [35], por lo cual fue seleccionada), y 5 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes, AO-501, AO-502, AO-520, AO-523 y AO-511, elegidas al azar.

Estudio de susceptibilidad en sistema automatizado (Vitek®) de las cinco cepas de *Ps. aeruginosa* multirresistentes (PAMR) trabajadas; nos refiere la resistencia que traen las cepas de su lugar de origen.

Antimicrobiano	AO-501	AO-502	AO-520	AO-523	AO-511
Amicacina	R	R	R	S	R
Aztreonam	-	-	-	S	R
Cefepima	-	-	-	S	R
Ceftazidima	R	R	R	I	R

Ciprofloxacina	R	R	R	R	R
Colistina	-	-	-	S	S
Gentamicina	R	R	R	R	R
Imipenem	R	R	R	R	R
Levofloxacina	R	R	R	R	R
Meropenem	R	R	R	R	R
Norfloxacina	R	R	R	-	-
Piperacilina/ Tazobactam	I	R	R	I	R
Tobramicina	R	R	R	R	R

S: sensible. R: resistente. I: intermedio. -: no probado.

C. Variables y definición operacional de variables:

Planteamos como variable independiente el efecto de la ciprofloxacina, la evaluamos según la variación de la densidad óptica, con el objetivo de ver si presenta o no crecimiento; por lo tanto, es una variable de tipo cuantitativa, escala nominal y usamos como indicador la absorbancia.

Trabajamos dos variables dependientes, la formación de biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* y el crecimiento planctónico de dicha bacteria, ambas variables fueron evaluadas según el aumento del valor del recuento con respecto al obtenido en el tiempo cero; de igual manera, son de tipo cuantitativa, escala nominal, las medimos según la absorbancia y su índice fue no crece/crece.

D. Procedimientos y Técnicas:

Obtención de las cepas microbianas

Las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* a considerar en el presente trabajo, fueron obtenidas del cepario del Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología del Departamento de Ciencias de la Facultad de Ciencias de la Salud de UPAO. Se trabajó con dos cepas control de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-27853 y ATCC-10145, las cuales nos sirven como material de referencia para el control de la experiencia; y cinco cepas multirresistentes (AO-501; AO-502; AO-520; AO-523 y AO-511).

Reactivación de las Cepas

Las cepas propuestas, fueron conservadas en crioviales a -80°C , a partir de las cuales se procedió a su descongelación de forma gradual, primero colocando los viales a 4°C durante aproximadamente 4-6 horas, luego a temperatura ambiente por 2 horas; y por último, incubados a 37°C por cuatro horas. Las comprobaciones fenotípicas se realizaron mediante coloración Gram, crecimiento en Agar Cetrimide, y agar TSI.

Preparación de Placas Master

A partir de los cultivos en agar cetrimide, las cepas fueron sembradas en agar nutritivo (03 placas), las cuales se constituyeron en nuestras placas master.

Obtención de viales Criogénicos

Con el propósito de almacenar nuevamente cada una de las cepas retiradas, se realizó un overnigth de cada una (cultivo de noche) por 18 hrs. a 37°C en continua agitación, a razón de 180 rpm. Pasado ese tiempo, los cultivos en fase estacionaria fueron resuspendidos en caldo LB fresco, en una proporción de 1:4 hasta alcanzar una $DO_{\lambda=570nm}$ de 0.8. La suspensión bacteriana se mezcló con glicerol estéril, hasta alcanzar una concentración final del 10% de glicerol. El contenido de los tubos de ensayo se agitó vigorosamente en vórtex y se distribuyó en viales estériles de 2 mL para su almacenamiento final a -80°C.

Preparación de la solución Stock de Ciprofloxacina:

Se preparó una solución Stock de ciprofloxacina a 1024 µg/mL, para ello se pesó y disolvió el antibiótico en agua bidestilada. Posteriormente, se esterilizó empleando papel filtro de nitrocelulosa (millipore) con un tamaño de poro de 0.45 µm. Se almacenó a -80°C.

De la solución stock, se efectuaron diluciones de trabajo. Para el presente trabajo consideramos las siguientes concentraciones: 0,25 µg/ml; 0,5 µg/ml; 1 µg/ml; 2 µg/ml; 4 µg/ml; 8 µg/ml; 16 µg/ml; 32 µg/ml; 64 µg/m; 128 µg/mL; 256 µg/mL y 512 µg/mL. Estos viales regularmente serán conservados a -4°C.

Prueba de Concentración Mínima Inhibitoria:

La prueba se realizó mediante la técnica de microdilución en placa (placa de 96 pocillos), se añadieron 100 µL de caldo LB con cultivo y 100 µL de ciprofloxacina doble concentrado, para contrarrestar la dilución; se dejó reposar por 24 horas y se realizaron lecturas por espectrofotometría a una longitud de onda de 570 nm.

Obtención de Biofilms de *Pseudomonas aeruginosa*

Para ello utilizamos cultivos bacterianos suspendidos en caldo LB, los cuales fueron incubados en microplaca y sometidos a diferentes tiempos de incubación para favorecer la formación de biofilms (0 hr., 1 hr., 2 hr., 4 hr., 12 hr., 24 hr. y 48 hr.).

Al término de cada tratamiento, fueron enjuagados los pocillos en agua destilada y teñidos con cristal violeta al 1%, por un tiempo de 15 min. (método de Christensen) ^[29,30] (Anexo 4) Terminado ese procedimiento, se volvió a enjuagar los pocillos con agua destilada, se adicionó etanol al 96° a cada pocillo por un tiempo de 20 minutos, con el objetivo de decolorar. Finalmente se realizaron lecturas por espectrofotometría a una longitud de onda de 570nm. ^[30] Cada uno de los ensayos se efectuó por triplicado.

Evaluación del crecimiento planctónico:

Para la obtención de estos resultados, se construyó una curva patrón mediante la técnica de microdilución en placa, mediante lectura por espectrofotometría; de tal manera que en adelante las estimaciones se realizaron directamente sobre los pocillos de la microplaca, midiendo la densidad óptica a las 0 hr., 1 hr., 2 hr., 4 hr., 12 hr., 24 hr. y 48 hr.

Evaluación de crecimiento planctónico y formación de biofilm vs. Ciprofloxacina

De cada una de las cepas ensayadas se obtuvieron ON, de los cuales se vertieron 200µL en pocillos de microplaca e incubados por 12-24 horas.

Para la evaluación del crecimiento planctónico se tomaron 100 µL de tres pocillos y depositados en nuevos pocillos sobre los cuales se adicionó 100 µL de ciprofloxacina doble concentrado, hasta alcanzar la CMI de cada una de las cepas.

Los tres pocillos iniciales sirvieron para la evaluación de biofilms, los cuales son teñidos con el tratamiento con cristal violeta (método de Christensen). Las lecturas se realizaron a las 0; 2; 4 y 6 horas después de haber colocado el antibiótico.

E. Aspectos éticos:

Este proyecto es un ensayo *in-vitro*, por lo tanto, no representa riesgo para la salud pública; salvo para el personal de investigación que debieron adoptar las debidas medidas de bioseguridad. Aun así, se contó con autorización del comité de Bioética.

V. RESULTADOS:

ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE LAS SIETE CEPAS ENSAYADAS:

Para cada una de las cepas ensayadas se estimó la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC), considerando como tal, el primer punto mínimo de inflexión de la curva de crecimiento. Los resultados obtenidos fueron bastante variables, donde las cepas control mostraron gran sensibilidad a la ciprofloxacina en comparación a las cepas de PAMR, a excepción de la cepa AO-523 (Susceptible) según Tabla 1.

Tabla 1: Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de las cinco cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente frente a la ciprofloxacina.

Cepa	MIC ($\mu\text{g/mL}$)
ATCC-27853	[0.25]
ATCC-10145	[0.25]
AO-523	[0.25]
AO-520	[0.5]
AO-511	[8]
AO-501	[16]
AO-502	[32]

Fuente: Elaboración propia.

DETERMINACIÓN DE LA HORA MÁXIMA DE CRECIMIENTO PLANCTÓNICO Y FORMACIÓN DE BIOFILM SEGÚN SU CURVA DE CRECIMIENTO.

En la determinación del crecimiento planctónico máximo, fue consecuencia de lecturas sucesivas en microplaca, considerando el primer punto máximo de inflexión de la curva de crecimiento; donde se hizo evidente que el máximo desarrollo de crecimiento planctónico de las cepas PAMR sucedió a las 12 y 24 horas. Y, su máxima formación de biofilm fue a las 4, 12 o 24 horas dependiendo de cada cepa. (Tabla 2)

Tabla 2: Determinación de la hora máxima de crecimiento planctónico y formación de biofilm de las siete cepas de *Pseudomonas aeruginosa* trabajadas.

Cepa	Hora de máximo crecimiento planctónico	Hora máxima de formación de Biofilm
ATCC-27853	12 horas	4 horas
ATCC-10145	12 horas	4 horas
AO-523	24 horas	12 horas
AO-520	12 horas	12 horas
AO-511	12 horas	12 horas
AO-501	24 horas	4 horas
AO-502	24 horas	48 horas

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 3: Similitud o diferencia del ritmo de crecimiento planctónico y formación de biofilm entre las cepas control y las PAMR.

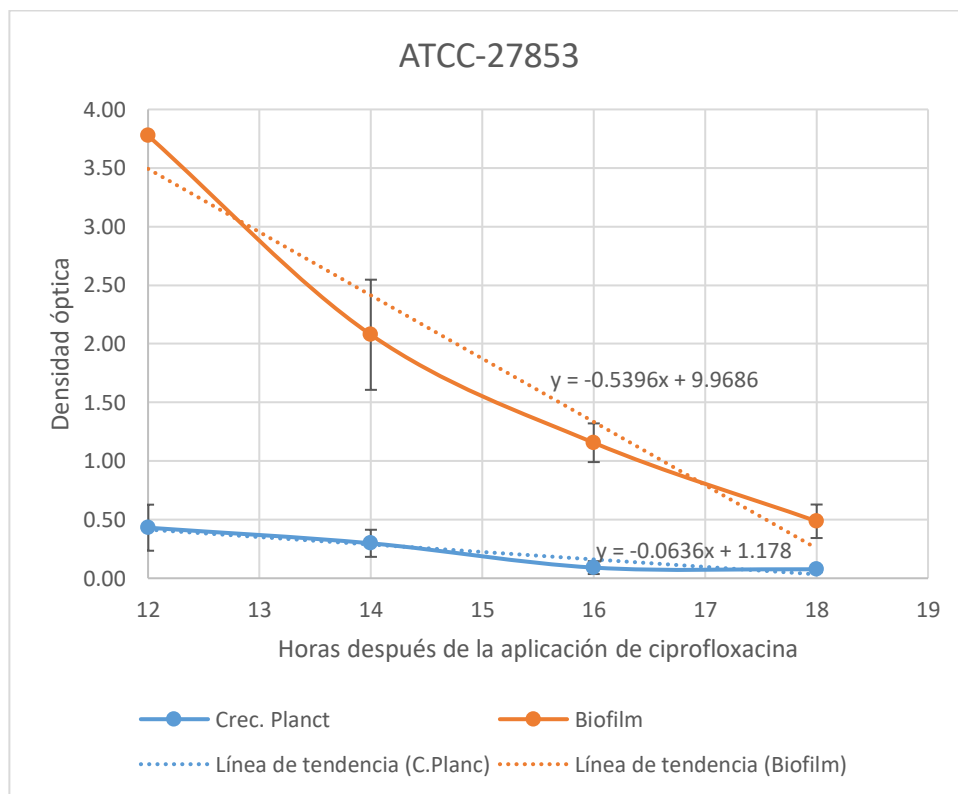
	Cepas Control	Cepas PAMR				
	ATCC	AO-523	AO-520	AO-511	AO-501	AO-502
Crecimiento	27853	105.24>2.24	1297.85>0.123	727.93>0.097	-277.07<2.26	1747.19>2.26
Planctónico	10145	353.7>0.00944	-226.9<2.31	-26.4<2.31	312.94>0.0102	518.8>0.0066
Formación de Biofilm	27853	260.18>2.36	148.404>2.36	-93.83<2.36	3.58>0.028	445.34>0.016
	10145	186.18>2.36	137.21>2.36	2.36> -97.25	0.59>0.018	284.88>0.00019

Se muestran los resultados del análisis estadístico realizado para comparar las tasas de crecimiento planctónico y formación de biofilm de las cepas PAMR frente a las cepas control. Observamos cuadros coloreados con celeste, los cuales indican que se encontró que dichas cepas son diferentes estadísticamente, lo que nos da a entender que presentan comportamientos distintos. Por lo contrario, los recuadros no coloreados son los que representan cepas con un comportamiento similar estadísticamente a los controles.

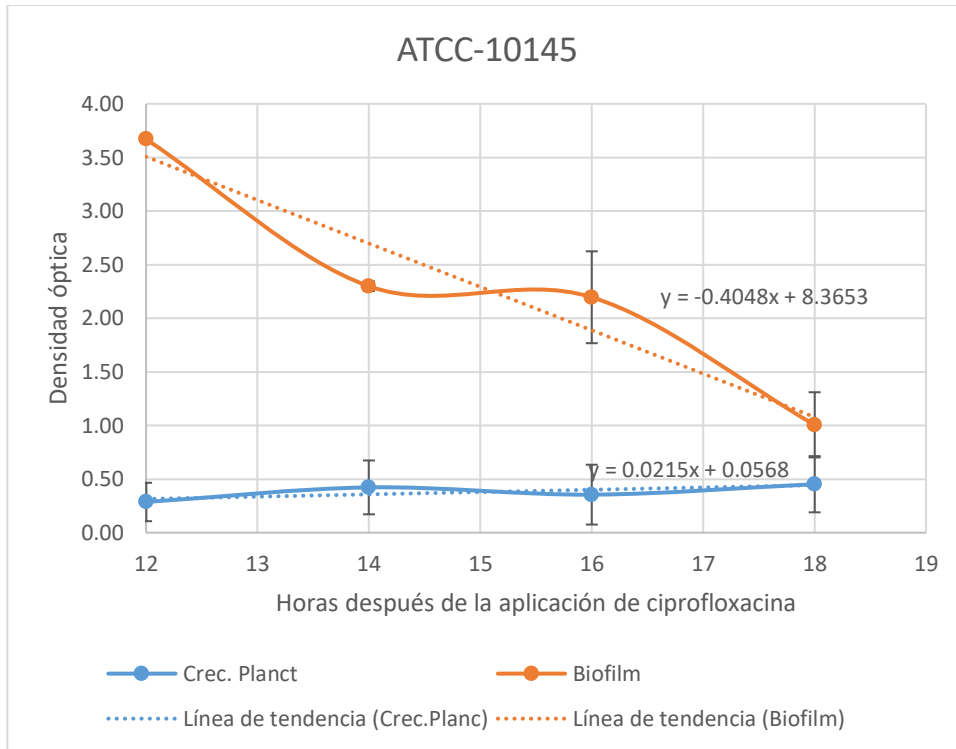
Por lo tanto; para el crecimiento planctónico, las cepas AO-520 y AO-511 presentaron similitud a la cepa control ATCC-10145; mientras que la cepa AO-501, mostró similar comportamiento frente a la cepa ATCC-27853. De otro lado; para la formación de biofilms, la cepa AO-511 fue similar a los dos controles (ATCC-27853 y ATCC-10145).

COMPARACIÓN DEL EFECTO DE LA CIPROFLOXACINA, EN EL CRECIMIENTO PLANCTÓNICO Y FORMACIÓN DE BIOFILM SOBRE LAS CEPAS ENSAYADAS.

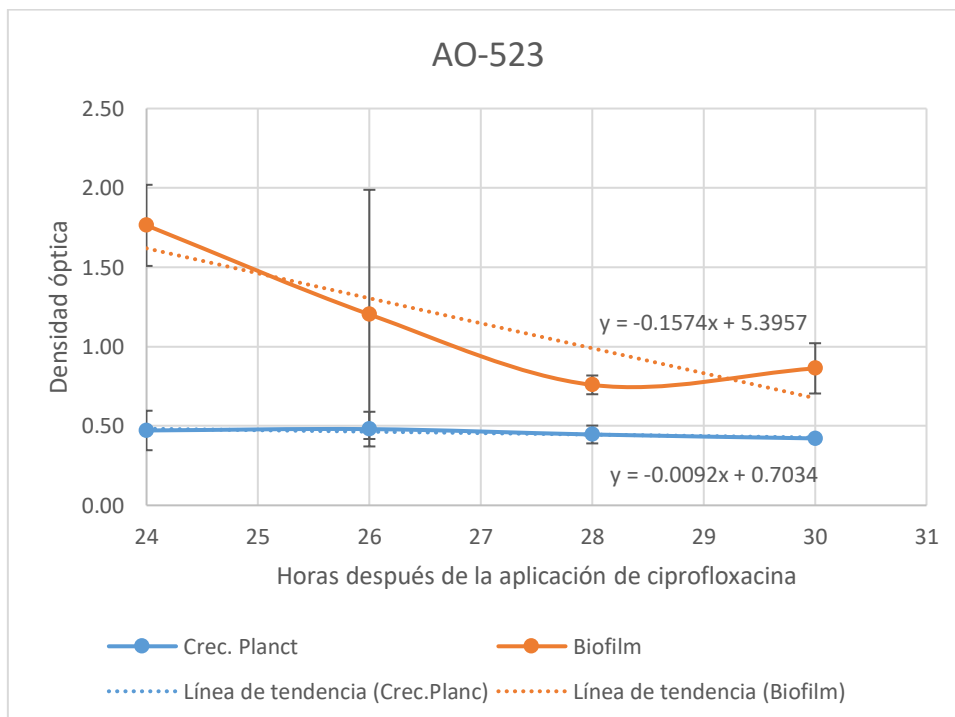
Encontramos que todas las cepas ensayadas, tanto en su crecimiento planctónico como en el desarrollo de biofilm, se ven afectadas como consecuencia de la exposición a la ciprofloxacina. Evidenciando descensos de las curvas de células planctónicas, como la reducción de biofilms de dichas cepas. (Gráficos 1-7)



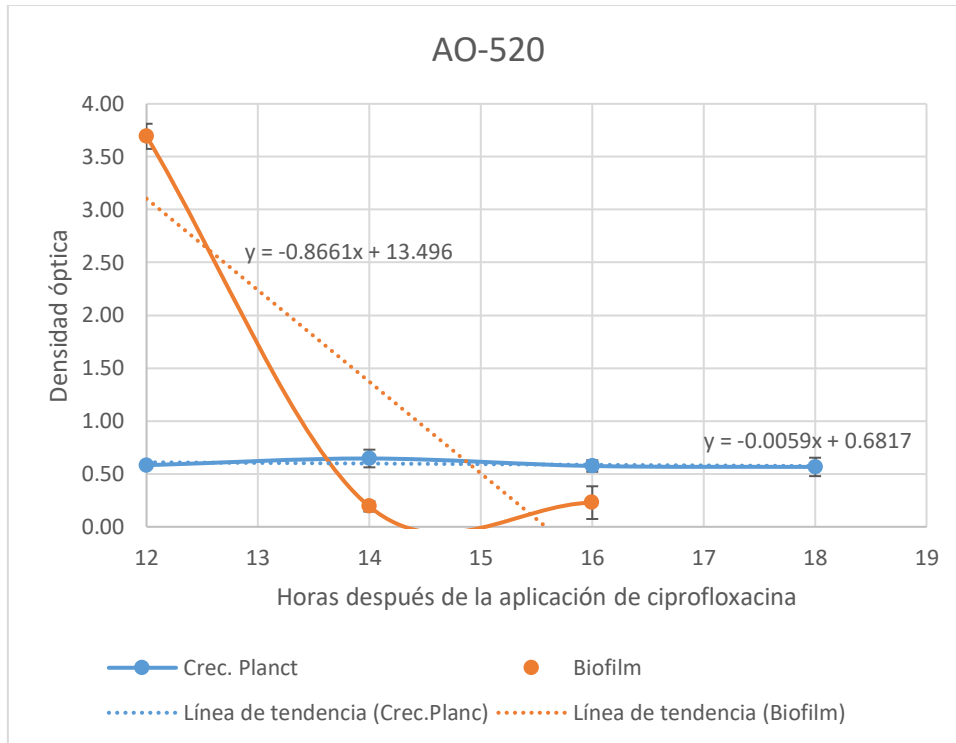
Gráfica 1: Efecto de la ciprofloxacina en la cepa ATCC-27853 de *Pseudomonas aeruginosa*.



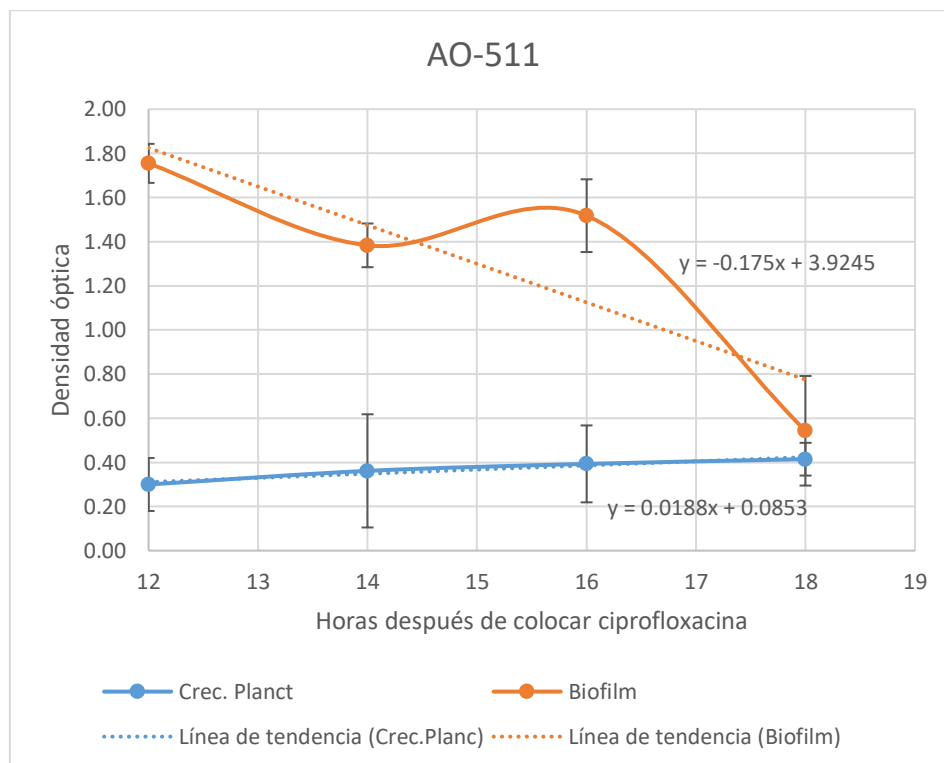
Gráfica 2: Efecto de la ciprofloxacina en la cepa ATCC-10145 de *Pseudomonas aeruginosa*.



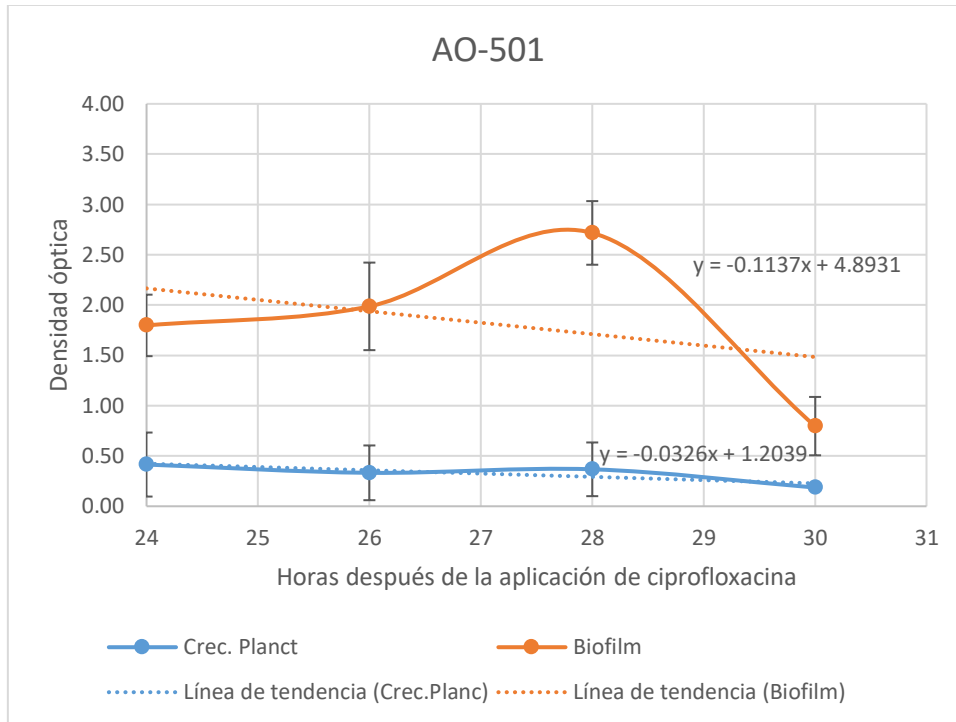
Gráfica 3: Efecto de la ciprofloxacina en la cepa AO-523 de *Pseudomonas aeruginosa*.



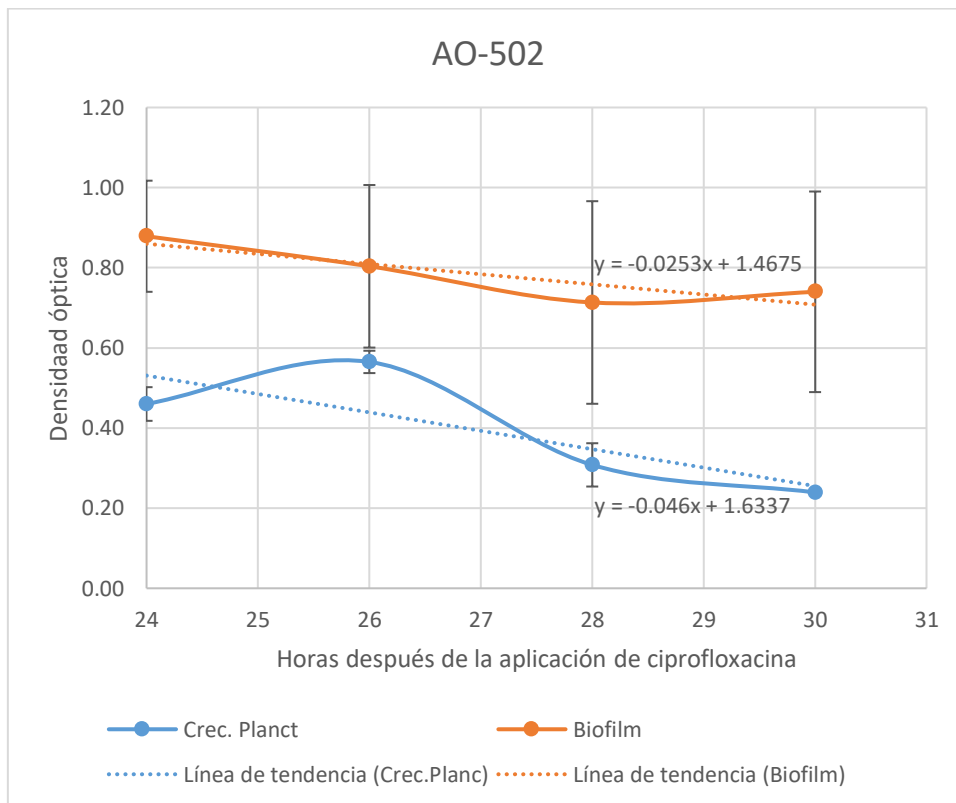
Gráfica 4: Efecto de la ciprofloxacina en la cepa AO-520 de *Pseudomonas aeruginosa*.



Gráfica 5: Efecto de la ciprofloxacina en la cepa AO-511 de *Pseudomonas aeruginosa*.



Gráfica 6: Efecto de la ciprofloxacina en la cepa AO-501 de *Pseudomonas aeruginosa*.



Gráfica 7: Efecto de la ciprofloxacina en la cepa AO-502 de *Pseudomonas aeruginosa*.

Al realizar el análisis estadístico (Prueba T de student) de los valores obtenidos a las 0, 2, 4 y 6 horas de exposición a la ciprofloxacina, entre la cinética de muerte bacteriana y la disminución de biofilms, observamos la existencia de diferencias significativas entre ambas variables, tal como observamos en la Tabla 4. (Anexo 6)

Tabla 4: Valores de la prueba T de student, en el establecimiento de diferencias entre muerte de células en estado planctónico y reducción de biofilms

Tiempo (horas) de exposición a ciprofloxacina, a partir del pico máximo de crecimiento bacteriano.	0	2	4	6
Valor de p	0.004	0.016	0.029	0.036

(*) Donde $p < 0.05$

Así mismo; se efectuó el análisis estadístico para cada variable de estudio; es decir, realizando un ensayo T donde se evaluaron las pendientes de muerte bacteriana y la disminución del biofilms. En ese sentido; observando la Tabla 5, se deduce que la muerte bacteriana de células en estado planctónico, presentan una mortalidad muy similar frente a la cepa control ATCC-27853, a excepción de la cepa AO-502; y de otro lado, se evidencia diferencias significativas en su gran mayoría frente a la cepa ATCC-10145, salvo la cepa AO-502. De otro lado; en la reducción de biofilms por efecto de la ciprofloxacina, los resultados muestran que la cinética se acentúa en la cepa AO-501, frente a ambas cepas control.

Tabla 5: Análisis estadístico a través de la prueba T, de las pendientes de muerte bacteriana en crecimiento planctónico y disminución de biofilms, frente al tratamiento con ciprofloxacina.

	Cepas Control	Cepas PAMR				
	ATCC	AO-523	AO-520	AO-511	AO-501	AO-502
Muerte de células Planctónicas	27853	-13840<0.0013	-14414<2.45	-20964<0.001	-7259<2.45	3048>2.45
	10145	8744>0.0017	7629>2.45	769>0.0012	13918>2.45	-12280<2.45
Disminución de Biofilm	27853	-2499<2.45	-92<2.57	-1880<2.45	1342>2.45	-3397<0.00002
	10145	-1563<2.45	-130<2.57	-1159<2.45	909>2.45	-2419<0.000019

Concluyendo que, tras la exposición a ciprofloxacina, los biofilms fueron los más afectados y presentaron mayor caída en sus pendientes; lo cual coincide con la hipótesis nula de este estudio.

VI. DISCUSIÓN:

Nealson, en 1979, describió un sistema de comunicación intercelular bacteriano, el cual fue denominado como “*quorum sensig*” (QS) por Fuqua en 1994. Actualmente, se sabe que dicho sistema regula diversos procesos fisiológicos en bacterias, levaduras y hongos filamentosos. Dichos procesos regulados por QS permiten en bacterias el desplazamiento, colonización, producción de factores de virulencia y formación de biofilm; el cual, es una comunidad compleja de microorganismos que habitan diversas superficies vivas o inertes, en las cuales podemos encontrar una o múltiples especies. [7,31]

En materiales y métodos se presentaron los resultados de susceptibilidad original de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes; posteriormente se determinó la MIC para cada una de ellas y encontramos una diferencia, pues observamos que la cepa AO-523 presentó sensibilidad a dosis bajas de ciprofloxacina como se muestra en la Tabla 1.

Ortega y Cerón describen que *P. aeruginosa* es una bacteria gran formadora de biofilm, ya que su ECM está compuesta, es su mayoría, por carbohidratos. [5] En la Tabla 2, al determinar la hora máxima de crecimiento plantónico y formación de biofilm, encontramos que a mayor

valor de MIC, más demoraron en llegar al punto máximo de formación de biofilm.

Por último, al comparar las curvas de crecimiento planctónico y formación de biofilm tras la exposición a los efectos de la ciprofloxacina, hallamos mayor declive en la formación de biofilm; por lo que se dedujo que dicho antibiótico generó mayor efecto en la formación de biofilm (Gráficas 1-7). Lo cual es opuesto a lo mencionado por Neupane y su equipo; quienes afirmaron que el biofilm puede ser hasta mil veces más resistente que la forma planctónica de una bacteria.^[6] Así mismo, Ortega y Cedrón, hicieron un estudio donde mostraron que el biofilm de *E. coli* y de *P. aeruginosa* presentaron mayor resistencia a ciprofloxacina que su forma planctónica.^[5]

La ciprofloxacina inhibe la replicación de *Pseudomonas aeruginosa*, al interactuar con la enzima DNA Girasa, además, al encontrarse en altas concentraciones es capaz de desintegrar las membranas celulares ya que genera un aumento de la hidrofobicidad celular y la lisis celular.^[1] Como se mencionó anteriormente, el biofilm está rodeado por una matriz extracelular (ECM), la cual está compuesta por exopolisacáridos (EPS), DNA extracelular, RNA, proteínas y lípidos. ^[7,8] Por lo tanto, planteamos que, cuando la ciprofloxacina interactúa con la DNA girasa del DNA extracelular de la ECM, genera inhibición de la replicación del DNA, debilitando la ECM y disminuyendo la formación de biofilm.

VII. CONCLUSIONES:

1. La MIC para cada cepa de estudio, demostró que las cepas control y la AO-523 mostraron ser sensibles a la ciprofloxacina, y cuatro cepas PAMR presentaron resistencia, ya que su MIC fue mayor a las sensibles.
2. Las cepas PAMR tardaron entre 12 y 24 horas en llegar a su punto máximo de crecimiento planctónico; donde las cepas AO-520 y AO-511 presentaron un ritmo de crecimiento similar a la cepa control ATCC-10145; mientras que la cepa AO-501, mostró similar comportamiento frente a la cepa ATCC-27853.
3. De otro lado; la formación de biofilms por parte de las cepas de PAMR alcanzaron su máxima desarrollo entre las 12 y 48 horas, siendo la cepa AO-511 la que lo generó con mayor prontitud, de manera estadísticamente significativa a los dos controles (ATCC-27853 y ATCC-10145).
4. Tras exponer las células bacterianas en estado planctónico y formación de biofilm, a la ciprofloxacina; el análisis estadístico arrojó que existe mayor efecto del antibiótico en la disminución de biofilms.

VIII. RECOMENDACIONES:

- Se recomienda ahondar los estudios que orientan el uso de la ciprofloxacina para reducir biofilms de *Pseudomonas aeruginosa*.
- Se alienta el desarrollo de nuevos estudios para determinar por qué las cepas sensibles desarrollan biofilm con mayor prontitud.
- Es importante realizar más investigaciones sobre biofilm.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Álvarez D, Garza G, Vázquez R. Quinolonas. Perspectivas actuales y mecanismos de resistencia. Rev Chilena Infectol 2015; 32 (5): 499-504.
2. Pallecchi L, et al. Quinolone resistance in absence of selective pressure: the experience of very remote community in the Amazon Forest. PLoS Negl Trop Dis 2012; 6(8): e1790.
3. Segreti J, Jones R, Bertino J. Challenges in assessing microbial susceptibility and predicting clinical response to newer-generation fluoroquinolones. J Ocul Pharmacol Ther 2012; 21(1): 3-11
4. Shaw P, Ganey P, Roth R. Idiosyncratic drug-induced liver injury and the role of inflammatory stress with an emphasis on an animal model of trovafloxacin hepatotoxicity. Toxicol Sci 2012; 118 (1): 7-18.
5. Ortega S, Cerón G. Producción de biopelículas y resistencia antimicrobiana en uropatógenos aislados de catéteres urinarios en un hospital de rehabilitación física. 2017; 6(3): 115-121.
6. Neupane S, Pant ND, Khatiwada S, Chaudhary R, Banjara MR. Correlation between biofilm formation and resistance toward different commonly used antibiotics along with extended spectrum beta lactamase production in uropathogenic Escherichia coli isolated from the patients suspected of urinary tract infections visiting Shree Birendra Hospital, Chhauni, Kathmandu, Nepal. Antimicrob Resist Infect Control. 2016; 5:5.
7. Lee K, Yoon S. Pseudomonas aeruginosa Biofilm, a programmed bacterial life for fitness. J. Microbiol. Biotechnol. 2017;27(6)1053-1064.
8. Wei Q, Ma LZ. Biofilm matrix and its regulation in Pseudomonas aeruginosa. Int. J. Mol. Sci. 2013; 14: 20983-21005.
9. Otani S, et al. Sub-minimum inhibitory concentrations of ceftazidime inhibit Pseudomonas aeruginosa biofilm formation. J Inect Chemother. 2018;1-6.
10. Macià M, Pozo J, Díez M, Guinea J. Diagnóstico microbiológico de las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2017.
11. Gómez J, et al. Actividad *in-vitro* de fosfomicina, sola o en combinaciones, frente a aislamientos clínicos de Pseudomonas aeruginosa resistente a carbapenémicos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2015.
12. Pang Z, et al. Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: mechanisms and alternative therapeutic strategies. Biotech Adv. 2018; 11:1-16.
13. Barbier, F., Andremont, A., Wolff, M., Bouadma, L. Hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia: recent advances in epidemiology and management. Curr Opin Pulm Med. 2013; 19, 216–228.
14. Bjarnsholt T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. APMIS Suppl. 2013;136:1-51
15. Rieber N, Brand A, Hector A, Graepler-Mainka U, Ost M, Schafer I, et al. 2013. Flagellin induces myeloid-derived suppressor cells:

- implications for *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis lung disease. *J. Immunol.* 190:1276-1284.
16. Tolker-Nielsen T. Biofilm development. *Microbiol. Spectr.* 2015; 3: MB-0001-2014.
 17. Ramachandran G. Gram-positive and gram-negative bacterial toxins in sepsis: a brief review. *Virulence.* 2014; 5: 213-218
 18. Sharma G, Rao S, Bansal A, Dang S, Gupta S, Gabrani R. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: potential therapeutic targets. *Biologicals* 2014; 42: 1-7.
 19. Chen M, Yu Q, Sun H. Novel strategies for the prevention and treatment of biofilm related infections. *Int. J. Mol. Sci.* 2013; 14: 18488-18501.
 20. Tolker-Nielsen T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: from molecular biofilm biology to new treatment possibilities. *APMIS Suppl.* 2014; 122: 1-51.
 21. Gellatly SL, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog. Dis.* 2013; 67: 159-173.
 22. Munita J, Arias C. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol Spectr.* 2016;4.
 23. Kim S, Lee J. Biofilm dispersión in *Pseudomona aeruginosa*. *J. Microbiol.* 2016; 54:71-85
 24. Fullagar J, et al. Antagonism of a zinc metalloprotease using a unique metal-chelating scaffold: tropolones as inhibitors of *P. aeruginosa* elastase. 2013. *Chem. Commun. (Camb.)*. 49: 3197-3199.
 25. Oglesby-Sherrouse AG, Djapgne L, Nguyen AT, Vasil AI, Vasil ML. The complex interplay of iron, biofilm formation, and mucoidy affecting antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. 2014 *Pathog. Dis.* 70: 307-320.
 26. Macià M, Rojo-Molinero E, Oliver A. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm growing bacteria. *Clin Microbiol Infect.* 2014; 20:981-90.
 27. Malone M, et al. Approaches to biofilm- associate infections: the need for standardized and relevant biofilm methods for clinical applications. *Expert Rev Antiinfect Ther.* 2016; 15: 147-56.
 28. Høiby N, et al. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014 ESCMID Study Group for Biofilms and Consulting External Expert Werner Zimmerli. *Clin Microbiol Infect.* 2015; 21 Suppl 1:S1–25.
 29. Christensen G, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* 1985;22:996–1006.
 30. Stepanović S, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Journal Comptlation* 2007; *APMIS* 115: 891-9.
 31. Marquina D, Santos A. Procesos biológicos regulados por *quorum sensing*. *Reduca (Biología). Serie Microbiología* 2010. 3(5):56-74.
 32. Mortensen NP, et al. Effects of sub-minimum inhibitory concentrations of ciprofloxacin on enteroaggregative *Escherichia coli* and the role of the Surface protein dispersin. *Int J Antimicrob Agents* 2011; 38:27-34.
 33. Chinchá O., Cornelio E., Valverde V., Acevedo M. Infecciones intrahospitalarias asociadas a dispositivos invasivos en unidades de

- cuidados intensivos de un hospital nacional de Lima, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2013; 30 (4): 616-20.
34. Bernal M., Guzman M. El Antibiograma de discos. Normalización de la Técnica de Kirby-Bauer. *Biomedica*. 1984; 4, N| 3 y 4: 112-121.
35. American Type Culture Collection. *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 10145™). Product Sheet. www.atcc.org

ANEXOS

Anexo 1: PANEL FOTOGRÁFICO DEL CRECIMIENTO DE LAS CEPAS TRABAJADAS

Placa con cepa ATCC-27853 de *Pseudomonas aeruginosa*.



Placa con cepa ATCC-10145 de *Pseudomonas aeruginosa*.



Placa con cepa AO-523 de *Pseudomonas aeruginosa*.



Placa con cepa AO-520 de *Pseudomonas aeruginosa*.



Placa con cepa AO-511 de *Pseudomonas aeruginosa*.



Placa con cepa AO-501 de *Pseudomonas aeruginosa*.



Placa con cepa AO-502 de *Pseudomonas aeruginosa*.



Anexo 2: DATOS ORIGINALES PARA ESTIMAR LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (MIC)

MIC de la cepa ATCC-27853 de *Pseudomonas aeruginosa*.

[$\mu\text{g/mL}$]	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Absorbancia	DESV EST
32	0.111	0.105	0.079	0.10	0.02
16	0.069	0.071	0.07	0.07	0.00
8	0.072	0.067	0.069	0.07	0.00
4	0.072	0.07	0.069	0.07	0.00
2	0.068	0.071	0.073	0.07	0.00
1	0.068	0.069	0.065	0.07	0.00
0.5	0.063	0.085	0.067	0.07	0.01
0.25	0.065	0.092	0.076	0.08	0.01
0.125	0.129	0.101	0.12	0.12	0.01

MIC de la cepa ATCC-10145 de *Pseudomonas aeruginosa*.

[$\mu\text{g/mL}$]	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Absorbancia	DESV EST
32	0.082	0.08	0.098	0.09	0.01
16	0.104	0.08	0.085	0.09	0.01
8	0.083	0.082	0.096	0.09	0.01
4	0.079	0.081	0.08	0.08	0.00
2	0.091	0.078	0.08	0.08	0.01
1	0.086	0.07	0.078	0.08	0.01
0.5	0.103	0.071	0.078	0.08	0.02
0.25	0.088	0.073	0.084	0.08	0.01
0.125	0.756	0.661	0.724	0.71	0.05

MIC de la cepa AO-523 de *Pseudomonas aeruginosa*.

[$\mu\text{g/mL}$]	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Absorbancia	DESV EST
16	0.066	0.075	0.068	0.07	0.00
8	0.065	0.081	0.062	0.07	0.01
4	0.07	0.069	0.07	0.07	0.00
2	0.067	0.066	0.068	0.07	0.00
1	0.081	0.068	0.073	0.07	0.01
0.5	0.065	0.085	0.15	0.10	0.04
0.25	0.082	0.233	0.066	0.13	0.09
0.125	0.34	0.467	0.221	0.34	0.12

MIC de la cepa AO-520 de *Pseudomonas aeruginosa*.

[µg/mL]	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Absorbancia	DESV EST
16	0.079	0.08	0.079	0.08	0.00
8	0.075	0.078	0.077	0.08	0.00
4	0.077	0.08	0.08	0.08	0.00
2	0.075	0.076	0.078	0.08	0.00
1	0.075	0.077	0.078	0.08	0.00
0.5	0.074	0.109	0.1	0.09	0.02
0.25	0.199	0.212	0.324	0.25	0.07
0.125	0.539	0.112	0.381	0.34	0.22

MIC de la cepa AO-511 de *Pseudomonas aeruginosa*.

[µg/mL]	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Absorbancia	DESV EST
16	0.232	0.63	0.497	0.45	0.20
8	0.399	0.489	0.456	0.45	0.05
4	1.084	1.023	0.953	1.02	0.07
2	0.491	1.093	1.179	0.92	0.37
1	1.159	1.214	1.222	1.20	0.03
0.5	0.521	1.207	1.245	0.99	0.41
0.25	1.204	1.247	1.231	1.23	0.02
0.125	1.181	1.238	1.234	1.22	0.03

MIC de la cepa AO-501 de *Pseudomonas aeruginosa*.

[µg/mL]	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Absorbancia	DESV EST
32	0.174	0.295	0.334	0.27	0.08
16	0.3	0.202	0.341	0.28	0.07
8	0.705	0.794	0.758	0.75	0.04
4	1.008	1.17	1.08	1.09	0.08
2	1.22	1.23	1.207	1.22	0.01
1	1.172	1.286	1.193	1.22	0.06
0.5	0.952	1.107	0.962	1.01	0.09
0.25	1.195	1.2	1.237	1.21	0.02
0.125	1.259	1.183	1.237	1.23	0.04

MIC de la cepa AO-502 de *Pseudomonas aeruginosa*.

[µg/mL]	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Absorbancia	DESV EST
32	0.136	0.123	0.127	0.13	0.01
16	0.249	0.207	0.268	0.24	0.03
8	0.252	0.303	0.331	0.30	0.04
4	0.301	0.395	0.37	0.36	0.05
2	0.458	0.434	0.537	0.48	0.05
1	0.505	0.616	0.484	0.54	0.07
0.5	0.538	0.635	0.604	0.59	0.05
0.25	0.561	0.555	0.391	0.50	0.10
0.125	0.52	0.593	0.594	0.57	0.04

Anexo 3: DATOS ORIGINALES DE LA DETERMINACIÓN DE LA HORA MÁXIMA DE CRECIMIENTO PLANCTÓNICO Y FORMACIÓN DE BIOFILM.

Crecimiento planctónico de la cepa ATCC-27853 de *Pseudomonas aeruginosa*

Horas	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Crec. Planct	Desv. Est.
0	0.127	0.139	0.141	0.14	0.01
1	0.121	0.114	0.114	0.12	0.00
2	0.132	0.142	0.184	0.15	0.03
4	0.26	0.28	0.223	0.25	0.03
12	0.451	0.524	0.516	0.50	0.04
24	0.673	0.484	0.269	0.48	0.20
48	0.337	0.527	0.262	0.38	0.14

Formación de biofilm de la cepa ATCC-27853 de *Pseudomonas aeruginosa*.

Horas	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Biofilm	Desv. Est.
0	0.933	1.331	*	1.13	0.28
1	1.963	1.828	2.073	1.95	0.12
2	3.272	2.896	3.395	3.19	0.26
4	3.664	3.789	3.731	3.73	0.06
12	3.77	3.785	3.791	3.78	0.01
24	3.721	3.807	3.651	3.73	0.08
48	3.86	3.986	3.784	3.88	0.10

Crecimiento planctónico de la cepa ATCC-10145 de *Pseudomonas aeruginosa*.

Horas	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Crec. Planct	Desv. Est.
0	0.167	0.164	0.163	0.16	0.00
1	0.131	0.132	0.12	0.13	0.01
2	0.132	0.133	0.136	0.13	0.00
4	0.148	0.164	0.153	0.16	0.01
12	0.699	0.727	0.74	0.72	0.02
24	0.724	0.82	0.706	0.75	0.06
48	*	0.518	0.636	0.58	0.08

Formación de biofilm de la cepa ATCC-10145 de *Pseudomonas aeruginosa*.

Horas	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Biofilm	Desv. Est.
0	0.537	0.581	0.5	0.54	0.04
1	2.395	2.361	2.3	2.35	0.05
2	2.3	2.053	2.243	2.20	0.13
4	3.614	3.779	3.744	3.71	0.09
12	3.712	3.598	3.744	3.68	0.08
24	3.619	3.7	3.808	3.71	0.09
48	3.793	3.8	3.728	3.77	0.04

Crecimiento planctónico de la cepa AO-523 de *Pseudomonas aeruginosa*.

Horas	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Crec. Planct	Desv. Est.
0	0.153	0.155	0.161	0.16	0.00
1	0.159	0.135	0.149	0.15	0.01
2	0.156	0.2	0.18	0.18	0.02
4	0.313	0.288	0.37	0.32	0.04
12	0.311	0.774	0.26	0.45	0.28
24	0.942	0.941	0.89	0.92	0.03
48	0.767	0.684	0.632	0.69	0.07

Formación de biofilm de la cepa AO-523 de *Pseudomonas aeruginosa*.

Horas	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Biofilm	Desv. Est.
0	0.391	0.391	0.4	0.39	0.01
1	1.27	1.384	1.376	1.34	0.06

2	1.375	1.32	1.494	1.40	0.09
4	1.804	*	1.239	1.52	0.40
12	3.805	3.826	3.704	3.78	0.07
24	*	3.097	3.67	3.38	0.41
48	3.905	3.606	3.645	3.72	0.16

Crecimiento planctónico de la cepa AO-520 de *Pseudomonas aeruginosa*.

Horas	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Crec Planct	Desv. Est.
0	0.137	0.143	0.137	0.14	0.00
1	0.125	0.124	0.121	0.12	0.00
2	0.13	0.127	0.122	0.13	0.00
4	0.313	0.36	0.419	0.36	0.05
12	*	0.886	0.821	0.85	0.05
24	0.878	0.756	1.13	0.92	0.19
48	0.921	0.812	0.928	0.89	0.07

Formación de biofilm de la cepa AO-520 de *Pseudomonas aeruginosa*.

Horas	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Biofilm	Desv. Est.
0	0.659	0.686	0.719	0.69	0.03
1	0.981	1.106	1.084	1.06	0.07
2	1.8	1.492	1.79	1.69	0.18
4	3.134	2.732	*	2.93	0.28
12	*	3.904	3.898	3.90	0.00
24	3.84	3.702	3.747	3.76	0.07
48	3.797	3.399	*	3.60	0.28

Crecimiento planctónico de la cepa AO-511 de *Pseudomonas aeruginosa*.

Horas	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Crec. Planct	Desv. Est.
0	0.154	0.147	0.137	0.15	0.01
1	0.139	0.132	0.139	0.14	0.00
2	0.139	0.147	0.156	0.15	0.01
4	0.214	0.203	0.203	0.21	0.01
12	0.679	0.764	0.765	0.74	0.05
24	0.868	0.666	0.949	0.83	0.15
48	0.701	0.72	0.83	0.75	0.07

Formación de biofilm de la cepa AO-511 de *Pseudomonas aeruginosa*.

Horas	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Biofilm	Desv. Est.
0	1.012	1.299	1.009	1.11	0.17
1	0.935	0.909	1	0.95	0.05
2	1.953	1.688	1.926	1.86	0.15
4	3.489	3.671	2.997	3.39	0.35
12	*	3.763	3.76	3.76	0.00
24	3.685	3.696	3.35	3.58	0.20
48	3.807	3.75	3.748	3.77	0.03

Crecimiento planctónico de la cepa AO-501 de *Pseudomonas aeruginosa*.

Horas	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Crec. Planct	Desv. Est.
0	0.135	0.15	0.158	0.15	0.01
1	0.145	0.163	0.148	0.15	0.01
2	0.154	0.16	0.151	0.16	0.00
4	0.211	0.165	0.166	0.18	0.03
12	0.576	0.579	0.593	0.58	0.01
24	0.932	0.919	0.867	0.91	0.03
48	0.86	0.874	0.587	0.77	0.16

Formación de biofilm de la cepa AO-501 de *Pseudomonas aeruginosa*.

Horas	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Biofilm	Desv. Est.
0	0.863	0.715	0.85	0.81	0.08
1	1.658	1.346	1.022	1.34	0.32
2	1.372	1.512	2.049	1.64	0.36
4	*	3.693	3.683	3.69	0.01
12	3.562	3.732	3.505	3.60	0.12
24	*	2.747	3.673	3.21	0.65
48	3.411	*	2.645	3.03	0.54

Crecimiento planctónico de la cepa AO-502 de *Pseudomonas aeruginosa*.

Horas	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Crec. Planct	Desv. Est.
0	0.148	0.153	0.147	0.15	0.00
1	0.165	0.164	0.155	0.16	0.01
2	0.184	0.182	0.181	0.18	0.00
4	0.253	0.205	0.209	0.22	0.03
12	0.338	0.32	0.319	0.33	0.01

24	*	0.648	0.783	0.72	0.10
48	0.687	0.64	*	0.66	0.03

Formación de biofilm de la cepa AO-502 de *Pseudomonas aeruginosa*.

Horas	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Biofilm	Desv. Est.
0	0.543	0.606	0.568	0.57	0.03
1	0.465	*	0.606	0.54	0.10
2	0.779	0.609	0.694	0.69	0.09
4	*	0.931	0.803	0.87	0.09
12	1.21	1.024	0.968	1.07	0.13
24	2.08	2.135	*	2.11	0.04
48	2.688	*	2.147	2.42	0.38

*El valor fue eliminado porque era muy diferente de las otras muestras y generaba gran incremento de la desviación estándar.

Anexo 4: MÉTODO DE CHRISTENSEN.

1. Desechar el cultivo sobrenadante, sacudir el pocillo tres veces.
2. Llenar el pocillo con Cristal Violeta al 1%, dejar reposar 15 minutos.
3. Enjuagar el pocillo tres veces.
4. Llenar el pocillo con alcohol de 96°, dejar reposar 20 minutos.
5. Llevar el pocillo al espectrofotómetro, leer con una longitud de onda de 570nm.

Anexo 5: DATOS ORIGINALES EN LA EVALUACIÓN DE EFECTOS DE LA CIPROFLOXACINA EN CADA CEPA

Efectos de la ciprofloxacina en el crecimiento planctónico de la cepa ATCC-27853 de *Pseudomonas aeruginosa*.

Horas	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Crec. Planct	Desv. Est.
12	0.232	0.625	0.437	0.43	0.20
14	0.168	0.389	0.337	0.30	0.12
16	0.154	0.057	0.061	0.09	0.05
18	0.094	0.059	*	0.08	0.02

Efecto de la ciprofloxacina en la formación de biofilm de la cepa ATCC-27853 de *Pseudomonas aeruginosa*.

Horas	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Biofilm	Desv. Est.
12	*	3.79	3.763	3.78	0.02
14	1.809	1.803	2.62	2.08	0.47
16	1.189	0.977	1.302	1.16	0.16
18	0.587	0.385	*	0.49	0.14

Efectos de la ciprofloxacina en el crecimiento planctónico de la cepa ATCC-10145 de *Pseudomonas aeruginosa*.

Horas	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Crec. Planct	Desv. Est.
12	0.492	0.205	0.162	0.29	0.18
14	0.531	0.601	0.135	0.42	0.25
16	0.188	0.677	0.199	0.35	0.28
18	0.567	0.637	0.152	0.45	0.26

Efectos de la ciprofloxacina en la formación de biofilm de la cepa ATCC-10145 de *Pseudomonas aeruginosa*.

Horas	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Biofilm	Desv. Est.
12	3.674	*	3.667	3.67	0.00
14	2.304	2.252	2.341	2.30	0.04
16	2.51	1.708	2.37	2.20	0.43
18	1.221	0.791	*	1.01	0.30

Efectos de la ciprofloxacina en el crecimiento planctónico de la cepa AO-523 de *Pseudomonas aeruginosa*.

Horas	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Crec. Planct	Desv. Est.
24	0.392	0.615	0.408	0.47	0.12
26	0.408	0.606	0.427	0.48	0.11
28	0.404	0.425	0.51	0.45	0.06
30	0.411	0.417	0.437	0.42	0.01

Efectos de la ciprofloxacina en la formación de biofilm de la cepa AO-523 de *Pseudomonas aeruginosa*.

Horas	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Biofilm	Desv. Est.
24	1.911	1.469	1.912	1.76	0.26
26	*	1.758	0.648	1.20	0.78
28	0.816	0.698	0.763	0.76	0.06
30	0.751	0.975	*	0.86	0.16

Efectos de la ciprofloxacina en el crecimiento planctónico de la cepa AO-520 de *Pseudomonas aeruginosa*.

Horas	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Crec. Planct	Desv. Est.
12	0.582	0.579	0.586	0.58	0.00
14	*	0.587	0.705	0.65	0.08
16	0.624	0.517	0.584	0.58	0.05
18	0.664	0.497	0.538	0.57	0.09

Efectos de la ciprofloxacina en la formación de biofilm de la cepa AO-520 de *Pseudomonas aeruginosa*.

Horas	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Biofilm	Desv. Est.
12	3.609	*	3.777	3.69	0.12
14	0.245	0.18	0.151	0.19	0.05
16	0.404	0.111	0.171	0.23	0.15
18	0.127	0.13	0.125	0.13	0.00

Efectos de la ciprofloxacina en el crecimiento planctónico de la cepa AO-511 de *Pseudomonas aeruginosa*.

Horas	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Crec. Planct	Desv. Est.
12	0.299	0.18	0.42	0.30	0.12
14	0.2	0.227	0.657	0.36	0.26
16	0.369	0.232	0.578	0.39	0.17
18	0.426	0.335	0.482	0.41	0.07

Efecto de la ciprofloxacina en la formación de biofilm de la cepa AO-511 de *Pseudomonas aeruginosa*.

Horas	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Biofilm	Desv. Est.
12	1.817	1.692	*	1.75	0.09
14	1.313	1.453	*	1.38	0.10
16	*	1.401	1.634	1.52	0.16
18	0.82	0.468	0.341	0.54	0.25

Efecto de la ciprofloxacina en el crecimiento planctónico de la cepa AO-501 de *Pseudomonas aeruginosa*.

Horas	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Crec. Planct	Desv. Est.
24	0.23	0.782	0.232	0.41	0.32
26	0.132	0.642	0.223	0.33	0.27
28	0.24	0.674	0.188	0.37	0.27
30	0.182	0.19	*	0.19	0.01

Efecto de la ciprofloxacina en la formación de biofilm de la cepa AO-501 de *Pseudomonas aeruginosa*.

Horas	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Biofilm	Desv. Est.
24	1.989	1.445	1.959	1.80	0.31
26	2.464	1.612	1.885	1.99	0.44
28	3.082	2.528	2.541	2.72	0.32
30	0.462	0.977	0.951	0.80	0.29

Efecto de la ciprofloxacina en el crecimiento planctónico de la cepa AO-502 de *Pseudomonas aeruginosa*.

Horas	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Crec. Planct	Desv. Est.
24	0.43	0.442	0.508	0.46	0.04
26	0.573	0.588	0.534	0.57	0.03
28	0.306	0.363	0.255	0.31	0.05
30	0.239	0.236	0.243	0.24	0.00

Efecto de la ciprofloxacina en la formación de biofilm de la cepa AO-502 de *Pseudomonas aeruginosa*.

Horas	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Biofilm	Desv. Est.
24	0.727	0.91	0.999	0.88	0.14
26	0.906	0.935	0.57	0.80	0.20
28	0.468	0.973	0.699	0.71	0.25
30	0.563	0.917	*	0.74	0.25

(*) El valor fue eliminado por ser muy diferente a las otras muestras u generaba gran incremento de la desviación estándar.

Anexo 6: ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Prueba T e IC de dos muestras: 0 h - P; 0 h - B

Método

μ_1 : media de 0

h - P

μ_2 : media de 0

h - B

Diferencia: $\mu_1 -$

μ_2

No se presupuso igualdad de varianzas para este análisis.

Estadísticas descriptivas

Muestra	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
0 h - P	7	0,420	0,101	0,038
0 h - B	7	2,48	1,20	0,45

Estimación de la diferencia

IC de 95% para la diferencia	
-2,056	(-3,170; -0,942)

Prueba

Hipótesis nula	$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$
Hipótesis alterna	$H_1: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$
Valor	Valor
T	GL
<hr/>	<hr/>
-4,52	6
	0,004

Prueba T e IC de dos muestras: 2 h - P; 2 h - B

Método

μ_1 : media de 2 h - P

μ_2 : media de 2 h - B

Diferencia: $\mu_1 - \mu_2$

No se presupuso igualdad de varianzas para este análisis.

Estadísticas descriptivas

Muestra	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
2 h - P	7	0,444	0,130	0,049
2 h - B	7	1,420	0,762	0,29

Estimación de la diferencia

	IC de 95% para la diferencia
<hr/>	<hr/>
-0,976	(-1,690; -0,261)

Prueba

Hipótesis nula	$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$
Hipótesis alterna	$H_1: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$
Valor	Valor
T	GL
<hr/>	<hr/>
-3,34	6
	0,016

Prueba T e IC de dos muestras: 4 h - P; 4 h - B

Método

μ_1 : media de 4
 h - P
 μ_2 : media de 4
 h - B
 Diferencia: $\mu_1 - \mu_2$

No se presupuso igualdad de varianzas para este análisis.

Estadísticas descriptivas

Muestra	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
4 h - P	7	0,363	0,149	0,056
4 h - B	7	1,329	0,883	0,33

Estimación de la diferencia

IC de 95% para la diferencia	
-0,966	(-1,793; -0,138)

Prueba

Hipótesis nula	$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$
Hipótesis alterna	$H_1: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$
Valor T	Valor p
-2,85	0,029

Prueba T e IC de dos muestras: 6 h - P; 6 h - B

Método

μ_1 : media de 6
 h - P
 μ_2 : media de 6
 h - B
 Diferencia: $\mu_1 - \mu_2$

No se presupuso igualdad de varianzas para este análisis.

Estadísticas descriptivas

Muestra	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
---------	---	-------	-----------	----------------------------

6 h - P	7	0,337	0,171	0,065
6 h - B	7	0,653	0,292	0,11

Estimación de la diferencia

IC de 95%	
para	
Diferencia la diferencia	
-0,316	(-0,605; - 0,026)

Prueba

Hipótesis nula	$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$
Hipótesis alterna	$H_1: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$
Valor	Valor
T	GL
-2,47	9
	p
	0,036