

## Susceptibilidad in vitro a ciprofloxacina en biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* y poblaciones planctónicas. Estudio de corte transversal.

### Susceptibility in vitro to ciprofloxacin in biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* and planktonic stocks. Cross-sectional study.

Andrés Felipe Bolívar-Vargas<sup>1</sup>, Diana Paola López-Velandia<sup>2</sup>, Astrid M. Aguilera-Becerra<sup>2</sup>

#### RESUMEN

**Introducción:** *Los biofilms bacterianos son un grave problema en el cuidado de la salud, principalmente en las infecciones asociadas a atención en salud debido. Presentan una alta capacidad para adaptarse al entorno y a exigencias nutricionales. Además, debido a su composición y a concentraciones bajas de antibióticos, generan tolerancia que evita se inhiba su crecimiento.*

#### ABSTRACT

**Introduction:** *Bacterial biofilms are a serious problem in health care, mainly in infections associated with health care. They have a high capacity to adapt to the environment and nutritional requirements. In addition, due to its composition and low concentrations of antibiotics, it generates tolerance that prevents its growth from being inhibited.*

Historial del artículo:

Fecha de recepción: 18/10/2021

Fecha de aprobación: 20/12/2021

1 Universidad de Boyacá, Facultad de Ciencias de la Salud, Bacteriología y laboratorio clínico, Tunja, Colombia

2 Universidad de Boyacá, Facultad de Ciencias de la Salud, Tunja, Colombia.

**Autor de Correspondencia:** Astrid Maribel Aguilera Becerra. Dirección: Carrera 2ª Este No. 64-169, Tunja, Colombia. Correo electrónico: amaguilera@uniboyaca.edu.co

**Cómo citar este artículo:** Como citar este artículo: Bolívar-Vargas AF, López-Velandia DP, Aguilera-Becerra A. Susceptibilidad in vitro a ciprofloxacina en biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* y poblaciones planctónicas. Estudio de corte transversal. Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad del Cauca. 2022;24(1):28-37. <https://doi.org/10.47373/rfcs.2022.v24.2155>

**Objetivo:** Determinar la susceptibilidad a ciprofloxacina en biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* *in vitro*.

**Métodos:** Se determinó la susceptibilidad del biofilm de 7 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* pertenecientes al cepario de la Universidad de Boyacá obtenidas de muestras clínicas de origen urinario utilizando el método de microtitulación en placa.

**Resultados:** Se observó un aumento de la tolerancia en 6 cepas de las 7 analizadas, llegando a disminuir su crecimiento hasta en una concentración de 4 µg/ml en comparación con su forma planctónica que logró inhibir el crecimiento hasta una concentración de 14 µg/ml. En cuanto a la única cepa resistente en su forma planctónica, no se observaron cambios significativos.

**Conclusiones:** Uno de los biofilms analizados presentó un comportamiento diferente a ciprofloxacina probablemente debido a su genotipo, microambiente y/o a su forma de crecimiento.

**Palabras clave:** Biofilm; *Pseudomonas aeruginosa*; farmacorresistencia bacteriana; Antibiótico

**Objective:** To determine the *in vitro* susceptibility to ciprofloxacin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms.

**Methods:** The susceptibility of the biofilm of 7 strains of *Pseudomonas aeruginosa* belonging to the strain collection of the University of Boyacá obtained from clinical samples of urinary origin will be prolonged using the microtiter plate method.

**Results:** An increase in tolerance was demonstrated in 6 strains of the 7 analyzed, reaching a decrease in growth up to a concentration of 4 µg/ml compared to its planktonic form, which modified inhibit growth up to a concentration of 14 µg/ml. As for the single resistant strain in its planktonic form, no significant changes were observed.

**Conclusions:** One of the analyzed biofilms presented a different behavior to ciprofloxacin, probably due to its genotype, microenvironment and/or its growth form.

**Keywords:** Biofilm; *Pseudomonas aeruginosa*; Resistance Bacterial; antibiotic

## INTRODUCCIÓN

La *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) es un patógeno muy prevalente, virulento y difícil de tratar en infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) debido a su gran adaptabilidad al entorno y a su baja exigencia nutricional. Este microorganismo tiene la capacidad de formar biofilm siendo una de sus principales funciones la protección a través de la formación de una matriz de exopolisacáridos, que actúa como un mecanismo de resistencia física a la respuesta del sistema inmune (1,2). La producción de los componentes necesarios para la adhesión y la formación de biofilm, está regulada por genes específicos (3,4), que permiten que estos crezcan sobre superficies vivas o inertes (6,7).

Dentro de los factores de virulencia que presenta *P. aeruginosa* está la cápsula de polisacáridos que gracias a su viscosidad disminuye la actividad de antibióticos como la ciprofloxacina, generando un tipo de adaptación al mismo (8,9). La formación de las biopelículas se desarrolla gracias a la presencia de exopolisacáridos, proteínas, vesículas lipídicas y ADN extracelular. El proceso inicia con las células planctónicas en el que se adhieren a una superficie utilizando el flagelo; las células se unen a la

superficie para iniciar la formación de microcolonias, en las que las células se agregan y secretan componentes de la matriz; posteriormente se produce la formación de macrocolonias para ser dispersados (10). Por tal motivo, el mecanismo de acción de los antibióticos se ve afectado y no logran difundirse dentro del biofilm lo que hace que las concentraciones no sean suficientes para crear algún efecto dentro de dicho complejo (11,12). La susceptibilidad *in vitro* actualmente revela buena sensibilidad a ciprofloxacina, sin embargo, al realizar pruebas con *P. aeruginosa* cuando desarrollan biofilm se observa poco o moderado efecto del antibiótico suministrado (13-15); lo anterior se ha asociado al incremento de la resistencia a ciprofloxacina. Actualmente hay pocos estudios al respecto y no existe un protocolo estandarizado que permita poder evaluar este mecanismo (15-17). Por tal razón, el objetivo de este estudio fue evaluar la susceptibilidad *in vitro* a ciprofloxacina en biofilms de *P. aeruginosa*.

## MÉTODOS

Se diseñó un estudio de tipo observacional, cuantitativo, descriptivo y transversal. Para la realización de esta investigación se escogieron quince cepas de *P. aeruginosa*

aisladas de origen urinario sensibles a ciprofloxacina provenientes de un estudio previo que pertenecían al cepario de la Universidad de Boyacá. De dichas cepas sólo siete cumplieron con los criterios de inclusión, correspondiente a ser cepas puras, las cuales tenían características fenotípicas similares en relación con mecanismos de resistencia, necesarias para realizar el estudio.

**Métodos de laboratorio:** Se empleó como control positivo una cepa de referencia de *P. aeruginosa* ATCC 27853. Estos aislamientos se sembraron en caldo de tripticasa de soya durante 48 horas a 37°C y se repicaron por agotamiento en agar cetridime (Oxoid®), en condiciones aerobias. Las cepas fueron codificadas con la letra P seguido del número de manera consecutiva. La formación del biofilm se analizó por el método de microtitulación en placa, en donde se indujo la formación del biofilm; se inoculó 5 ml de caldo BHI con opacidad según escala 0.5 de Mc Farland y se incubó por 48 horas, luego se realizó dilución 1:100 y se extrajeron 100 µL del cultivo diluido que fueron distribuidos en cada uno de los dos pocillos de la placa de microtitulación. La solución de antibiótico se preparó diluyendo la ciprofloxacina en agua filtrada, desionizada y estéril.

Para determinar la sensibilidad a ciprofloxacina posteriormente, fueron adicionadas en placas de fondo plano concentraciones de ciprofloxacina de 0.125 µg/mL; 0.25µg/mL; 0.5µg/mL; 1µg/mL; 2µg/mL y se midió la absorbancia de los biofilms a las 24, 48 y 72 horas de incubación.

Del cultivo en suspensión y se realizaron tres lavados con agua desionizada, se realizó tinción con Cristal Violeta al 0.1% por 20 minutos, se lavó cada pozo de la placa con 300 µL de etanol al 95% y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 620 nm.

Para la evaluación de las cepas en estado planctónico se inoculó 5ml de caldo BHI hasta obtener una escala de Mcfarland de 0.5, luego se realizó una dilución 1:100 y se inocularon las microplacas y se incubó a 27°C en agitación; se adiciono a las placas concentraciones de ciprofloxacina de 0.125 µg/mL; 0.25µg/mL; 0.5µg/mL; 1µg/mL; 2µg/mL y se midió la absorbancia 24, 48 y 72 horas de incubación a una longitud de onda de 620 nm.

Para analizar la capacidad de las cepas de *P. aeruginosa* para formar biofilm se definió un punto de corte para separar a las bacterias no formadoras de aquellas formadoras, para esto se utilizó la técnica estadística descrita por Stepanovic et al. la cual toma la densidad óptica (D.O) medida como referencia

para clasificar las cepas en no formadoras de biofilm y formadora de biofilm, débil, moderada o fuerte (15).

Para esto se definió el punto de corte (D. OC), el cual se establece como tres desviaciones estándar (SD) sobre la media de los controles negativos:  $D. OC = D. O$  media de los controles negativos +  $(3 \times SD)$  de los controles). Por lo tanto, los resultados de las cepas se clasificaron como:

- No formadora de biofilm (0): La D. O de la cepa se encuentra por debajo del punto de corte establecido ( $D. O \leq D. OC$ )
- Formadoras débiles (+): La D. O de la cepa se encuentra entre el punto de corte y el valor del doble del punto de corte ( $D. OC < D. O \leq (2 \times D. OC)$ )
- Formadoras moderadas (++) : La D. O se encuentra entre el doble del valor del punto de corte y el cuádruple del punto de corte ( $(2 \times D. OC) < D. O \leq (4 \times D. OC)$ )
- Formadores Fuertes (+++) : La D. O se encuentra por encima del cuádruple del valor del punto de corte ( $(4 \times D. OC) < D. O$ )

Los resultados se presentan de forma descriptiva.

**Consideraciones Éticas:** La investigación fue aprobada por el Comité de Bioética de la Universidad de Boyacá, en memorando B-11025 del día 25 de noviembre de 2019.

## RESULTADOS

Se determinó la formación de biofilm de *P. aeruginosa* por medio de una microtitulación en placa utilizando una tinción con Cristal violeta al 1% y a partir de la hora 24 de incubación, se observó la formación del biofilm en todas las cepas analizadas de acuerdo con los valores registrados de la densidad óptica a (D.O) a 540 nm (Tabla 1).

Los resultados indican que las bacterias codificadas como P1 y P7 presentaron mayor capacidad de adhesión, esto fue directamente proporcional al proceso de adaptación rápido de las cepas analizadas que hace que se disminuya el tiempo en el que inician a formar los biofilms; las cepas que mostraron absorbancias mayores a las 24 horas de incubación fueron las codificadas como P7 y P1, con 0.36, seguidas por las P4,P5,P3,P2 con 0.279, 0.285, 0.195 y 0.113 respectivamente; en tanto que las cepas P6 y la ATCC registraron valores bajos en absorbancia 0.0385 y 0.0285 respectivamente (Tabla 1).

**Tabla 1.** Absorbancias del crecimiento del biofilm

Cepa /hora	24 horas	48 horas	72 horas
ATCC	0.0285	0.6555	0.701
P1	0.3665	0.4715	1.202
P2	0.113	0.9995	1.508
P3	0.195	0.765	1.0035
P4	0.279	0.453	1.1405
P5	0.285	0.3505	1.1555
P6	0.0385	0.985	1.2065
P7	0.3625	0.4695	1.7265

Fuente: Autores

Los resultados de la clasificación de las cepas fueron expresados en una tabla teniendo en cuenta los tiempos de incubación (Tabla 2). Algunas cepas, como la P1, P3, P4, P5 presentaron una moderada producción de biofilms desde las 24 horas hasta las 72 horas, pero la cepa P6 presentó una fuerte producción de biofilm a las 24 horas y disminuyó a las 72 horas, ubicando a esta cepa dentro de la clasificación de moderadas productoras de biofilm, en cambio las cepas ATCC, P2 y P7 aumentaron la producción del biofilm a las 72 horas de incubación por lo que se consideraron cepas fuertemente productoras de biofilm.

**Tabla 2.** Clasificación de la formación de biofilm

CEPA	Tiempo de incubación		
	24 horas	48 horas	72 horas
ATCC	+	++	++
P1	++	++	++
P2	+	+++	+++
P3	++	++	++
P4	++	++	++
P5	++	++	++
P6	+++	+++	++
P7	++	++	+++

Fuente: autores

No productoras (0), Productoras Débiles (+), Productoras moderadas (++), Productoras fuertes (+++).

En cuanto a la susceptibilidad del biofilm de *P. aeruginosa* a ciprofloxacina se pudo observar un comportamiento diferente en cada una de las cepas con respecto al tiempo de exposición y concentración de ciprofloxacina (Figura 1). Para determinar su susceptibilidad se seleccionaron 3 concentraciones diferentes de antibióticos baja (0.125 µg/mL), media (1 µg/mL) y alta (4 µg/mL), para los tipos de cultivo planctónico y biofilm; las concentraciones fueron consideradas según estudios previos (13, 16).

En la cepa control se pudo observar que a las 24 horas las concentraciones de 2 µg/mL y 4 µg/mL de ciprofloxacina lograron inhibir el crecimiento del biofilm ya que la absorbancia es directamente proporcional al crecimiento del biofilm. A las 24 horas la cepa expuesta a concentraciones 2 µg/mL y 4 µg/mL emitieron una absorbancia menor (0.059 y 0.045) con respecto a la cepa control (0.185) logrando su mayor inhibición a las 48 horas.

En la cepa P1 las concentraciones de antibiótico 0.125 µg/mL, 0.5 µg/mL, 1 µg/mL; 2 µg/mL y 4 µg/mL lograron disminuir la formación de biofilm con respecto al control a las 24 horas; sin embargo, a las 48 horas aumentó la generación de la biopelícula, adicionalmente las concentraciones de 0.125 µg/mL, 0.5 µg/mL, 1 µg/mL del antibiótico no lograron inhibir ni retardar su crecimiento, ya que la cepa expuesta a estas concentraciones obtuvo una inhibición similar a la cepa control. A las 72 horas de incubación se observó una disminución del crecimiento de la cepa expuesta a las concentraciones de 2 µg/mL y 4 µg/mL del antibiótico. Al compararlo con la cepa control, en su forma planctónica se observó una inhibición a partir de la concentración de 1 µg/mL a las 24 horas.

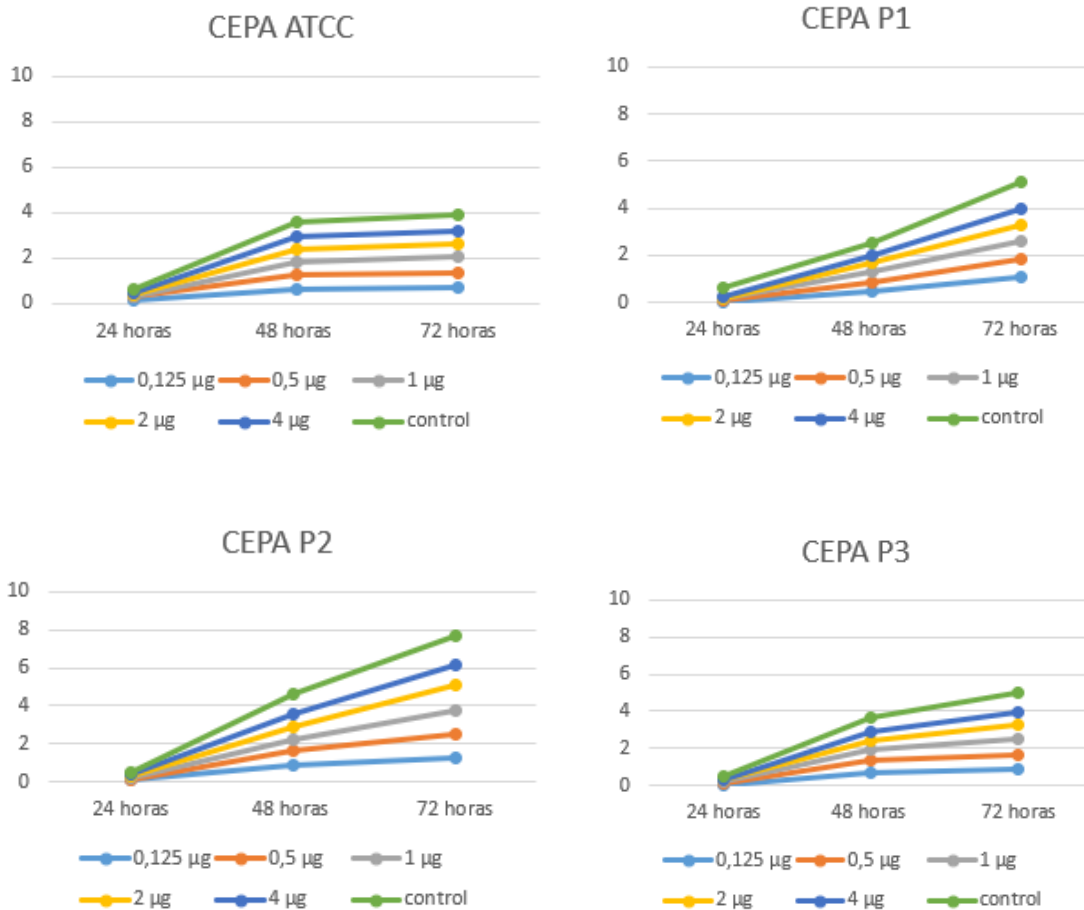
Con respecto a la cepa P2, no se evidenció una inhibición o disminución del crecimiento del biofilm en las 24 horas, pero a las 48 horas en esta cepa se observa que el antibiótico a concentraciones de 1 µg/mL, 2 µg/mL y 4 µg/mL tiene una moderada inhibición y finalmente a las 72 horas, en relación a la concentración de antibiótico de 4 µg/mL se observa una mayor inhibición con respecto a las demás concentraciones, y en su forma planctónica se observa un crecimiento exponencial hasta las 72 horas con una concentración de 0.125 µg/mL, a partir de las 24 horas se observó con una inhibición del crecimiento en una concentración de 1 µg/mL.

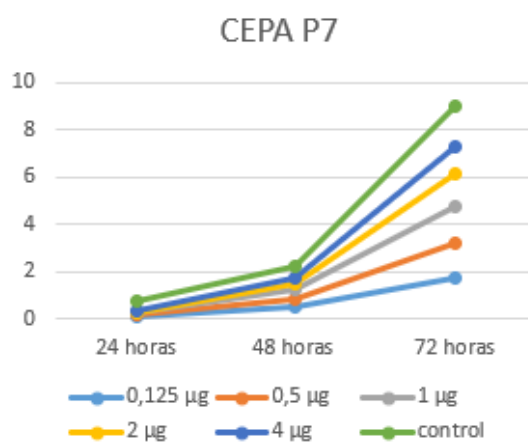
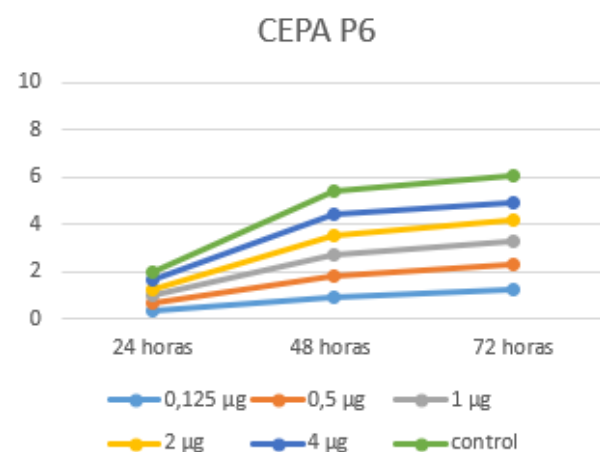
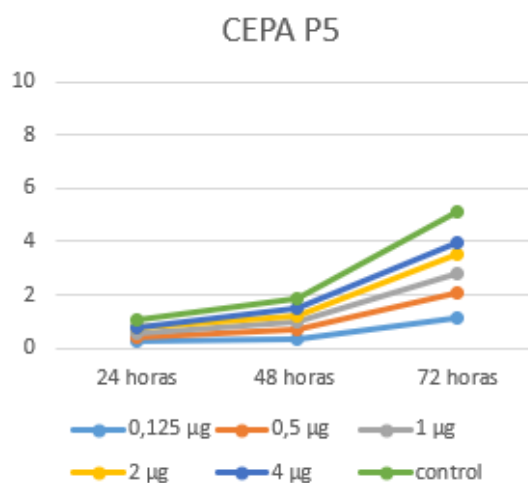
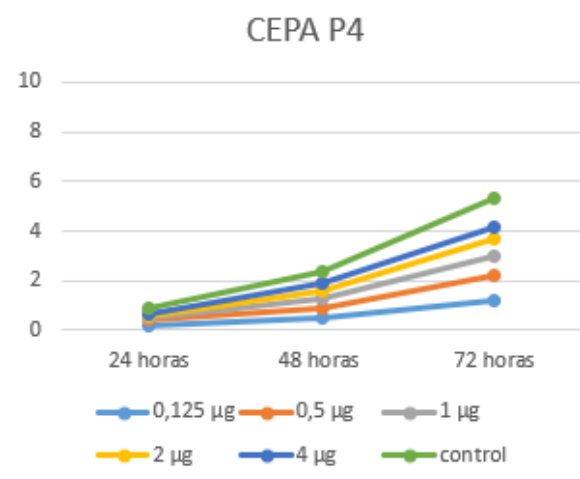
En la cepa P3 a las 24, 48 y 72 horas se observó una inhibición en el crecimiento del biofilm en todas las

concentraciones del antibiótico con respecto a la cepa control, evidenciándose que la concentración de antibiótico que logró una mayor inhibición fue de 4 µg/mL; además se demostró que a mayor tiempo de exposición de antibiótico mayor va a hacer la inhibición, en la presente investigación se generó a las 72 horas a la concentración de 4 µg/mL de ciprofloxacina y así como en la cepa control en su forma planctónica se observó un crecimiento hasta las 48 horas; no obstante disminuye su crecimiento hasta las 72 horas en una concentración de 1 µg/ml.

En la cepa P4 se observó que la concentración de 0.125 µg/mL del antibiótico no inhibió el crecimiento del biofilm ya que la absorbancia de la cepa expuesta a esta concentración fue superior con respecto al control, de acuerdo con los resultados obtenidos el biofilm se adaptó debido a la constante exposición y su baja concentración del antibiótico. Pero las concentraciones de 1 µg/mL y 4 µg/mL generaron una mayor inhibición con respecto a la cepa control a las 72 horas. En su estado planctónico se observó un crecimiento hasta las 48 horas y disminuyó su crecimiento hasta las 72 horas en una concentración de 1 µg/ml.

**Figura 1.** Susceptibilidad de las cepas analizadas (ATCC, P1 a P7) a ciprofloxacina





Fuente: Autores

Acorde a la figura 1, en el biofilm de la cepa P5 la concentración de 0,125 µg/mL de ciprofloxacina no generó ningún tipo de inhibición a las 24, 48 y 72 horas. Del mismo modo el antibiótico a concentraciones de 1 µg/mL y 4 µg/mL generó una disminución del crecimiento del crecimiento a las 24 horas, pero a las 72 horas se observó una inhibición mayor en la cepa expuesta a la concentración de 4 µg/mL. En relación con su estado planctónico se observó un crecimiento hasta las 72 horas a una concentración de 0,125 µg/mL, pero cuando fue expuesta a una concentración de 1 µg/mL y 4 µg/mL su crecimiento disminuyó hasta las 72 horas.

Con respecto a la cepa 6 no se observó una inhibición significativa en las diferentes concentraciones del

antibiótico ni en su estado planctónico a las 24 y 48 horas; pero a las 72 horas se observa una mayor inhibición de ciprofloxacina a una concentración de 4 µg/mL.

En cuanto a la cepa 7, las diferentes concentraciones del antibiótico generaron una inhibición significativa a las 24 horas, pero a las 48 horas se aprecia una tolerancia al antibiótico ya que la inhibición no es significativa con respecto a su comportamiento, pero después de 72 horas expuestas a una concentración de 4 µg/ml se observa una inhibición significativa, y en su estado planctónico hubo una disminución desde las 24 horas a una concentración de 1 µg/mL.

## DISCUSIÓN

Los microorganismos diseñan nuevas estrategias para su supervivencia; una de estas estrategias es la formación del biofilm, la cual aumenta la tolerancia a los antibióticos lo que ha generado el estudio de métodos terapéuticos que puedan apuntar a disminuir su virulencia en lugar de apuntar a su crecimiento y así permitir generar estudios a futuro para evaluar el comportamiento del patógeno frente a IAAS (17).

Una investigación realizada en México en el año 2012 refiere que la formación de biofilm in vitro es un evento complejo relacionado con diferentes factores físicos y químicos como la composición del medio, temperatura, pH y niveles de oxígeno (18). Así mismo, sostienen que dependiendo de las cepas de *P. aeruginosa*, las condiciones nutricionales pueden desarrollar diferentes fenotipos de biofilms que afectan cada una de las etapas de la formación del biofilm; además estas características también afectan la producción de tres polisacáridos (alginato Pel y Psl) los cuales le dan estabilidad al biofilm y genera características cualitativas de la matriz de exopolisacáridos (19).

Las bacterias fuertemente productoras de biofilm fueron codificadas como P2 y P7; en las cepas P1, P3, P4, P5 y P6 a las 72 horas se observó una moderada producción, la diferencia de producción de biofilm entre bacterias del mismo género y especie se debe a diferentes mecanismos fenotípicos. Esto comparado con un el estudio realizado en el año 2020 en Bélgica en donde se observó que varios aislamientos de *P. aeruginosa* pueden desarrollar diferentes fenotipos de biofilms, encontrando que unas cepas en medios mínimos de glucosa se pueden dividir en 5 fenotipos diferentes y pueden generar estructuras con espacios no colonizados o comunidades tridimensionales (11).

Los métodos de kirby-bauer y la concentración mínima inhibitoria (MIC) son utilizados para determinar la susceptibilidad de una bacteria en estado planctónico sin embargo no determinan la capacidad de desarrollar mecanismos de resistencia en patologías asociadas a la formación de biofilms, como es el caso de *P. aeruginosa*. Sin embargo, los datos de la evaluación de la sensibilidad de este estudio muestran una gran diferencia entre los estándares del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) con respecto a los puntos de cohorte de sensibilidad y resistencia entre la ciprofloxacina y los biofilms de *P. aeruginosa* (6).

Algunos antibióticos, pueden afectar la síntesis de ciertas proteínas y la fisiología de los microorganismos. Se conoce que la ciprofloxacina es una de las quinolonas con vida media de tres a quince horas que se utiliza mayormente para el tratamiento de algunas infecciones ya al ser administrada cada 12 a 24 horas brinda un buen rendimiento en infecciones como la fibrosis quística, pie diabético y otitis media (20). Este antibiótico tiene una alta actividad bactericida y su acción se mantiene aún con un estado metabólicamente bajo por parte de las *P. aeruginosa*, lo cual afecta directamente al biofilm en su arquitectura y dispersión (20). No obstante, tienen un efecto tóxico para los pacientes y son usadas solo en algunos tipos de infecciones (21).

Se observó que al exponer los biofilms de *P. aeruginosa* a diferentes concentraciones de ciprofloxacina generan una rápida disminución en el crecimiento, como se evidenció en las cepas P1, P2, P3, P3, P6 y P7. De manera similar, en el 2016 en India se observó que la ciprofloxacina atenúa la virulencia de los biofilms de *P. aeruginosa* al alterar su secreción de proteasa cuando se expone a una concentración bactericida de este antibiótico, además también encontró que la ciprofloxacina a concentraciones subinhibitorias indujo una disminución en la formación del biofilm (22).

Un estudio realizado en el año 2003 en Estados Unidos demuestra que existen diferencias de susceptibilidad en la MIC, es tolerante cuando esta genera un biofilm (23). Esta afirmación se puede corroborar con el presente estudio ya que el biofilm de la cepa P3 demostró una resistencia que superó la MIC a la que fue susceptible en estado planctónico; de la misma manera, la cepa P7 se usó para respaldar los resultados de la cepa P3, ya que mostró como biofilm una disminución en la actividad de ciprofloxacina comparado con la prueba de sensibilidad en las bacterias en estado planctónico.

En el año 2013 en un estudio realizado en Reino Unido documentó que las infecciones de implantes médicos, como catéteres intravenosos, urinarios y peritoneales, son probablemente los mayormente estudiados además que los antibióticos suministrados en dosis muy altas demostraron ser efectivos contra los biofilms (24). Al contrastar sus resultados con los de la presente investigación, se observa que la cepa control P3, P4, P5, P6 que se encontraban expuestas a dosis altas (4 µg/mL) fueron inhibidas por la ciprofloxacina tanto en la forma de biofilm como en su forma planctónica, mostrando mejor resultado en la cepa P6. Sin embargo, también se ha demostrado que los antibióticos tienen buena actividad en pruebas estándares de susceptibilidad, ésta no es la misma

contra biofilms (25). Esto se logró determinar en las cepas P1, P2 y P7 en que se observó que a las 24 horas estas cepas en estado planctónico fueron inhibidas a partir de concentraciones de 1 µg de ciprofloxacina y en los biofilms de estas cepas se observó una gráfica creciente a las 72 horas en concentraciones de hasta 4 µg (22).

Un estudio danés de 2009 afirma que los biofilms son considerados generalmente resistentes a un amplio rango de antibióticos, mostrando mayor tolerancia a antimicrobianos que las células planctónicas. Algunos antibióticos actúan con efectividad sobre células en crecimiento rápido; esto explicaría por qué la ciprofloxacina no pudo actuar sobre la cepa sensible P3 a una concentración de 0,125 µg/mL en cultivo planctónico, debido probablemente a que la población alcanzó la fase estacionaria mucho antes de que el antibiótico pudiera actuar (26). No obstante, en el caso del biofilm de la cepa P3, se puede observar que la concentración de antibiótico requerido para su inhibición o para lograr su disminución a un nivel satisfactorio para un tratamiento, no se consigue sino hasta alcanzar niveles muy altos de la droga utilizada en este estudio. Otros estudios describen que, por lo general, este antibiótico no tiene efectos adversos, su uso en grandes dosis puede presentar problemas en pacientes, tales como trastornos hepáticos, renales y gastrointestinales reversibles (24).

El biofilm de la cepa P5 alcanzó un crecimiento hasta 0,47 luego de 48 horas, durante el ensayo con la dosis más alta de ciprofloxacina utilizada en la prueba (4 µg/mL). Probablemente, esto se debe al hallazgo de una población reducida que consiste en células llamadas persistentes (persister cells), células no mutantes que tienen resistencia al antimicrobiano y se cree que son producidas solo en estado de biofilm (27). Este hallazgo es similar al encontrado por Vestby et al. (11), en donde la población de células persistentes de un biofilm enfrentado a ácido peracético llegaba a ser 0.0001% de la población inicial lo cual generó una tolerancia a concentraciones bajas.

Los valores correspondientes a la cepa sensible P3 son similares a los esperados. No obstante, los cultivos de biopelículas de las cepas P6 resistentes mantienen su población alta, de manera similar a dosis menores. La disminución de la población puede deberse probablemente a factores físicos, como las concentraciones bajas de oxígeno en las capas más profundas del biofilm o la falta de nutrientes en algunas zonas de esta. Incluso, cuando la reducción de la población de las biopelículas no ha sido completa, se distingue que las poblaciones tienen una significativa disminución, a partir de los 1 µg/mL y hasta

los 4 µg/mL de ciprofloxacina) y en las cepas resistentes mayores a 4 µg/mL.

Como limitaciones del presente estudio, se debe considerar ampliar el número muestral y de cepas incluidas que permita hacer mayor comparación, así como obtener aislados de diferentes orígenes para correlación y generar mayor robustez en los resultados obtenidos. Sin duda es un campo de investigación relevante para mejorar la atención de pacientes con IAAS (28).

## CONCLUSIONES

Una misma cepa tiene un comportamiento distinto de acuerdo con su forma de crecimiento; por tanto, las pruebas de susceptibilidad tendrían que desarrollarse en base a la formación del biofilm o a su estado planctónico, ya que se puede presentar infecciones persistentes y falla en el tratamiento, como es el caso de las causadas por *P. aeruginosa*. Las futuras investigaciones deben apuntar hacia la estandarización de un método para obtener resultados comparables de los efectos de los antibióticos sobre biopelículas in vitro, para su aplicación como una prueba de rutina en pacientes donde se sospecha la participación de películas microbianas.

## CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

Andrés Felipe Bolívar Vargas, Diana Paola López Velandia y Astrid Maribel Aguilera Becerra: contribuyeron en la revisión de la redacción y escritura del manuscrito realizaron una contribución sustancial con la adquisición de los datos e información, así mismo para la escritura del artículo, su revisión y aprobación.

## CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés en la realización de este trabajo.

## AGRADECIMIENTOS

La Universidad de Boyacá, por su aporte en la formación académica y la disposición en procesos de investigación.



## REFERENCIAS

1. V Vickery K. Special Issue: Microbial Biofilms in Healthcare: Formation, Prevention and Treatment. *Materials*. 2019;12(12):2001. <https://doi.org/10.3390/ma12122001>
2. Parkins MD, Somayaji R, Waters VJ. Epidemiology, Biology, and Impact of Clonal *Pseudomonas aeruginosa* Infections in Cystic Fibrosis. *Clin Microbiol Rev*. 2018;31(4). <https://doi.org/10.1128/CMR.00019-18>
3. Abadia E, Rodríguez O, De La Cruz A. Efectividad de la formación de biofilms por cepas de pseudomona y su capacidad de disminución de cloro y antagónica de bacterias coliformes. *Rev Iniciación Científica*. 2019; 5:74-78. <https://doi.org/10.33412/rev-ric.v5.0.2389>
4. Azam MW, Khan AU. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discov Today*. 2019;24(1):350-9. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.07.003>
5. Hurtado Quispe LM, Casablanca Alvarado J. Asociación entre la formación de biofilm y la producción de betalactamasas de espectro extendido en *Escherichia coli* aislados de urocultivo en el hospital nacional hipolito unanue de enero-junio 2018. *Univ Priv Norbert Wiene*. 2019. Disponible en: <http://repositorio.uwiener.edu.pe/handle/123456789/2918>
6. Paz-Zarza VM, Mangwani-Mordani S, Martínez-Maldonado A, Álvarez-Hernández D, Solano-Gálvez SG, Vázquez-López R, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Rev Chil infectología*. 2019;36(2):180-9. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182019000200180>
7. Alonso B, Fernández-Barat L, Domenico EG Di, Marín M, Cercenado E, Merino I, et al. Characterization of the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* strains causing ventilator-associated pneumonia. *BMC Infectious Diseases*. 2020;20(1):1-8. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05534-1>
8. Agbo Ejirofor C, Ejinaka Obiora R, Obeta Uchejeso, Lote-Nwaru Ifeoma E, Ibanga Imoh E, Dajok Godfrey. Antimicrobial Susceptibility Pattern of Biofilm forming *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Noncritical Surfaces in a Tertiary Healthcare Facility in South Eastern Nigeria. *Am J Public Heal Res*. 2020;8(3):87-92. <http://dx.doi.org/10.12691/ajphr-8-3-2>
9. Bahador N, Shoja S, Faridi F, Dozandeh-Mobarrez B, Qeshmi FI, Javadpour S, et al. Molecular detection of virulence factors and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* obtained from different clinical specimens in Bandar Abbas. *Iran J Microbiol*. 2019;11(1):25-30.
10. Erin KC, Boo Shan Tseng. Pushing beyond the Envelope: the Potential Roles of OprF in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation and Pathogenicity. *Journal of bacteriology*. 2019; 201(18): e00050-19. <https://doi.org/10.1128/JB.00050-19>
11. Vestby LK, Grønseth T, Simm R, Nesse LL. Bacterial Biofilm and its Role in the Pathogenesis of Disease. *Antibiotics*. 2020; 9(2): 59. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020059>
12. Asati S, Chaudhary U. Prevalence of biofilm producing aerobic bacterial isolates in burn wound infections at a tertiary care hospital in northern India. *Ann Burns Fire Disasters*. 2017;30(1):39-42.
13. Del Pozo JL. Expert Review of Anti-Infective Therapy. Biofilm-related disease. Vol. 16. Taylor and Francis Ltd; 2018. p. 51-65.
14. Olivares E, Badel-Berchoux S, Provot C, Prévost G, Bernardi T, Jehl F. Clinical Impact of Antibiotics for the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infections. *Front Microbiol*. 2020;10:2894. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02894>
15. Ciofu O, Tolker-Nielsen T. Tolerance and Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Antimicrobial Agents—How *P. aeruginosa* Can Escape Antibiotics. *Front Microbiol*. 2019;10(5):913. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00913>
16. Stepanovič S, Ćirković I, Ranin L, Švabić-Vlahović M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Lett Appl Microbiol*. 2004;38(5):428-32. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2004.01513.x>
17. Bi Y, Xia G, Shi C, Wan J, Liu L, Chen Y, et al. Therapeutic strategies against bacterial biofilms. *Fundam Res*. 2021;1(2):193-212. <https://doi.org/10.1016/j.fmre.2021.02.003>
18. Ibarra-Trujillo C, Villar-Vidal M, Gaitán-Cepeda LA, Pozos-Guillen A, Mendoza-de Elias R, Sánchez-Vargas LO. Ensayo de formación y cuantificación de biopelículas mixtas de *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*. *Rev Iberoam Micol*. 2012;29(4):214-22. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2012.02.003>
19. Silvestre Ortega-Peña, Edgar Hernández-Zamora. Biopelículas microbianas y su impacto en áreas médicas: fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. *Hosp Infant Mex*. 2018;75(2):79-88. <https://doi.org/10.24875/bmhim.m18000012>
20. Marques CNH, Nelson SM. Pharmacodynamics of ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* planktonic and biofilm-derived cells. *Lett Appl Microbiol*. 2019;68(4):350-9. <https://doi.org/10.1111/lam.13126>

21. Azevedo FCR, Vaz ICD, Barbosa FAR, Magalhães SMS. Toxicological effects of ciprofloxacin and chlorhexidine on growth and chlorophyll a synthesis of freshwater cyanobacteria. *Brazilian J Pharm Sci.* 2019;55:17661. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902019000217661>
22. Gupta P, Chhibber S, Harjai K. Subinhibitory concentration of ciprofloxacin targets quorum sensing system of *Pseudomonas aeruginosa* causing inhibition of biofilm formation & reduction of virulence. *Indian J Med Res.* 2016;143(5):643-51. <https://doi.org/10.4103%2F0971-5916.187114>
23. Sufya N, Allison DG, Gilbert P. Clonal variation in maximum specific growth rate and susceptibility towards antimicrobials. *J Appl Microbiol.* 2003;95(6):1261-7. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02079.x>
24. Allison KR, Brynildsen MP, Collins JJ. Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides. *Nature.* 2011;473(7346):216-20. <https://doi.org/10.1038/nature10069>
25. Bjarnsholt T, Jensen PŘ, Fiandaca MJ, Pedersen J, Hansen CR, Andersen CB, et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Pediatr Pulmonol.* 2009;44(6):547-58. <https://doi.org/10.1002/ppul.21011>
26. Drlica K, Hiasa H, Kerns R, Malik M, Mustaev A, Zhao X. Quinolones: Action and Resistance Updated. *Curr Top Med Chem.* 2009;9(11):981-98. <https://doi.org/10.2174%2F156802609789630947>
27. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(9):623-33. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
28. Bolivar-Vargas AF, Torres-Caycedo MI, Sánchez-Neira Y. Biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* como mecanismos de resistencia y tolerancia a antibióticos. Revisión narrativa. *Rev. Fac. Cienc. Salud Univ. Cauca* 22 de noviembre de 2021;23(2):47. <https://doi.org/10.47373/rfcs.2021.v23.1780>