

Recibido 22/08/2024 Aceptado 26/09/2024

Detección del gen *ClfB*, su relación con la formación de biopelículas y la resistencia a meticilina en cepas de *staphylococcus aureus* aisladas de pacientes infectados y colonizados, en la ciudad de Cartagena, Colombia¹

Detection of *ClfB*, and its relationship with biofilm formation, methicillin-resistance in *staphylococcus aureus* strains isolated from infected patients and healthy carriers from the city of Cartagena, Colombia

Braizon Quintero²
Niradiz Reyes³

Cómo citar:

Quintero, B., & Reyes, N. (2024). Detección del gen *ClfB*, su relación con la formación de biopelículas y la resistencia a meticilina en cepas de *staphylococcus aureus* aisladas de pacientes infectados y colonizados, en la ciudad de Cartagena, Colombia. *Vía Innova*, 12 (1), 23-41. <https://doi.org/10.23850/2422068X.6828>

¹ Genes de adherencia de *Staphylococcus aureus* y su relación con la formación de biopelículas y la resistencia a meticilina

² Biólogo, Grupo de Investigación Genética y Biología Molecular, Universidad de Cartagena, bquinterog@unicartagena.edu.co, Cartagena.

³ Ph.D., Grupo de Investigación Genética y Biología Molecular, Universidad de Cartagena, nreyesr@unicartagena.edu.co, Cartagena.

Resumen.

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) es un importante patógeno causante de infecciones hospitalarias y comunitarias. Este estudio tuvo como objetivo determinar la relación entre el gen *ClfB*, la capacidad de formación de biopelículas y la resistencia a meticilina en cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con infecciones de piel y tejidos blandos y de fosas nasales de individuos sanos. Los aislamientos fueron identificados con técnicas microbiológicas estándar y confirmados mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La capacidad de formación de biopelículas de cada cepa se determinó usando el protocolo descrito por *Stepanovic et al.*, y la detección del gen *ClfB* se realizó mediante PCR de punto final usando cebadores específicos. Se encontró que las cepas aisladas de individuos colonizados fueron en su gran mayoría formadoras de biopelículas débiles o no productoras de biopelículas, mientras que las cepas aisladas de infecciones fueron principalmente formadoras de biopelículas fuertes y moderadas. No se encontró una relación significativa entre la presencia del gen *ClfB* y la capacidad de formación de biopelículas o con la resistencia a la meticilina. Los resultados permiten concluir que las cepas de *S. aureus* causantes de infecciones tienden a formar biopelículas fuertes. Aunque se desconocen aún todos los mecanismos implicados en este proceso, es posible que el gen *ClfB* contribuya al establecimiento de la biopelícula. No obstante, otros determinantes moleculares pueden estar implicados en el proceso de formación de biopelículas fuertes por lo cual se requieren más estudios dirigidos a entender mejor este proceso.

25

Palabras clave : Sistemas Solares Fotovoltaicos (SSFV), Potencial Fotovoltaico, Sombra del Edificio, Energía Renovable

Abstract

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) is an important pathogen responsible for hospital and community acquired infections. The objective of this study was to determine the relationship between the presence of *clfB* gene, biofilm-producing ability, and methicillin-resistance in *S. aureus* strains isolated from patients with skin and soft tissue infections and anterior nares of healthy carriers. Bacterial isolates were identified with standard microbiological techniques and confirmed using polymerase chain reaction (PCR). Biofilm formation was assessed using the protocol described by *Stepanovic et al.* and molecular detection of *clfB* gene was performed using endpoint PCR with specific primers. The main finding was that strains from carrier individuals were mainly weak- or non- biofilm producers, while strains isolated from infections were mainly strong and moderate biofilm-producers. Presence of *clfB* gene was not significantly associated with biofilm-forming

ability nor methicillin-resistance. Our results may indicate that *S. aureus* strains causing skin and soft tissue infections tend to form strong biofilms. Although the main mechanisms implicated with biofilm formation are not completely known, it is possible that *clfb* gene could contribute to biofilm establishment. However, other molecular determinants may be implicated in the biofilm-forming process. Thus, more studies are needed to increase the knowledge on this process. to the IDEAM values. The area available on the roofs to install the PV system turned out to be at least 3463, 81 m² throughout the year.

Keywords: Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*, Biofilms, *Clfb* Gene, Adhesion Factors.

1. Introducción

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) es una bacteria colonizadora considerada como uno de los principales patógenos bacterianos oportunistas (Howden et al., 2023). En las dos últimas décadas se ha observado, a nivel mundial, la emergencia de infecciones causadas por cepas de *S. aureus* tanto sensibles como resistentes a la meticilina (Araya et al., 2019; Montes et al., 2021).

En América del Norte, aproximadamente 119.000 personas contraen infecciones invasivas por *S. aureus* anualmente, lo que resulta en alrededor de 20.000 muertes por año (Ccala Checya & Condor Herrada, 2024; Zapata Acosta, 2024). En la ciudad de Cartagena de Indias, Colombia, se reporta una prevalencia de 74 % de *S. aureus* meticilino resistente (SARM) causantes de bacteriemias, siendo estos datos alarmantes (Zapata Gelvez, 2021).

S. aureus hace parte del microbioma humano, colonizando entre el 20 y el 40 % de la población (Palacios Bonilla, 2023; Reyes Ramos & Suárez Alvarez, 2008; Rodríguez Tamayo & Jiménez Quiceno, 2015; Tuon et al., 2023; Yépez, 2019), y los factores de virulencia y enzimas que genera, conllevan a la capacidad de evadir el sistema inmune del ser humano (Ccorimanya De La Cruz, 2024).

Las cepas SARM tienen la capacidad de producir una proteína de unión a la penicilina llamada PBP2a, la cual presenta baja afinidad por la mayoría de las penicilinas semi-sintéticas dentro de las cuales están la meticilina y la oxacilina (Mamani et al., 2006; Uehara, 2022). Las infecciones causadas por SARM pueden ser tanto de piel como de tejidos blandos, incluyendo lesiones que van desde una baja morbilidad y mortalidad, tales como foliculitis y abscesos, hasta infecciones sistémicas fatales, como endocarditis, síndrome de shock tóxico, sepsis, entre otras (Lowy, 1998).

Las infecciones por SARM, representan un reto de salud importante por la resistencia antibiótica y mortalidad asociada (Oliván et al., 2024). Es imperativo destacar que estas infecciones se caracterizan por la formación de biopelículas que juegan un papel importante en protección de la bacteria frente a agentes antimicrobianos (Lasa et al., 2005; Pinilla et al., 2017). En comparación con las células planctónicas, las células bacterianas presentes en la biopelícula son más resistentes a la mayoría de los antibióticos y a los mecanismos de defensa del huésped (Kang et al., 2022). En el caso de las cepas formadoras de biopelículas, los antibióticos no logran difundirse adecuadamente en la matriz y no pueden actuar de manera eficaz, lo que conlleva al establecimiento de poblaciones que resisten altos niveles de antibióticos.

Del 60 al 80 % de las infecciones por *S. aureus* se desencadenan debido a la formación de biopelículas (Costerton et al., 1999; Paharik & Horswill, 2016). La estructura de las biopelículas de *S. aureus* consta de una sustancia polimérica extracelular (EPS) que tiene como componente principal a la Adhesina Intercelular de Polisacárido (PIA).

PIA es un polisacárido catiónico compuesto de monómeros de N-acetilglucosamina parcialmente desacetilados, los cuales son fundamentales para el correcto establecimiento y formación de una biopelícula (Kaushik et al., 2024; Tuon et al., 2023). Estas biopelículas se forman a través de un proceso que involucra cinco etapas distintas: A) Unión, B) Multiplicación, C) Éxodo, D) Maduración y E) Dispersión (Montes Guevara, 2023; Moormeier & Bayles, 2017). Cuando las células se adhieren a superficies mediante interacciones hidrofóbicas o proteínas de superficie, crean una “esterilla” confluyente compuesta por ADN extracelular (eDNA) y matriz proteica. Luego, experimentan un éxodo masivo de células, liberando una subpoblación a través de la degradación del eDNA mediada por nucleasas reguladas por Sae, un sistema regulatorio que consiste en dos genes: *saeR* y *saeS*, los cuales regulan a nivel transcripcional la expresión de varios factores de virulencia (Will, 2004). Esto último permite la formación de microcolonias tridimensionales a partir de diferentes focos celulares adheridos durante esta etapa (Moormeier & Bayles, 2017).

Toda la biopelícula puede experimentar dispersión completa, o solo una parte de ella. La aparición de nuevas biopelículas en diferentes lugares se ve favorecida por la liberación de bacterias planctónicas (Sohail et al., 2023). Dentro de los actores principales en el proceso de formación de biopelícula, se han descrito una serie de moléculas catalogadas como factores de adhesión, que expresa la bacteria para facilitar su adhesión a una superficie (Tomlinson et al., 2021; Yamazaki et al., 2024). Comúnmente estos factores de adhesión son referenciados como componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas adhesivas de la matriz o MSCRAMMs (Microbial

Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules) (Foster, 2024; Hayles et al., 2024). Estudios realizados en *S. aureus* han descrito una serie de genes que codifican para diferentes MSCRAM-Ms, destacándose los genes *clfa*, *clfb*, *fib*, *fnba* y *fnbb* (Humeniuk et al., 2023).

Se han realizado múltiples estudios en donde se relaciona la presencia de algunos genes que codifican factores de adhesión con la capacidad de formación de biopelículas, sin embargo, aún existen lagunas de conocimiento con respecto a estos genes, por lo cual es pertinente evaluar las implicaciones que estos pueden tener a nivel bacteriano. En el caso del gen *ClfB*, este se encuentra ubicado en el locus N1060_RS13235; su tamaño es de 205 pb y codifica para el factor de aglomeración B (CLFB), una proteína de 150 kDa con un motivo de clasificación LPXTG C-terminal que hace parte de las MSCRAM-Ms (Abraham & Jefferson, 2012). *ClfB* se categoriza como una adhesina bifuncional que es expresada únicamente en la superficie celular durante la fase exponencial de crecimiento bacteriano y es degradada rápidamente por la proteasa aureolisina durante la fase estacionaria (Dyzenhaus et al., 2023). Esta proteína es capaz de unirse a las cadenas alfa del fibrinógeno, activándolo para formar fibronectina y promoviendo la aglutinación, un proceso que es esencial en la segunda etapa de formación de biopelículas (Hou et al., 2022). Además, *ClfB* se puede unir a la citoqueratina diez (CK10), una proteína estructural de las células epiteliales escamosas, por lo que se cree que está implicada en la colonización de *S. aureus* al epitelio nasal (Ganesh et al., 2011; Koreen et al., 2005).

El factor de aglomeración B se ha implicado en la patogénesis de la endocarditis inducida por *S. aureus* (Koreen et al., 2005). También se ha relacionado a *ClfB* con infecciones del torrente sanguíneo (BSI) (Blomseth, 2023). Abraham y colaboradores (Abraham & Jefferson, 2012) reportaron que la proteína *ClfB* podría tener un papel importante en la formación de biopelículas. Cuando se elimina el gen *clfb* en condiciones de escasez de iones de calcio (Ca^{2+}), se observa una notable inhibición del crecimiento de la biopelícula ($p < 0,05$) (Abraham & Jefferson, 2012).

Lo anterior es particularmente importante, teniendo en cuenta que este gen puede participar de manera sustancial en la formación de biopelículas que, a su vez, contribuyen a la resistencia a antibióticos y consecuentemente hacen aún más difícil tratar a los pacientes infectados por *S. aureus* (Patel & Rawat, 2023).

Teniendo en cuenta todo lo anterior, el presente trabajo tiene como objetivo determinar la relación del gen *ClfB*, la capacidad de formación de biopelículas y la resistencia a la metilicina en aislamientos clínicos y colonizantes de *S. aureus*.

2. Materiales y Métodos

2.1 Diseño del estudio

Los aislamientos fueron obtenidos en el marco de proyectos financiados por Colciencias y la Universidad de Cartagena, con la aprobación de los comités de ética institucionales y con la firma de los consentimientos informados de los representantes legales de los individuos a partir de los cuales se obtuvieron los aislamientos que fueron debidamente almacenados en los laboratorios del grupo de Genética y Biología Molecular, adscrito a la facultad de Medicina de la Universidad de Cartagena.

2.2 Técnicas de identificación microbiológicas

Las muestras fueron reactivadas a partir de los stocks mediante siembra en el medio de cultivo agar selectivo Manitol salado a una temperatura de 37°C por un periodo de 24 horas, seguido de cultivo en agar nutritivo a 35°C por 24-72 horas. Se verificó la pureza del cultivo realizando tinción de Gram y observación en microscopio óptico con objetivo 100X, en el que se observaron cocos Gram-positivos generando agrupaciones en forma de racimos de uvas.

Se realizó prueba de catalasa y se observó formación de burbujas en los aislamientos. También se realizó prueba de coagulasa en tubo con plasma de conejo y en esta se observó la formación de coágulos. Una vez confirmados los aislamientos, se dio paso a los ensayos moleculares.

2.3 Determinación de la capacidad de formación de biopelículas

Este ensayo se realizó siguiendo el protocolo descrito por *Stepanovic et al* (2007). Para esto se inocularon entre 1 y 2 colonias de *S. aureus* en 4 ml de caldo TSB (Trypticase de soya) + 0,25 % de glucosa. Se llevó a incubación sin agitar por 18 horas a 35-37°C hasta que se alcanzó una turbidez de densidad óptica (OD) equivalente al estándar 0.5 de la escala de McFarland (1.5×10^8 UFC, equivalente a una $OD_{620} = 0.08 - 0.1$), para lo cual se midió la OD inicial y luego, cada hora hasta alcanzar la OD esperada.

Posteriormente, se hizo una dilución 1:10 en TSB de la suspensión bacteriana, y se depositaron 150 μ l de la suspensión diluida en pozos individuales de platos de cultivo celular de 96-pozos fondo plano, en triplicado para cada cepa a evaluar, las cuales fueron incubadas a 35-37°C por 24h en atmosfera normal. Luego de las 24 horas se removieron por decantación los contenidos de cada pozo y se lavaron tres veces con 300 μ l de fosfato buferado salino (PBS), con el fin de eliminar las bacterias planctónicas flotantes. Los platos se colocaron en posición invertida sobre papel absorbente para un secado completo por 60 min a temperatura ambiente. Seguidamente, se procedió a

teñir las biopelículas formadas en cada pozo con 150 ul de cristal violeta 0.41 % durante 15 min, se removió por decantación el exceso de colorante y se lavó cada pozo cinco veces con 300 ul de agua destilada, dejándose secar finalmente al aire por 5-10 min.

Luego de esto, se eluyó el colorante unido a las células bacterianas de la biopelícula para lo cual se adicionó a cada pozo 150 ul de etanol al 70 %, dejando el plato cubierto por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se resuspendió en cada pozo la solución etanol-cristal violeta suavemente tres veces y se transfirieron 100 ul de la misma a pozos individuales de un plato de microtitulación.

Para el análisis cuantitativo de la producción de biopelícula se transfirieron 100 ul de la suspensión etanol-cristal violeta a cada pozo de un plato de microtitulación fondo plano y se determinaron las densidades ópticas (OD) a 570 nm en un lector de microplatos (MultiSkan, Thermo), usando una longitud de onda de referencia de 620 nm. Cada ensayo se realizó en triplicado y como control negativo se utilizó medio sin inocular para determinar la OD de línea de base.

Se calcularon los valores OD promedios para cada cepa evaluada y para los controles negativos, y se estableció el valor OD del punto de corte (ODc), el cual se define como tres desviaciones estándar (SD) por encima del valor OD promedio del control negativo: $ODc = \text{valor OD promedio del control negativo} + (3 \times SD \text{ del control negativo})$.

30

El valor ODc se calculó para cada plato de microtitulación separadamente. Cuando se obtuvo un valor negativo, se presentó como cero, mientras que los valores positivos fueron indicativos de producción de biopelícula. Como controles adicionales en los ensayos de formación de biopelículas, se incluyeron las cepas ATCC 12228 de *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*, no productora de biopelícula) y ATCC 29213 de *S. aureus* (productora de biopelícula). También se incluyeron como control positivo la cepa USA300 de *S. aureus* (SARM).

Para la interpretación de los resultados, las cepas se dividieron en las siguientes categorías fenotípicas de producción de biopelícula:

1. $OD < ODc$: negativo (No productor de biopelícula) (-).
2. $ODc < OD < 2 \times ODc$: productor débil de biopelícula (+).
3. $2 \times ODc < OD < 4 \times ODc$: productor moderado de biopelícula (++)
4. $4 \times ODc < OD$: productor fuerte de biopelícula (+++).

2.4 Métodos moleculares

2.4.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN se llevó a cabo a partir de cultivos de 24 horas en medio nutritivo siguiendo la metodología descrita por *Bettín y colaboradores* (Bettin et al., 2012). Las colonias obtenidas se resuspendieron en 1ml de Tris-HCl (0.5 M; pH: 8.0) y se llevaron a centrifugación a 13.000 rpm por cinco minutos. Posteriormente, tras descartar el sobrenadante, el precipitado fue resuspendido en 0.5 ml de buffer TE (Tris-HCl 10 mM, pH: 8.0 + EDTA 1mM), se calentó a 100°C por 30 minutos y se enfrió a -35 °C durante 20 minutos. Posterior a este choque térmico, las muestras se centrifugaron nuevamente a 13.000 rpm por 15 minutos, y el sobrenadante se recolectó en un nuevo tubo.

Al ADN resultante se le determinó su grado de pureza mediante lectura de absorbancia en un nanodrop Thermo Scientific a longitudes de onda de 260 y 280 nm. Las muestras que arrojaron una relación de A260 / A280 de 1,6 a 1,8 se consideraron como ADN de buena calidad (Burbano Moscoso, 2023).

2.5 Confirmación de los genes *nuc* y *mecA*.

Las cepas fueron sometidas a una detección de los genes *nuc*, que codifica una *termonucleasa* extracelular específica de la especie *S. aureus* y que se utiliza como gen diagnóstico, y el gen *mecA* que codifica la enzima PBP2a responsable de la resistencia a la metilina (González Villalobos, 2023).

La confirmación del gen *nuc* se realizó por medio de PCR, siguiendo la metodología de *Bettín y colaboradores* (2012) con algunas modificaciones. Las condiciones para este procedimiento fueron: una desnaturalización inicial de 94 ° C durante cinco minutos, 10 ciclos de 94 ° C por 40 segundos, 68 ° C por 40 segundos, 72 ° C por un minuto.

La confirmación del gen *mecA* se realizó por medio de PCR, siguiendo la metodología de *Bettín y colaboradores* (Bettin et al., 2012). Las condiciones para esta PCR fueron: desnaturalización inicial a 95°C, 35 ciclos de 95°C durante un minuto, 57°C por un minuto y 70°C por 45 segundos, y una elongación final de 10 minutos a 70°C.

2.6 Detección del gen *Clfb*

La detección de este gen fue realizada por medio de PCR. Para este ensayo se usaron los cebadores descritos por *Tristan et al* (2003), con las siguientes condiciones: MgCl₂ 2mM; dNTPs 200μM; cebadores 0,5 μM de cada gen y Taq po-limerasa 1,25 U (Invitrogen, California, USA), durante 30 ciclos: desnaturalización por un minuto, hibridación a 55°C por un minuto y extensión a 72°C por

un minuto. Se utilizó la cepa USA300 como control positivo. Finalmente, los amplicones resultantes fueron visualizados bajo luz UV después de electroforesis utilizando geles de agarosa al 1.5 % teñidos con bromuro de etidio.

2.7 Procesamiento de la información y análisis

Los resultados correspondientes a la capacidad de formación de biopelículas y la presencia del gen *ClfB*, fueron tabulados para cada aislamiento en una tabla de Excel y se clasificaron en dos grupos: colonizantes e infectantes. Se subclasificaron en aislamientos sensibles (MSSA) o resistentes (SARM) según sus propiedades de resistencia a metilicina y se realizó un análisis descriptivo de las variables para conocer su distribución en cada uno de los grupos y subgrupos establecidos.

Para determinar la relación de las variables categóricas se realizó el test exacto de Fisher con el paquete estadístico y gráfico GraphPad Prism V10. Debido a que la muestra del presente estudio es pequeña, se utilizó la prueba exacta de Fisher ya que esta calcula un valor P exacto, mientras que la prueba de Chi-cuadrado solo calcula una aproximación, lo que puede generar diferencias importantes en muestras con tamaño pequeño.

3. Resultados

En total se estudiaron 111 cepas, de las cuales 59 fueron provenientes de infecciones y 52 fueron aisladas de individuos sanos colonizados. El 71,18 % de las cepas de infecciones resultaron ser positivas para *ClfB*, mientras que el 28,82 % fueron negativas. El 61,53 % de las cepas colonizantes fueron positivas para *ClfB*, mientras que el 38,47 % fueron negativas. La presencia de este gen se observó en la gran mayoría de los aislamientos, como se muestra en las figuras 1 y 2.

Figura 1. PCR para detección de *ClfB*. Revelado de productos de PCR del (gen *clfb* 205 pb). Carril 1: MW (marcador de peso molecular). Carril 2: control negativo. Carril 3: cepa de referencia USA300. Los carriles 4 a 16: aislamientos representativos de cepas infectantes de este estudio.

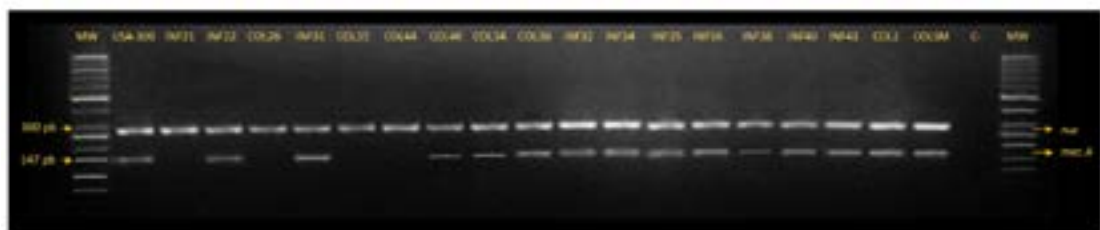


Figura 2. PCR para detección de *ClfB*. Revelado de productos de PCR del (gen *clfB* 205 pb). Carril 1: MW (marcador de peso molecular). Carril 2: control negativo. Carril 3: cepa de referencia USA300. Los carriles 4 a 16: aislamientos representativos de cepas colonizantes de este estudio.



El gen *nuc* fue positivo en todas las cepas, mientras que el gen *mecA* fue positivo en algunas cepas, en su mayoría cepas infectantes (Figura 3).

Figura 3. PCR dúplex para detección de los genes *nuc* y *mecA*. Revelado de productos de PCR de los genes *nuc* y *mecA*. Carril 1: MW (marcador de peso molecular). Carril 2: cepa de referencia USA300. Los carriles 3 a 20: aislamientos representativos de este estudio. Carril 21: control negativo. Carril 22: MW.



Los resultados revelan una diferencia notable en la capacidad de formación de biopelículas entre los aislamientos infectantes y colonizantes. Mientras que las cepas infectantes demostraron ser formadoras fuertes y moderadas de biopelículas, las cepas colonizantes, en su mayoría, exhibieron una capacidad de formación de biopelículas débil o nula (Figura 4).

Figura 4. Comparación de la capacidad de formación de biopelículas en aislamientos de *Staphylococcus aureus*. **** $p < 0.0001$ (Fisher's exact test).

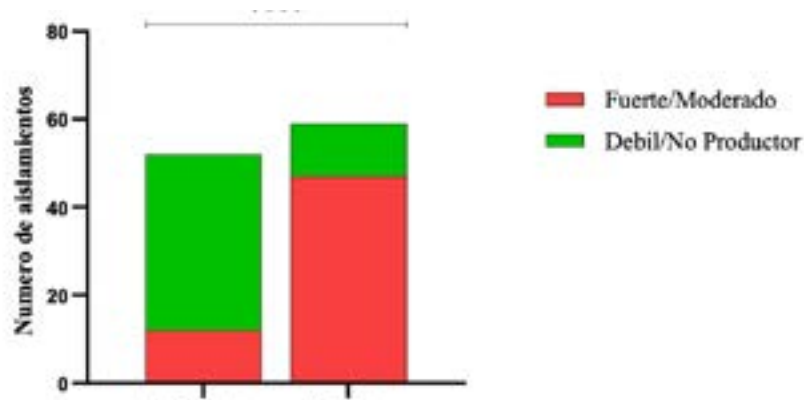


Figura 4. Comparación de la capacidad de formación de biopelículas en aislamientos de *Staphylococcus aureus*. **p <0.0001 (Fisher's exact test).**

Tabla de Contingencia			
	Fuerte/Moderado	Debil/No Productor	Total
Colonizantes	12	40	52
Infectantes	47	12	59
Total	59	52	111

No se encontraron relaciones estadísticamente significativas entre la presencia del gen *clfb* y la capacidad de formación de biopelículas de las cepas infectantes, tampoco se encontró una relación significativa entre el gen *ClfB* y la capacidad de formación de biopelículas de las cepas colonizantes (Figura 5).

Figura 5. Presencia del gen *ClfB* en aislamientos de *Staphylococcus aureus*. A) Presencia del gen *ClfB* en aislamientos de *S. aureus* colonizantes y su relación con la formación de biopelículas, B) Presencia del gen *ClfB* en aislamientos de *S. aureus* infectantes y su relación con la formación de biopelículas. Colonizantes: $p > 0.99$; Infectantes: $p = 0.7292$, (Fisher's exact test).

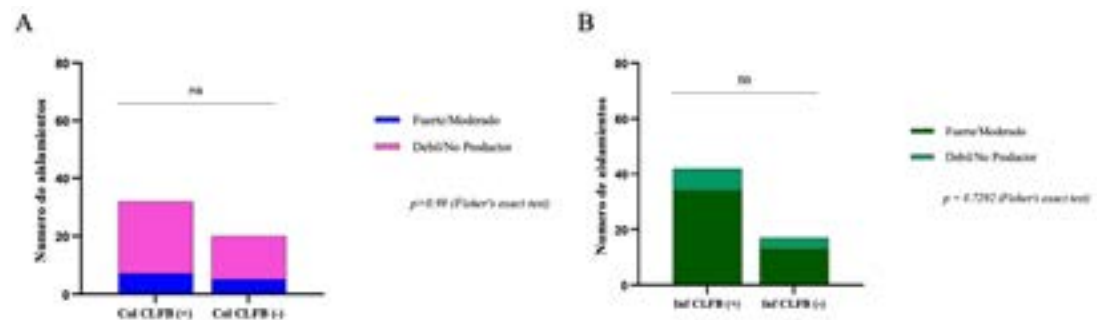


Tabla de Contingencia			
	Fuerte/ Moderado	Debil/No Productor	Total
Col CLFB (+)	7	25	32
Col CLFB (-)	5	15	20
Total	12	40	52

Tabla de Contingencia			
	Fuerte/ Moderado	Debil/No Productor	Total
Inf CLFB (+)	34	8	42
Inf CLFB (-)	13	4	17
Total	47	12	59

Tampoco se encontró asociación estadísticamente significativa entre la resistencia a la meti-
lina (gen *mecA*) y la capacidad de formación de biopelículas tanto en las cepas colonizantes como
en las cepas infectantes, sin embargo, se observa que la mayoría de las cepas infectantes tienden a
tener resistencia a la metilina (Figura 6 y 7).

Figura 6. Presencia del gen *mecA* en aislamientos de *Staphylococcus aureus* colonizantes según su capacidad de formación de biopelículas. Se puede observar que la mayoría de las cepas son positivas para *mecA* y no existen diferencias estadísticamente significativas entre la capacidad de formación de biopelículas entre las cepas *mecA* positivas y *mecA* negativas. $p=0.1733$ (Fisher's exact test).

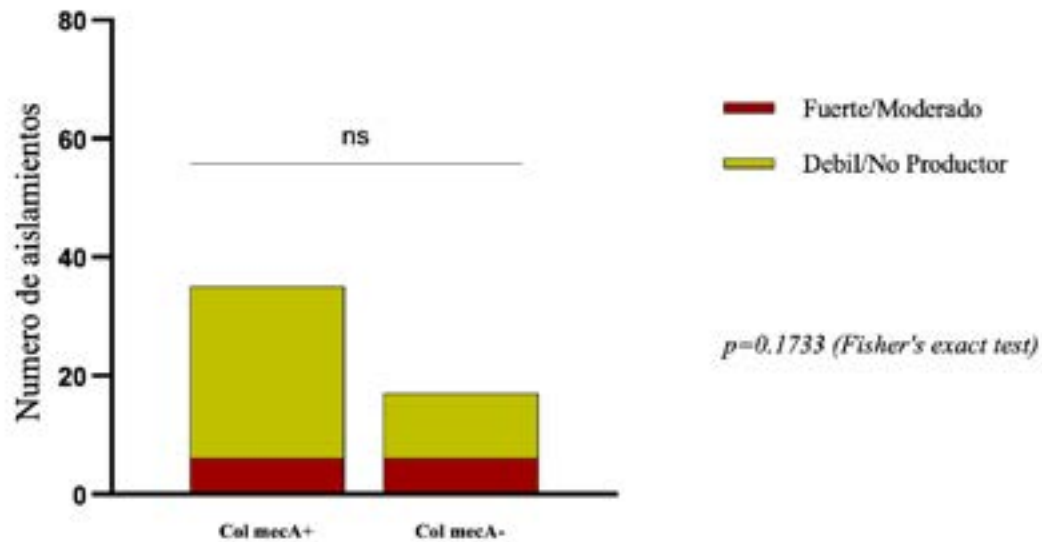
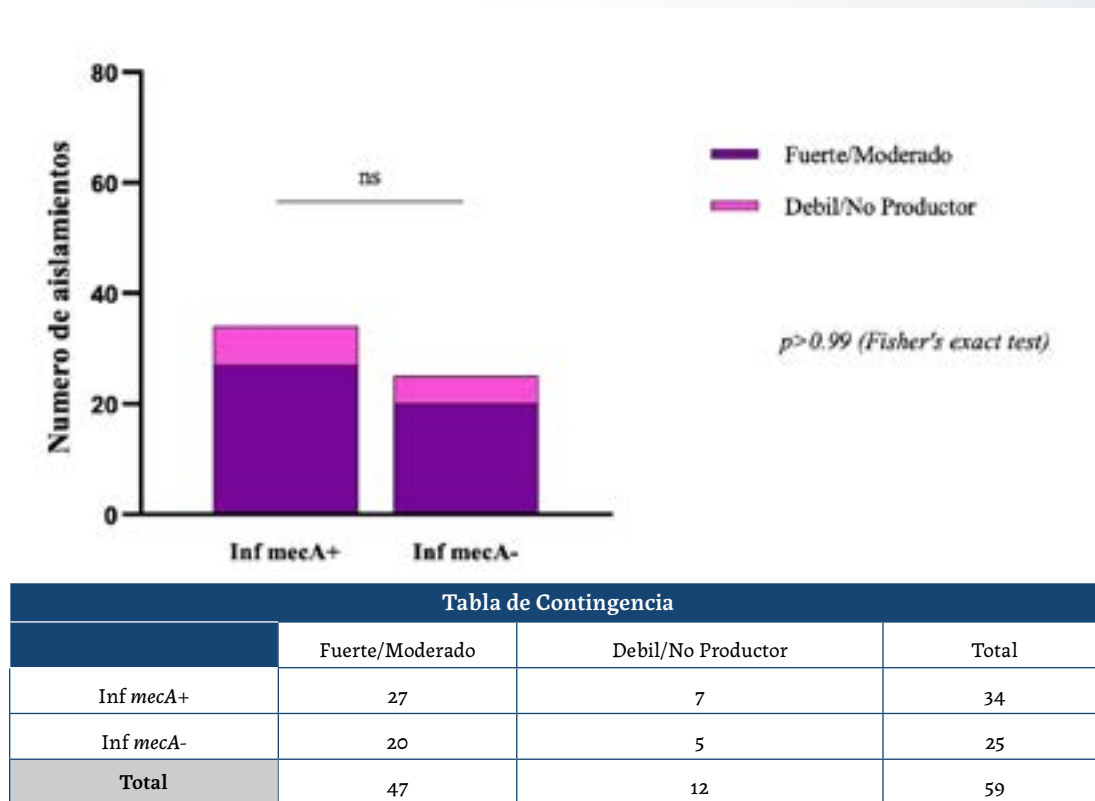


Tabla de Contingencia			
	Fuerte/Moderado	Debil/No Productor	Total
Col <i>mecA</i> +	6	29	35
Col <i>mecA</i> -	6	11	17
Total	12	40	52

Figura 7. Presencia del gen *mecA* en aislamientos de *Staphylococcus aureus* causantes de infecciones según su capacidad de formación de biopelículas. Se observa que la mayoría de las cepas son formadoras fuertes y moderadas de biopelículas y que no existe una diferencia estadísticamente significativa en la capacidad de formación de biopelículas entre cepas positivas y negativas para *mecA*. $p > 0.99$ (Fisher's exact test).



4. Discusión

La formación de biopelículas es un proceso complejo que implica la adhesión de microorganismos a una superficie y la producción de una matriz extracelular. Las biopelículas se encuentran asociadas a estrategias de virulencia y resistencia bacteriana a antibióticos y otros elementos que pudiesen afectar el desarrollo de estos microorganismos (Montes Guevara, 2023).

Los resultados del presente estudio sugieren que la capacidad de formación de biopelículas está relacionada con la capacidad para causar infecciones. La diferencia observada entre los aislamientos infectantes y colonizantes, plantea interrogantes importantes sobre los mecanismos subyacentes que podrían estar impulsando esta disparidad en la formación de biopelículas.

Se sabe que aquellas cepas de *S. aureus* formadoras de biopelículas una vez que se adhieren a los tejidos del huésped, desarrollan una barrera protectora dificultando el acceso de ciertos tipos de células inmunes, como los macrófagos, que muestran una penetración incompleta en la matriz de la biopelícula, lo que resulta en una inhibición de la fagocitosis (Lucas et al., 2021). Además,

las células que conforman las biopelículas exhiben una mayor tolerancia a los antibióticos, lo que contribuye a la resistencia bacteriana y complica el tratamiento de las infecciones por *S. aureus* (Lucas et al., 2021) por lo que el equipo investigador ha considerado que es importante indagar en las interacciones patógeno-paciente mediante futuros estudios que involucren las infecciones y los posibles mecanismos que permitan el establecimiento de biopelículas.

En el 2023 se realizó un estudio de prevalencia y análisis comparativo de genes relacionados con la adhesión y las biopelículas en aislamientos de *S. aureus*, el cual demostró que el gen *ClfB* tuvo la prevalencia más alta con un (p -estimación = 85,4) indicando que el 85.4 % de los aislamientos de *S. aureus* estudiados poseían este gen (Sharifi et al., 2023).

Como se observó, en los resultados del presente estudio este gen prevaleció en la gran mayoría de los aislamientos, lo que concuerda con los resultados reportados por Sharifi et al (Sharifi et al., 2023).

En el 2016 se realizó un estudio en donde se estableció la distribución de genes de adhesión y regulación de biopelículas en cepas tanto sensibles como resistentes a meticilina y se encontró que *ClfB* estaba presente en ambos grupos (Cruz Martínez et al., 2016). En el presente estudio también se encontró que este gen estuvo presente tanto en las cepas resistentes como en las sensibles, lo que sugiere que *ClfB* no está relacionado con el perfil de resistencia bacteriano, esto último está soportado por los resultados que demostraron que no existe una relación estadísticamente significativa entre la resistencia a la meticilina y el gen *ClfB*.

Varios estudios incluyen a la proteína *ClfB* como una de las precursoras de biopelículas de *S. aureus* (JingYi et al., 2024; Shahrokh et al., 2024). Esta observación plantea una serie de interrogantes que subrayan la importancia de investigar cómo esta proteína puede interactuar con otras e incluso cómo se regula la expresión de la misma.

Así mismo, se sugiere analizar otros factores determinantes en el establecimiento de biopelículas fuertes que se deben estudiar más a fondo ya que no necesariamente una bacteria que posea el gen *clfb* tendría la capacidad de establecer biopelículas. Sin embargo, se requieren más investigaciones robustas para entender mejor esta dinámica bacteriana.

5. Conclusión

La capacidad de formación de biopelículas en cepas de *S. aureus* está estrechamente relacionada con su virulencia y resistencia a los tratamientos antibióticos. Aunque no se ha observado una asociación directa entre la presencia de *ClfB*, la resistencia a la metilina y las biopelículas, los resultados destacan la complejidad de las interacciones genéticas subyacentes a la formación de biopelículas en esta bacteria patógena. Por lo tanto, el equipo investigador ha coincidido en que se requiere una investigación más profunda para dilucidar los mecanismos moleculares precisos mediante los cuales la proteína *ClfB* y otros factores, interactúan en la formación de biopelículas. Estas investigaciones pueden proporcionar una comprensión más completa de la patogénesis de *S. aureus* y orientar el desarrollo de terapias más efectivas contra las infecciones asociadas a biopelículas.

6. Consideraciones éticas

Para cada uno de los sujetos incluidos en este estudio se mantuvo de manera estricta la confidencialidad de sus identidades, las cuales solo fueron utilizadas para la elaboración de bases de datos usadas estrictamente para el desarrollo de esta investigación.

En este trabajo se utilizaron los aislamientos de *S. aureus* obtenidos de pacientes pediátricos infectados y niños colonizados, que fueron previamente obtenidos en el marco de proyectos financiados por la Universidad de Cartagena y Colciencias.

Los riesgos para el paciente se consideran mínimos, de acuerdo a la resolución 8430 de 1993 del Ministerio de la Protección Social de Colombia.

7. Referencias

- Abraham, N. M., & Jefferson, K. K. (2012). Staphylococcus aureus clumping factor B mediates biofilm formation in the absence of calcium. *Microbiology*, 158(6), 1504-1512.
- Araya, S., Galeano, F., Amarilla, S., González, N., Apodaca, S., Lovera, D., & Arbo, A. (2019). Factores pronósticos de gravedad de las infecciones invasivas por Staphylococcus aureus adquiridas en la comunidad en niños. *Archivos argentinos de pediatría*, 117(6), 381-387.
- Bettin, A., Causil, C., & Reyes, N. (2012). Molecular identification and antimicrobial susceptibility of Staphylococcus aureus nasal isolates from medical students in Cartagena, Colombia. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16, 329-334.
- Blomseth, N. B. (2023). Molecular characterization and whole genome epidemiology of Staphylococcus aureus strains NTNU].

- Burbano Moscoso, M. (2023). Comparación de métodos de extracción de ADN para la identificación de la microbiota bacteriana presente en los caparazones de las tortugas de Galápagos (*Chelonoidis* Spp.) En las islas Santa Cruz e Isabela Universidad del Azuay].
- Ccala Checya, M. H., & Condor Herrada, E. E. (2024). Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de la flor de plátano isla maleño (*Musa paradisiaca* linneo) sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
- Ccorimanya De La Cruz, Y. P. (2024). Prevalencia de portadores nasales de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en personal de salud del Hospital de Apoyo Jesús Nazareno-Ayacucho, 2022.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *science*, 284(5418), 1318-1322.
- Cruz Martínez, S. F., Tapia Pastrana, G., & Castañón Sánchez, C. A. (2016). Distribución de genes de adhesión y regulación de biofilm en *Staphylococcus aureus*. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 50(4), 713-720.
- Dyzenhaus, S., Sullivan, M. J., Albuquerque, B., Boff, D., van de Guchte, A., Chung, M., Fulmer, Y., Copin, R., Ilmain, J. K., & O'Keefe, A. (2023). MRSA lineage USA300 isolated from bloodstream infections exhibit altered virulence regulation. *Cell host & microbe*, 31(2), 228-242. e228.
- Foster, T. J. (2024). Cell Wall-Anchored Surface Proteins of *Staphylococcus aureus*. In *Staphylococcus aureus: Interplay between Bacteria and Hosts* (pp. 41-80). Springer.
- Ganesh, V. K., Barbu, E. M., Deivanayagam, C. C., Le, B., Anderson, A. S., Matsuka, Y. V., Lin, S. L., Foster, T. J., Narayana, S. V., & Höök, M. (2011). Structural and biochemical characterization of *Staphylococcus aureus* clumping factor B/ligand interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 286(29), 25963-25972.
- González Villalobos, E. (2023). Tipificación del locus *agr* y otros rasgos fenotípicos de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina, obtenidos de cultivos respiratorios y hemocultivos, en el Hospital San Rafael de Alajuela, durante el primer semestre del año 2022.
- Hayles, A., Bright, R., Nguyen, N. H., Truong, V. K., Vongsivut, J., Wood, J., Kidd, S. P., & Vasiliev, K. (2024). *Staphylococcus aureus* surface attachment selectively influences tolerance against charged antibiotics. *Acta Biomaterialia*, 175, 369-381.
- Hou, W., Kang, S., Chang, J., Tian, X., & Shi, C. (2022). Correlation analysis between GlpQ-regulated degradation of wall teichoic acid and biofilm formation triggered by lactobionic acid in *Staphylococcus aureus*. *Foods*, 11(21), 3438.

- Howden, B. P., Giulieri, S. G., Wong Fok Lung, T., Baines, S. L., Sharkey, L. K., Lee, J. Y., Hachani, A., Monk, I. R., & Stinear, T. P. (2023). *Staphylococcus aureus* host interactions and adaptation. *Nature Reviews Microbiology*, 1-16.
- Humeniuk, N., Zelena, L., Vrynchanu, N., Ishchenko, L., Bukhtiarova, T., Korotkij, Y., & Vazhnichaya, E. (2023). Effect of adamantane derivative on expression of biofilm-associated genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Medicine in Drug Discovery*, 18, 100155.
- JingYi, Y., Weihua, H., Yanlei, X., Li, S., Jiao, Z., Yinjuan, G., Fangyou, Y., Huilin, Z., & Yanghua, X. (2024). Biofilm-producing ability of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinically isolated in China.
- Kang, X., Ma, Q., Wang, G., Li, N., Mao, Y., Wang, X., Wang, Y., & Wang, G. (2022). Potential mechanisms of quercetin influence the *ClfB* protein during biofilm formation of *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 825489.
- Kaushik, A., Kest, H., Sood, M., Steussy, B. W., Thieman, C., & Gupta, S. (2024). Biofilm Producing Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Infections in Humans: Clinical Implications and Management. *Pathogens*, 13(1), 76.
- Koreen, L., Ramaswamy, S. V., Naidich, S., Koreen, I. V., Graff, G. R., Graviss, E. A., & Kreiswirth, B. N. (2005). Comparative sequencing of the serine-aspartate repeat-encoding region of the clumping factor B gene (*clfB*) for resolution within clonal groups of *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology*, 43(8), 3985-3994.
- Lasa, I., Del Pozo, J., Penadés, J. R., & Leiva, J. (2005). Biofilms bacterianos e infección. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*,
- Lowy, F. D. (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *New England journal of medicine*, 339(8), 520-532.
- Lucas, G. V. S., Jaime, K. E. C., & Parrales, E. N. L. (2021). *Staphylococcus aureus*: factores asociados a su hipervirulencia y adhesión y formación de biopelículas. *Polo del Conocimiento: Revista científico-profesional*, 6(9), 1826-1860.
- Mamani, E., Luján, D., & Pajuelo, G. (2006). Perfil de sensibilidad y resistencia de *Staphylococcus aureus*: Experiencia en el Hospital Nacional Hipólito Unanue. *Anales de la Facultad de Medicina*,
- Montes Guevara, O. A. (2023). Caracterización de factores inmunológicos y microbiológicos asociados a la colonización e infección por *Staphylococcus aureus* Universidad de Cartagena].
- Montes, O., Hernández, J., Correa, O., Reyes, J., Pinzon, H., & Reyes, N. (2021). Clonal Distribution and Antibiotic Susceptibility of *Staphylococcus aureus* from Pediatric Patients: 8-Year Trends in a Children's Hospital in Colombia. *Journal of Tropical Pediatrics*, 67(6), fmab105.

- Moormeier, D. E., & Bayles, K. W. (2017). *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Molecular microbiology*, 104(3), 365-376.
- Oliván, P. M., Monleón, S. F., Martínez, J. R. B., Luna, A. P., Monleón, I. H., Latasa, C. F., Ortega, D. N., & Rodríguez, J. C. (2024). Prevalencia y factores de riesgo de infección por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en niños. *Revista Española de Quimioterapia*, 37(2), 170-175.
- Paharik, A. E., & Horswill, A. R. (2016). The staphylococcal biofilm: adhesins, regulation, and host response. *Virulence mechanisms of bacterial pathogens*, 529-566.
- Palacios Bonilla, A. M. (2023). Identificación de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina en los profesionales de la salud del Cantón Pillaro [Informe de investigación].
- Patel, H., & Rawat, S. (2023). A genetic regulatory see-saw of biofilm and virulence in MRSA pathogenesis. *Frontiers in microbiology*, 14, 1204428.
- Pinilla, G., Bautista, A., Cruz, C., Chavarro, B., Navarrete, J., Muñoz, L., & Gutiérrez, J. (2017). Determinación de factores de adhesión asociados a la formación de biopelícula en aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. *nova*, 15(27), 67-75.
- Reyes Ramos, N. d. I. M., & Suárez Alvarez, P. I. (2008). Determinación de la prevalencia de portadores nasales de *Staphylococcus aureus* en residentes de del hogar asilo de ancianos San Pedro Claver de la ciudad de Cartagena de indias durante el segundo semestre del año 2007 [Universidad de Cartagena].
- Rodríguez Tamayo, E. A., & Jiménez Quiceno, J. N. (2015). Factores relacionados con la colonización por *Staphylococcus aureus*. *Iatreia*, 28(1), 66-77.
- Shahrokh, S., Tabatabaee, A., Yazdi, M., & Siavash, M. (2024). Proportion of toxin and non-toxin virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolates from diabetic foot infection: a systematic review and meta-analysis. *BMC microbiology*, 24(1), 1.
- Sharifi, A., Mahmoudi, P., & Sobhani, K. (2023). The prevalence and comparative analysis of adhesion and biofilm-related genes in *Staphylococcus aureus* isolates: A network meta-analysis.
- Sohail, M., Muzzammil, M., Ahmad, M., Rehman, S., Garout, M., Khojah, T. M., Al-Eisa, K. M., Breagesh, S. A., Hamdan, R. M. A., Alibrahim, H. I., Alsoliabi, Z. A., Rabaan, A. A., & Ahmed, N. (2023). Molecular Characterization of Community- and Hospital- Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates during COVID-19 Pandemic. *Antibiotics*, 12(1), 157. <https://www.mdpi.com/2079-6382/12/1/157>
- Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Bonaventura, G. D., Djukić, S., Ćirković, I., & Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis*, 115(8), 891-899.

- Tomlinson, B. R., Malof, M. E., & Shaw, L. N. (2021). A global transcriptomic analysis of *Staphylococcus aureus* biofilm formation across diverse clonal lineages. *Microbial genomics*, 7(7), 000598.
- Tristan, A., Ying, L., Bes, M., Etienne, J., Vandenesch, F., & Lina, G. (2003). Use of multiplex PCR to identify *Staphylococcus aureus* adhesins involved in human hematogenous infections. *Journal of clinical microbiology*, 41(9), 4465-4467.
- Tuon, F. F., Suss, P. H., Telles, J. P., Dantas, L. R., Borges, N. H., & Ribeiro, V. S. T. (2023). Antimicrobial Treatment of *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Antibiotics*, 12(1), 87. <https://www.mdpi.com/2079-6382/12/1/87>
- Uehara, Y. (2022). Current status of staphylococcal cassette chromosome mec (SCC mec). *Antibiotics*, 11(1), 86.
- Will, I. F. (2004). Estudio de la regulacion de la expresion del gen regulatorio sae en *Staphylococcus aureus*.
- Yamazaki, Y., Ito, T., Tamai, M., Nakagawa, S., & Nakamura, Y. (2024). The role of *Staphylococcus aureus* quorum sensing in cutaneous and systemic infections. *Inflammation and Regeneration*, 44(1), 9.
- Yépez, G. (2019). Prevalencia de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en mucosa nasal del Centro Médico Familiar Integral y de Especialidades, Diálisis “La Mariscal”, 2018. *Jurnal Kajian Pendidikan Ekonomi dan Ilmu Ekonomi*.
- Zapata Acosta, J. S. (2024). Evaluación de expresión génica de biopelículas en comunidades de *E. Coli* por estrés, a partir de microscopía de hoja de luz.
- Zapata Gelvez, M. J. (2021). Caracterización de factores clínicos, fenotípicos y genotípicos de las bacteriemias estafilocócicas en una población pediátrica de la ciudad de Cartagena, Colombia.