



**FACULTAD DE FARMACIA  
ESCUELA DE QUÍMICA Y FARMACIA  
MAGISTER EN ANÁLISIS CLÍNICO**

**TRABAJO FINAL DE GRADO**

**Prevalencia y caracterización de *Staphylococcus aureus* y sus  
variantes de colonias pequeñas aisladas de pacientes con  
fibrosis quística controlados en el Hospital Dr. Gustavo Fricke,  
2022-2023**

**TM. Juan Ignacio Alarcón Villalobos**

**DIRECTORAS:**

**Dra. BQ. Carmen Aravena Molló**

**Dra. QF. Caroline Weinstein Oppenheimer**

**2024**

## Agradecimientos

Al llegar a la conclusión de esta etapa tan importante de mi vida académica, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a quienes fueron fundamentales en el desarrollo y culminación de este proyecto.

En primer lugar, mi profunda gratitud a mi tutora, la **Dra. Caroline Weinstein Oppenheimer**, cuya sabiduría, paciencia y apoyo incondicional han sido pilares esenciales en este camino. Su guía experta y compromiso con la excelencia no solo enriquecieron este trabajo, sino que aportaron en mi formación profesional y personal.

Agradezco especialmente a la **Dra. Carmen Aravena Molló**, por su experiencia, conocimientos y pasión por la microbiología, que han sido una fuente constante de inspiración.

Extiendo mi agradecimiento a colegas, amigos y compañeros que me apoyaron durante este proceso. Sus consejos, aliento y amistad fueron un refugio invaluable en los momentos más desafiantes.

A **Fernanda**, mi pilar y motivación diaria, cuya confianza en mí me inspira a ser mejor cada día.

Agradezco también a quienes compartieron su conocimiento y experiencia. Cada conversación y colaboración enriquecieron este trabajo y mi crecimiento académico.

Finalmente, a mi familia, cuyo amor, comprensión y apoyo incondicional fueron mi motor para avanzar y no perder de vista mis metas.

Gracias por la paciencia y comprensión en los momentos difíciles, necesarios para seguir adelante.

## Índice

	<b>Página</b>
<b>Resumen</b> .....	5
<b>Abstract</b> .....	6
<b>1.Introducción</b> .....	8
1.1 Etiología y epidemiología de la fibrosis quística .....	8
1.2 Patogenia y clínica de la enfermedad .....	9
1.3 Sintomatología .....	10
1.4 Diagnóstico clínico .....	11
1.5 Tratamiento .....	11
1.6 Generalidades de <i>S.aureus</i> .....	11
<b>2. Objetivo general</b> .....	16
2.2 Objetivos específicos .....	16
<b>3.Metodología</b> .....	16
3.1 Tipo de estudio .....	16
3.2 Cepas bacterianas .....	17
3.3 Población estudiada, ética, criterios de inclusión y exclusión .....	17
3.4 Técnicas de recolección de información .....	18
3.5 Susceptibilidad antimicrobiana .....	19
3.6 Formación de Biofilm .....	21
3.7 Genes de virulencia .....	22
<b>Tabla 1</b> .....	23
<b>4.Resultados</b> .....	24
4.1 <i>S.aureus</i> y VCPs .....	24

<b>Tabla 2</b> .....	25
<b>Figura 1</b> .....	26
<b>Figura 2</b> .....	27
<b>Figura 3</b> .....	27
4.2 Susceptibilidad antibiótica y formación de biofilm .....	28
<b>Figura 4</b> .....	30
<b>Tabla 3</b> .....	31
<b>Figura 5</b> .....	32
<b>Figura 6</b> .....	33
<b>Figura 7</b> .....	34
4.3 Detección de genes de virulencia .....	35
<b>Figura 8</b> .....	35
<b>Figura 9</b> .....	36
<b>Figura 10</b> .....	36
<b>5.Discusión</b> .....	37
<b>6.Conclusión</b> .....	43
<b>7.Referencias bibliográficas</b> .....	44
<b>8.Anexos</b> .....	52

## Resumen

**Antecedentes:** La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad caracterizada por infecciones pulmonares crónicas que afecta calidad de vida. *Staphylococcus aureus* tiene un rol importante, reconociendo sus variantes de colonias pequeñas (VCPs) como una forma virulenta y persistente. En el Hospital Dr. Gustavo Fricke, Viña del Mar se controlan cerca de 80 pacientes. Se desconocen las características de *S. aureus* que infectan a estos pacientes, como la resistencia antimicrobiana, genes de virulencia y formación de biofilm.

**Objetivo:** Determinar la prevalencia y la caracterización de cepas de *S. aureus* y *S. aureus* VCPs de pacientes con FQ.

**Metodología:** Estudio descriptivo, transversal y observacional donde participaron 40 pacientes con FQ entre 2022 y 2023. Se identificó *S. aureus* con técnicas microbiológicas, se midió susceptibilidad antimicrobiana por método de difusión en agar, la formación de biofilm por cristal violeta y genes de virulencia por PCR (*spa*, *pvl*, *mecA*).

**Resultados:** Se aislaron 27 cepas de *S.aureus* y 4 cepas con fenotipo VCPs resultando una prevalencia de 67,5% y 10% respectivamente. Las cepas fueron resistentes a penicilina (89%), eritromicina y azitromicina (50%), y 2 cepas (11%) se identificaron como *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM) y una de estas VCPs. Los perfiles de resistencia fueron heterogéneos con 22 % de cepas multirresistente. 74% de las cepas tuvo alta producción de biofilm, destacando las cepas SARM y VCPs ( $p<0,05$ ). Todas las cepas de *S. aureus* fueron positivas para *spa*, 4 para *pvl* y 2 para *mecA*.

**Conclusión:** La prevalencia de *S. aureus* y VCPs fue similar reportes internacionales. Se destaca una alta resistencia a macrólidos, pero baja multirresistencia. La alta producción de biofilm sugiere un papel clave en la patogenicidad. Los genes *pvl* y *mecA* fueron poco frecuentes. Este es uno de los primeros estudios de este tipo en la región.

## **Abstract**

**Background:** Cystic fibrosis (CF) is a disease characterized by chronic pulmonary infections that affect patients' quality of life. *Staphylococcus aureus* plays an important role, with small colony variants (SCVs) recognized as a virulent and persistent form of this pathogen. At Dr. Gustavo Fricke Hospital in Viña del Mar, approximately 80 patients are treated. The characteristics of *S. aureus* infecting these patients, including antimicrobial resistance, virulence genes, and biofilm production, remain unknown.

**Objective:** To determine the prevalence and characterization of *S. aureus* and *S. aureus* SCV strains in CF patients.

**Methodology:** This was a descriptive, cross-sectional, and observational study involving 40 CF patients between 2022 and 2023. *S. aureus* was identified using microbiological techniques, antimicrobial susceptibility was assessed via agar diffusion, biofilm production was quantified using crystal violet staining, and virulence genes (*spa*, *pvl*, *mecA*) were detected by PCR.

**Results:** A total of 27 *S. aureus* strains and 4 SCV strains were isolated, with a prevalence of 67.5% and 10%, respectively. The strains were resistant to penicillin (89%), erythromycin, and azithromycin (50%). Two strains (11%) were identified as methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), one of which was an SCV. Resistance profiles were heterogeneous, with 22% of the strains classified as multidrug-resistant. Biofilm production was high in 74% of the strains, notably in MRSA and SCV strains ( $p < 0.05$ ). All *S. aureus* strains were positive for *spa*, 4 for *pvl*, and 2 for *mecA*.

**Conclusion:** The prevalence of *S. aureus* and SCVs was similar to international reports. High resistance to macrolides but low multidrug resistance was observed. Elevated biofilm

production suggests a key role in pathogenicity. *Pvl* and *mecA* genes were infrequent. This study stands out as one of the first in the region.

## **1.Introducción**

### **1.1 Etiología y epidemiología de fibrosis quística**

La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad genética autosómica recesiva común causada por una mutación en el gen CFRT ubicado en el cromosoma 7q31.2, que codifica la proteína reguladora de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (en inglés Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator, CFTR)(López-Valdez *et al.*, 2021). La proteína CFTR es un canal de cloro que regula el transporte de iones cloro y bicarbonato en las células epiteliales, manteniendo el equilibrio iónico y la hidratación del moco. También modula otros canales iónicos, como el canal de sodio, influyendo en la viscosidad de las secreciones y en la respuesta inmunitaria (Schwiebert *et al.*, 1998). Algunas mutaciones en esta proteína provocan la ausencia o el mal funcionamiento de los canales de cloruro en la membrana apical de células de la superficie pulmonar o epitelio glandular, dando como resultado la formación de moco espeso y pegajoso, esto último explica las diferentes manifestaciones pulmonares, específicamente enfermedad pulmonar obstructiva crónica y progresiva, sinusitis, malabsorción debido a insuficiencia pancreática exocrina que conduce a desnutrición, enfermedad hepática (cirrosis biliar) y FQ relacionada con diabetes mellitus (Dickinson *et al.*, 2021).

Esta enfermedad hereditaria es más prevalente en personas blancas con ascendencia del norte de Europa, siendo su incidencia de 1 en 2000-3000 nacimientos y menos en asiáticos-americanos de 1:3000 individuos (Rafeeq *et al.*, 2017).

En Chile, dada la diversidad racial y mestizaje existente y haciendo referencia a estudios previos se estima una incidencia aproximada de 1 en 8000 a 10000 recién nacidos vivos y al 31 de diciembre del 2017 había 490 pacientes vivos recibiendo atención en el programa de garantías explícitas en salud (GES) mediante FONASA, con una esperanza de vida

cercana a los 30 años según las orientaciones técnicas para la atención de FQ (Boza C. *et al.*, 2020).

## **1.2 Patogenia y clínica de la enfermedad**

La FQ es un trastorno multisistémico que resulta de variantes patogénicas en el gen CFTR, se hereda de forma autosómica recesiva, del cual se han identificado cerca de 2000 mutaciones diferentes (McCague *et al.*, 2019), las que se clasifican en 7 grupos distintos que reflejan anomalías en la síntesis, estructura y función de la proteína CFTR. La mutación más común es la delección de fenilalanina en la posición 508 que es una mutación de clase 2, lo que significa que se sintetiza la proteína CFTR, pero el mal plegamiento de la proteína evita que esta llegue a la superficie celular, lo que se denomina “defecto de tráfico” en la biosíntesis proteica (Lentini N. *et al.*, 2014). Las mutaciones específicas de CFTR que porta un individuo determinan la cantidad de proteína CFTR funcional presente y se correlacionan parcialmente con la gravedad fenotípica y la afectación de órganos (Lay-Son *et al.*, 2010).

## **1.3 Sintomatología**

Los síntomas en el paciente pueden variar según la edad en que se manifiesten las infecciones pulmonares y sinusales recurrentes, esteatorrea y desnutrición, lo que puede llevar a un retraso en el desarrollo del paciente (Accurso *et al.*, 2005). Específicamente en los pulmones, el taponamiento mucoso de las secreciones espesas provoca inflamación, infección crónica, obstrucción progresiva de las vías respiratorias pequeñas y el desarrollo de bronquiectasias (agrandamiento anormal y permanente de los bronquios). La bronquiectasia conlleva a una disminución de la capacidad para eliminar las secreciones, lo cual provoca un aumento en la tasa de infecciones, esto dilata y daña aún más las vías respiratorias (Antonio Cordero Araya *et al.*, 2020). Además, los efectos de la disminución o la ausencia de la función de los canales de cloruro pueden provocar una disfunción en

varios otros sistemas y órganos. La afectación pancreática incluye tanto la insuficiencia pancreática exocrina, que da como resultado malabsorción de grasas, proteínas y carbohidratos y la subsiguiente desnutrición, como la insuficiencia de insulina y el desarrollo de diabetes relacionada con FQ (Cano Megías *et al.*, 2015).

En bebés y niños pequeños, la FQ puede manifestarse en el útero como intestino hiperecogénico o dilatado, y después del nacimiento con íleo meconial, presente en el 11,9% de los lactantes con FQ, que puede causar distensión abdominal y perforación intestinal en el 30% de los casos. El prolapso rectal afecta al 20% de los niños no tratados, y otras complicaciones incluyen ictericia prolongada, estasis biliar y deficiencia de vitamina K. Durante la infancia, pueden presentarse desnutrición, síndrome de agotamiento de sal y problemas respiratorios como sinusitis y bronquiectasias. Además, más del 98% de los hombres con FQ son infértiles debido a la ausencia de los conductos deferentes. Las secreciones espesas en la FQ favorecen infecciones bacterianas recurrentes, agravando los síntomas respiratorios y gastrointestinales (Crespo González *et al.*, 2021).

#### **1.4 Diagnóstico clínico**

El diagnóstico de FQ debe realizarse lo antes posible para optimizar el pronóstico del paciente. La detección temprana mejora el pronóstico el cual se debe realizarse con el tamizaje neonatal o ante la sospecha clínica. El test de sudor es el examen para hacer la confirmación diagnóstica.

En casos donde la prueba del sudor no es concluyente o la muestra de sudor es insuficiente, se puede evaluar la función pancreática con la elastasa fecal (Boza C. *et al.*, 2020).

Para un diagnóstico más preciso, especialmente en casos de duda diagnóstica o cuando el test del sudor resulta ambiguo, es esencial realizar un estudio genético (Gartner *et al.*, 2019).

Una vez confirmado el diagnóstico de FQ, el paciente debe ser remitido a un centro multidisciplinario especializado.

El seguimiento riguroso y multidisciplinario, junto con la intervención temprana y el diagnóstico preciso, contribuye a mejorar la calidad de vida y los pronósticos de los pacientes con FQ, permitiéndoles manejar de manera eficaz los síntomas y las complicaciones asociadas a esta condición crónica (Fernández *et al.*, 2012).

### **1.5 Tratamiento**

Actualmente, los tratamientos existentes para tratar la FQ están diseñados para controlar sus síntomas, consistentes principalmente en retención de moco e infección crónica. Para el tratamiento de la infección pulmonar se considera si es primoinfección, infección intermitente o crónica, y es ahí donde la finalidad del tratamiento va a ser la erradicación bacteriana, manejo como primo infección o simplemente la disminución de la carga bacteriana sin negativizar los cultivos (Boza. *et al.*, 2020).

También la introducción de moduladores de CFTR ha logrado un gran éxito terapéutico (Vargas-Roldán *et al.*, 2022). Estos moduladores entregan una alternativa de tratamiento dirigido que permite un mejor manejo de la enfermedad, hasta la fecha existen 2 compuestos. Los potenciadores que incrementan la actividad CFTR y mejoran el transporte de iones, y los correctores que mejoran el procesamiento del CFTR y dirigen su transcrito hacia la membrana plasmática (Esposito *et al.*, 2023).

### **1.6 Generalidades de *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* es un colonizador común de la población humana y un importante patógeno oportunista que causa morbilidad y mortalidad significativa a nivel mundial. Coloniza persistentemente el 20-30% de los humanos, principalmente en la nariz, pero también en la piel, garganta, axilas, ingle e intestino. Aunque la colonización es

generalmente inofensiva, representa un riesgo para desarrollar infecciones graves como osteomielitis, bacteriemia, neumonía y endocarditis. Las infecciones pueden ser agudas, recurrentes o crónicas. *S. aureus* utiliza diversos factores de virulencia y mecanismos de evasión inmunitaria para persistir y causar infecciones, complicando el tratamiento y resaltando la necesidad de comprender mejor su relación con los humanos para desarrollar terapias efectivas (Howden *et al.*, 2023).

Además, este patógeno de conocida variabilidad genética, lo que significa, que si bien codifica genes y características propias de la especie puede adquirir un genoma variable aumentando así su virulencia como son algunas toxinas: Leucocidina de Panton-Valentine, toxina exfoliativa, enterotoxinas, genes de resistencia a los antimicrobianos y toxina de shock tóxico entre otros (Cervantes-García *et al.*, 2014).

Las variantes de colonia pequeña (VCP) son una característica descrita en una amplia variedad de géneros y especies bacterianas. Estas variantes han sido identificadas en algunos de los microorganismos más frecuentemente implicados en infecciones comunitarias y hospitalarias, como *S. aureus*, tanto en cepas sensibles como resistentes a meticilina (Chaves, 2014).

*S. aureus* es uno de los patógenos más aislados en las vías respiratorias de pacientes con FQ, junto con *Pseudomonas aeruginosa*, su presencia adquiere mayor relevancia cuando se trata de cepas resistentes a meticilina (SARM). Las infecciones causadas por SARM en individuos con FQ se relacionan con una reducción acelerada de la función pulmonar, una mayor morbilidad y una menor supervivencia, en comparación con pacientes con FQ no colonizados por dicha bacteria, asociándose a una severa disfunción pulmonar (Wolter *et al.*, 2019, Boudet *et al.*, 2021).

En ocasiones *S. aureus* puede presentarse como un patógeno multidrogoresistente (MDR) de gran relevancia en infecciones tanto adquiridas en la comunidad como en entornos

hospitalarios (Duin *et al.*, 2016). Su capacidad de desarrollar resistencia a múltiples clases de antibióticos compromete significativamente las opciones terapéuticas disponibles y aumenta la carga clínica y económica asociada a sus infecciones. La resistencia en *S. aureus* se debe a diversos mecanismos, incluyendo la producción de  $\beta$ -lactamasas, la modificación de dianas antibióticas, la disminución de la permeabilidad de la membrana y la sobreexpresión de bombas de eflujo como *NorA*, que reducen la concentración intracelular de antimicrobianos, facilitando la supervivencia bacteriana (Kumar *et al.*, 2023). Si bien los primeros patógenos bacterianos que se aíslan en pacientes con FQ son *S. aureus* y *Haemophilus influenzae*, a medida que avanza la edad los pacientes adquieren *Pseudomonas aeruginosa* lo cual toma protagonismo durante el resto de su vida. También se ha demostrado la presencia por colonización de *Burkholderia cenocepacia*, que contribuye al deterioro de la función pulmonar. Igualmente, estos pacientes pueden ser colonizados por *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, micobacterias no tuberculosas y hongos (Vargas-Roldán *et al.*, 2022).

Adicionalmente, en el transcurso de infecciones pulmonares crónicas en pacientes con FQ, *S. aureus* podrían experimentar transformaciones en su genoma. Estos cambios se encuentran directamente vinculados con la movilización de bacteriófagos, lo cual lleva a que estos transporten factores de virulencia complementarios, tales como las toxinas (Goerke *et al.*, 2010).

Las VCP han sido identificadas en una amplia variedad de muestras clínicas, incluyendo exudados purulentos de infecciones de piel y tejidos blandos, especialmente abscesos, muestras de sangre, tejidos óseos y articulares, así como secreciones del tracto respiratorio. Se cree que la presencia de estas variantes en muchas especies bacterianas es un mecanismo natural de supervivencia en ciertas circunstancias. Sin embargo, es

importante destacar que no se ha encontrado un mecanismo genético común que explique estos fenotipos especiales en diferentes especies (Chaves, 2014).

Las VCP de *S. aureus* se caracterizan por su crecimiento lento y la morfología puntiforme de sus colonias en agar sangre, generalmente con pigmentación reducida y ausencia de beta-hemólisis. En algunos casos, estas colonias pueden coexistir con aquellas de aspecto normal o presentar una morfología distintiva similar a un "huevo frito". Además, las VCP suelen mostrar una actividad reducida en pruebas bioquímicas clave para la identificación de *S. aureus*, como la actividad coagulasa y la fermentación de manitol (Delgado-Valverde *et al.*, 2014).

Estas variantes pueden surgir debido a mutaciones espontáneas o inducidas por la exposición a antibióticos, afectando genes implicados en la biosíntesis de menadiona, hemina o timidina, compuestos esenciales para la cadena transportadora de electrones y la síntesis de ADN. En contraste con las colonias típicas de *S. aureus*, que tras 24 h en agar sangre alcanzan un diámetro de 3-5 mm con una apariencia lisa, cremosa y pigmentada de amarillo a amarillo anaranjado, las VCP mantienen un tamaño reducido, un crecimiento lento y alteraciones en la expresión de pigmentos y hemólisis.

Dado que las VCP suelen estar asociadas a infecciones crónicas, su identificación en medios de cultivo es crucial. Se ha descrito que el uso de medios suplementados con sustratos mencionados anteriormente, como hemina, menadiona o timidina, puede revertir sus características fenotípicas y restaurar el crecimiento normal de las colonias (Kahl, 2014).

Se han aislado VCP de *S. aureus* en diversas muestras clínicas correspondientes a una amplia variedad de infecciones. Sin embargo, existen ciertas situaciones clínicas en las que se han descrito con mayor frecuencia. Una de ellas son las infecciones respiratorias en

pacientes con FQ. Esto se debe a la exposición prologada de tratamiento con trimetropim-sulfametoxazol (Wolter *et al.*, 2013).

### **Biofilm**

Se ha encontrado que la formación de biofilm es un rasgo de virulencia significativa en *S. aureus*, así como un mecanismo crítico para la adaptación del patógeno en las vías respiratorias en pacientes con FQ. Estas biopelículas permiten la evasión del sistema inmunológico y ofrecen una protección al patógeno contra el tratamiento con antibióticos. Por lo tanto, el análisis del biofilm y su papel en la virulencia de *S. aureus* podría proporcionar nuevas perspectivas de estudio para el desarrollo de terapias efectivas contra esta bacteria y mejorar el manejo clínico de la FQ. Las cepas de *S. aureus* productoras de biofilm dan cuenta de fracasos al tratamiento (Tahaei *et al.*, 2021). Sin embargo, en cepas de *S. aureus* la formación de biofilm es variable (Hait *et al.*, 2021).

### **Problemática**

La microbiota pulmonar está implicada en la progresión de la enfermedad, siendo relevante el rol de *S. aureus* (Rumpf *et al.*, 2021), reconociendo sus VCPs como una forma virulenta y persistente de este patógeno (Lissarrague *et al.*, 2019), lo que genera fracasos en el tratamiento e infecciones repetición, ya sea por la misma cepa o cepas diferentes de esta bacteria y sus diferentes factores de virulencia.

En la V región de Valparaíso, Chile, en la unidad de FQ (Centro de Referencia nacional de FQ) del Hospital Dr. Gustavo Fricke (UFQ -HGF) se controlan cerca de 80 pacientes adultos y niños, provenientes de diferentes comunas de la región. Sin embargo, se desconocen algunos de los factores microbiológicos asociadas a estos pacientes, como, por ejemplo, ¿Existirán diferencias en la resistencia antimicrobiana, genes de virulencia y capacidad de formar biofilm entre los aislamientos de *S. aureus* en estos de pacientes?, y si ¿estos pacientes presentarán cepas del tipo VCPs?

Este estudio buscó realizar una caracterización de las cepas de *S. aureus* aisladas de los pacientes que aceptaron participar en forma voluntaria lo cual permitió establecer la prevalencia y la caracterización de cepas aisladas de pacientes a la hora de su control (McCague *et al.*, 2019).

## **2.OBJETIVO GENERAL**

Determinar la prevalencia y caracterización de cepas de *Staphylococcus aureus* y sus variantes de colonia pequeña aislados de los pacientes con fibrosis quística controlados en el Hospital Dr. Gustavo Fricke.

### **2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar la prevalencia de *Staphylococcus aureus* y sus variantes de colonia pequeña en muestras de origen pulmonar de pacientes con fibrosis quística que son controlados en la unidad de fibrosis quística del Hospital Dr. Gustavo Fricke.
2. Determinar la susceptibilidad antimicrobiana y la capacidad de formación de biofilm de los aislados de *Staphylococcus aureus* y sus variantes de colonia pequeña de pacientes con fibrosis quística controlados en el Hospital Dr. Gustavo Fricke.
3. Caracterizar los virulotipos de las cepas aisladas de *Staphylococcus aureus* y sus variantes de colonia pequeña en pacientes con fibrosis quística controlados en el HGF, mediante la detección de genes de virulencia (*mecA* y leucocidine Pantón- Valentine).

## **3.METODOLOGÍA**

**3.1 Tipo estudio.** Este es un estudio de tipo descriptivo transversal, observacional y cuantitativo.

**3.2 Cepas bacterianas.** Se estudiaron cepas de *S. aureus* y VCPs aisladas de muestras respiratorias de 40 pacientes con FQ controlados en el HGF, que fueron aisladas en el laboratorio del HGF. La recolección de cepas de *S. aureus* se llevó a cabo en un periodo 4 meses partiendo en diciembre 2022 hasta marzo 2023. Las cepas de *S. aureus* fueron transportadas a temperatura ambiente desde el HGF hasta el laboratorio de investigación de la Universidad de Valparaíso en la Facultad de Medicina Campus San Felipe.

**3.3 Población estudiada, ética, criterios de inclusión y exclusión.** Las cepas de estudio se obtuvieron de pacientes con FQ, cuya edad fluctuó entre 1 y 42 años los que fueron reclutados con el consentimiento informado y con el asentimiento informado para los menores de 18 años. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Servicio de Salud Aconcagua (**Anexo n°1:** Documento de aprobación) y el Comité de Ética de la Universidad de Valparaíso, y autorizado por la dirección del Hospital Dr. Gustavo Fricke/SSVQ (**Anexo n°2:** documento de autorización).

Los datos clínicos de cada control de los pacientes enrolados en el estudio fueron entregados por los clínicos de la UFQ-HGF en forma anonimizada para ser asociados al resultado de presencia o ausencia de *S. aureus* y/o su VCPs. Para los pacientes diagnosticados con FQ y reclutados en este estudio se registró en planillas Excel su rango etario y género.

#### **Criterios de selección de los participantes**

**Criterios de inclusión.** Se incluyeron en el estudio a todos los pacientes con diagnóstico de FQ que se controlan en la unidad de fibrosis quística del HGF, Viña del Mar, que aceptaron participar en el estudio.

**Criterios de exclusión.** Se excluyeron en el estudio pacientes con diagnóstico de FQ, que se controlan en el HGF, Viña del Mar, que no firmaron el consentimiento informado (mayores de 18 años), o el asentimiento informado para los menores de 18 años (El formato

de consentimiento informado y de asentimiento se presenta en el **Anexo n°3**). Además, se excluyó a aquellos pacientes que en el momento del reclutamiento de los sujetos de investigación no tenían confirmación diagnóstica de FQ.

**Cálculo y justificación del tamaño de la muestra.** Dado que se trata de una población de entre 60 a 80 pacientes genéticamente diversa y considerando que, en nuestro país, en los últimos 10 años, no existen estudios en esta población de interés, se invitó a todos los sujetos a participar por lo que no fue necesario realizar el cálculo muestral.

### **3.4 Técnicas de recolección de información.**

**Aislamiento de *S. aureus* desde muestras pulmonares de pacientes con FQ.** En el HGF, la recolección y el procesamiento de muestras respiratorias de pacientes con FQ se llevó a cabo siguiendo el protocolo estandarizado denominado "**Cultivo de muestras de pacientes con diagnóstico de FQ**", en el cual se utilizó MBT Sirius (Bruker Daltonics/Alemania) y Phoenix M50 (Becton, Dickinson and Company/Estados Unidos) para la identificación y susceptibilidad, el que está detallado en el **Anexo N°4**.

**Identificación de *S. aureus* y VCPs.** Tras su traslado desde el HGF al laboratorio de bacteriología y genética molecular de la Universidad de Valparaíso, campus San Felipe. Para la identificación y diferenciación de *S. aureus*, los aislamientos fueron sometidos a una incubación previa en caldo Tripticasa Soya y posteriormente sembrados en agar sal manitol y agar sangre. Además, se realizó una prueba de coagulasa para confirmar su identidad. El procedimiento se realizó en base al protocolo estandarizado del HGF, detallado en el **Anexo N°4**. Las cepas fueron incubadas a 35-37°C en una estufa Elos Breed modelo B11OF230 (Italia) para su caracterización microbiológica.

**Procedimiento.** Luego de la incubación previa de 24h a 35-37°C se sembró en agar sangre columbia y sal manitol por la técnica de estría en placa. Se observaron a las 24h de incubación y se les realizó la prueba de la coagulasa en tubo, la observación de colonias

amarillas indicó fermentación de manitol, característica de *S. aureus*. Las cepas positivas para coagulasa fueron sembradas en agar Trypticase soya para su preservación en ceparios, los cuales se almacenaron a temperatura ambiente, cada aislamiento fue rotulado y asignado con un número de identificación. La observación de las placas de agar sangre se utilizaron para evaluar la hemólisis y morfología de *S. aureus*.

Se clasificó como VCPs, según análisis macroscópico (principales rasgos observados: lento crecimiento, tamaño reducido, disminución de la pigmentación, inhibición de la beta hemólisis y disminución parcial de reacción de la coagulasa) con observación periódica durante 5 días en incubación a 35°-37°C (Delgado-Valverde *et al.*, 2014).

Para cada paciente reclutado, se registró en una planilla de Excel la presencia de *S. aureus* para calcular su prevalencia. Además, por cada aislamiento identificado, se documentaron en la misma planilla los resultados de las pruebas de formación de biofilm, susceptibilidad antimicrobiana y detección de factores de virulencia.

### **3.5 Susceptibilidad antimicrobiana**

A todos los aislados identificados como *S. aureus* y *S. aureus* VCPs se les realizó el antibiograma por la técnica de difusión en agar con sensidiscos utilizando los siguientes antibióticos: clindamicina (2 µg), eritromicina (15 µg), penicilina G (10IU), cloranfenicol (30 µg), gentamicina (10 µg), sulfametoxazol-trimetoprim (23,75/1,25 µg), rifampicina (5 µg), levofloxacin (5 µg) y minociclina (30 µg), linezolid (30 ug) y fosfomicina (200 ug) (Oxoid Ltd U.K). La resistencia a meticilina se detectó mediante un sensidisco de cefoxitina 30 µg. La resistencia inducible a clindamicina en *S. aureus* se evaluó mediante la prueba de difusión en disco en D (D-test), siguiendo las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Se colocaron discos de eritromicina (15 µg) y clindamicina (2 µg) a una distancia de 15-26 mm, considerando el borde de los discos. Las placas se incubaron a 35-37°C durante 24 h, tras lo cual se evaluó la presencia de un achatamiento del halo de

inhibición alrededor del disco de clindamicina en la zona adyacente al disco de eritromicina, lo que se interpretó como un patrón de resistencia inducible (tipo D positivo).

Los aislamientos fueron clasificados en tres categorías:

1. **Fenotipo D positivo:** presencia de un halo de inhibición en forma de "D" alrededor del disco de clindamicina, indicando resistencia inducible.
2. **Fenotipo D negativo:** inhibición completa alrededor del disco de clindamicina sin deformación del halo, indicando sensibilidad.
3. **Fenotipo R constitutivo:** ausencia total de halo alrededor del disco de clindamicina, indicando resistencia constitutiva.

Esto permitió detectar la presencia de resistencia inducible a clindamicina en las cepas evaluadas, proporcionando información relevante sobre la efectividad de los macrólidos y lincosamidas en el tratamiento de infecciones por *S. aureus* en pacientes con FQ.

La determinación de concentración inhibitoria mínima (CMI) se efectuó por E-test para vancomicina y teicoplanina (Liofilchem, Italy) (Lewis *et al.*, 2023).

**Procedimiento.** Para la preparación del inóculo bacteriano se suspendieron bacterias de una colonia aislada en solución salina estéril, ajustando la densidad del inóculo a una turbidez equivalente al estándar 0,5 de McFarland utilizando un patrón de turbidez similar para garantizar la precisión. La siembra se realizó en Agar Mueller-Hinton, se sumergió un hisopo estéril en el inóculo bacteriano y se extendió uniformemente sobre la superficie del agar en tres direcciones para asegurar una cobertura homogénea. Las placas se dejaron reposar durante 5 min para que el exceso de humedad fuera absorbido. Posteriormente, utilizando pinzas estériles, se colocaron cuidadosamente los sensidiscos impregnados con los antibióticos seleccionados, asegurándose de que cada disco estuviera en contacto total con el agar y equidistante de los demás para evitar superposiciones en los halos de inhibición. Este proceso se completó dentro de los 15 min posteriores a la siembra para

garantizar la precisión del ensayo. Una vez colocados todos los discos, las placas se incubaron en posición invertida a 35-37 °C durante 24 h para la correcta difusión de los antibióticos y posterior lectura de los resultados. Para la tira E-test de vancomicina y teicoplanina se repitió el mismo procedimiento que los sensidiscos, este procedimiento se realizó cuidadosamente para evitar desplazamientos o burbujas que pudieran interferir con la difusión del antibiótico (Stephen J. Cavalieri *et al*, 2005).

#### **Interpretación de los Resultados:**

Se consultaron los puntos de corte establecidos por el CLSI para determinar si las cepas eran sensibles, intermedias o resistentes (Lewis, 2024).

**Control de Calidad:** Se utilizaron cepas de referencia (*S. aureus* ATCC 25923) para validar los resultados, verificando que los puntos de corte estuvieran dentro de los rangos aceptados según la guía CLSI.

#### **3.6 Formación de Biofilm**

La evaluación de la formación de biofilm se realizó mediante el método de placa de microtitulación utilizando una placa estéril de 96 pocillos de fondo plano. Se prepararon las colonias bacterianas desde el cepario, inoculándolas en 1 mL de caldo de soja Tripticasa (TSB) suplementado con glucosa al 25 %, seguido de una incubación a 35-37 °C durante 24 h. Posteriormente, se realizaron diluciones 1:100 del caldo inicial y se inocularon 200 µL de cada cultivo ajustado en placas de PVC de 96 pocillos, que se incubaron nuevamente a 35-37 °C durante 24 h para inducir la formación de biofilm. Se utilizó un control negativo con medio inductor más 0,2 % de SDS, el proceso se repitió en duplicado para mantener una incubación de 48h y así realizar una comparativa en el tiempo de incubación.

La densidad óptica (DO) de los cultivos iniciales se ajustó a 600 nm mediante un lector de microplacas de la serie M965 marca Accu Reader (Taiwán), realizando mediciones necesarias con medio fresco y confirmando la DO ajustada antes de la inoculación, esto

garantiza que cualquier medida de absorbancia se deba a las células y no al medio. Después del período de incubación, se midió la densidad bacteriana en las placas a 600 nm, posteriormente se lavaron tres veces con PBS 1X y se dejaron secar a 60 °C durante 1 h. A cada pocillo se añadieron 200 µL de cristal violeta al 1 %, incubándose a temperatura ambiente durante 1 min. El exceso de cristal violeta se eliminó con tres lavados sucesivos con agua destilada, y el tratamiento del biofilm se solubilizó con 200 µL de etanol al 95 %. Las lecturas de absorbancia para medir biofilm se realizaron a 490 nm, los resultados se expresaron calculando la razón  $A_{490nm}/A_{600nm}$ . Cada ensayo se realizó por cuadruplicado y se corrigieron las lecturas con blancos correspondientes. Finalmente, las cepas se clasificaron como de alta, moderada o baja capacidad de formación de biofilm según los rangos establecidos: <0,120 (baja), 0,120-0,240 (moderada) y >0,240 (alta) (Hait *et al.*, 2021).

### **3.7 Genes de virulencia**

La detección de los genes *mecA*, *pvl* y *spa* se realizó mediante PCR punto final, utilizando partidores específicos para cada gen (**tabla 1**). El ADN genómico de las cepas de *S. aureus* se obtuvo a partir de cultivos en medio LB utilizando E.Z.N.A Bacterial DNA Kit (Omega Bio-tek/EE.UU), centrifugando 3 mL de cultivo a 4000 x g durante 10 min a temperatura ambiente. El sedimento se resuspendió en 100 µL de tampón TE y se agregó 10 µL lisozima, incubándose a 37 °C durante 10 min. Posteriormente, se realizó la lisis celular con tampón TL (100 µL) y proteinasa K (20 µL) a 55 °C durante 1 h. El ADN fue purificado mediante columnas de extracción y eluido en 50 µL de tampón de elución, almacenándose a -20 °C hasta su uso.

Para la PCR, se utilizó un volumen final de reacción de 25 µL que incluyó 2,5 µL de buffer 10X, 0,5 µL de cada partidore forward y reverse a 5 µM, 0,5 µL de dNTPs (10 mM), 0,125 µL de Taq. polimerasa (5 U/µL), 15,875 µL de agua libre de nucleasas y 5 µL de ADN templado.

Las reacciones se realizaron en un termociclador Biometra T Personal bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento (56 °C para *mecA*, 60 °C para *pvl* y 58 °C para *spa*) por 30 s, y extensión a 72 °C por 30 s, con una extensión final a 72 °C por 10 min. Los productos amplificados se analizaron en un gel de agarosa al 1,6 %, teñido con GelRed Biotium, y se visualizaron bajo luz UV para confirmar los tamaños esperados: 155 pb para *mecA*, 118 pb para *pvl* y 101 pb para *spa* (Okolie *et al.*, 2015).

DNA objetivo	Tamaño del amplicón (pb)	Primer	Secuencia del primer 5'→3'
<i>mecA</i>	155	<i>mecA</i> -1 <i>mecA</i> -2	TGGTATGTGGAAGTTAGATTGGGAT CTAATCTCATATGTGTTCTGTATTGGC
<i>pvl</i>	118	<i>pvl</i> -1 <i>pvl</i> -2	TTACACAGTTAAATATGAAGTGAAGTGGAA AGCAAAGCAATGCAATTGATG
<i>spa</i>	101	<i>spa</i> -1 <i>spa</i> -2	CAGCAAACCATGCAGATGCTA CGCTAATGATAATCCACCAAATACA

**Tabla 1: características de Primers utilizados**

### **Análisis estadístico**

Se calculó la prevalencia de *S. aureus* y VCPs en los pacientes, así como la presencia de genes de virulencia en las cepas aisladas. Para el análisis de datos, se utilizó el software STATA/MP 14.0, que permitió calcular frecuencias y porcentajes para describir las características de los participantes y los resultados obtenidos en el laboratorio. Además, se empleó Microsoft Excel para la gestión y organización inicial de los datos, asegurando su correcta estructuración antes del análisis estadístico detallado.

Para comparar la capacidad de formación de biofilm entre las distintas cepas, se aplicaron pruebas estadísticas específicas. Primero, se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para evaluar si los datos seguían una distribución normal. Además, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para analizar diferencias significativas en la producción de biofilm entre las cepas estudiadas. Los valores *p* obtenidos en estas pruebas fueron

interpretados para determinar la significancia estadística de las diferencias observadas, considerándose significativas aquellas con  $p < 0,05$ .

Se aplicaron barras de error a los gráficos para representar la desviación estándar de los valores de absorbancia, lo que proporcionó una medida de la variabilidad dentro de cada grupo. Estas barras son útiles para evaluar la consistencia de los resultados y las diferencias entre cepas. Una mayor longitud de las barras de error indica una mayor variabilidad en los datos, mientras que barras más cortas sugieren valores más homogéneos dentro del grupo.

Todo el análisis se realizó siguiendo estándares de calidad y replicabilidad estadística, permitiendo una interpretación confiable de los resultados relacionados con la prevalencia, los perfiles fenotípicos y la caracterización genotípica de las cepas de *S. aureus* en el contexto del estudio (McKight & Najab, 2010).

## **4.Resultados**

### **4.1 *S. aureus* y *S. aureus* -VCPs aislados de pacientes con FQ**

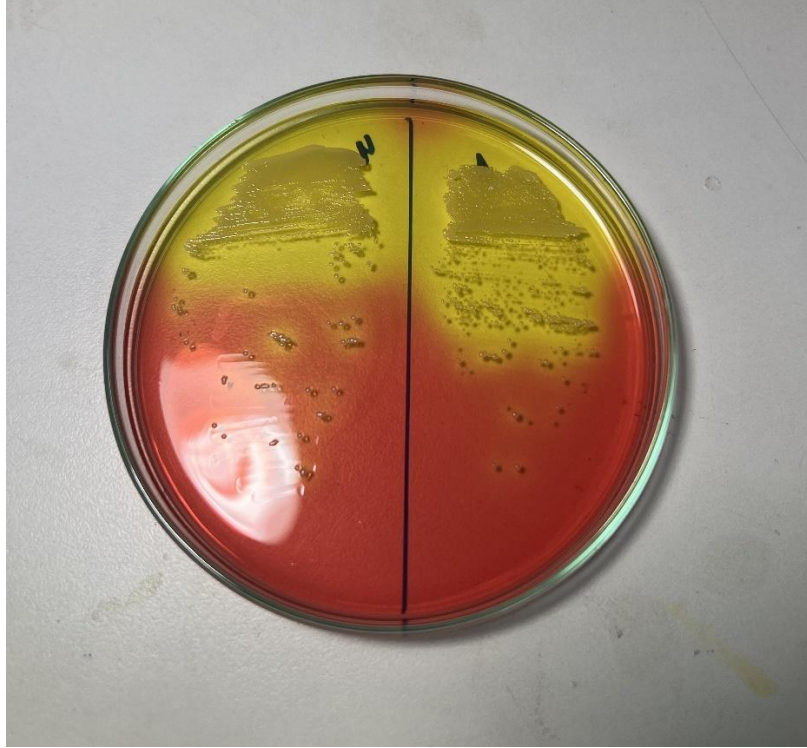
De los 40 pacientes diagnosticados con FQ que participaron en el estudio, se aislaron 27 cepas de *S. aureus*, representando una prevalencia del 67,5 % con un intervalo de confianza del 95 % entre el 50,8 % y el 81,4 %. Además, se detectaron *S. aureus*-VCPs en el 10 % de los pacientes, con un intervalo de confianza del 95 % entre el 4,7 % y el 27,9 %.

**Tabla 2: Características de aislados de *S. aureus* y *S. aureus* VCPs de pacientes con FQ. (N=27)**

Características de los aislados estudiados								
	Aislado	Muestra	Coagulasa	Hemolisis	Morfología	Edad	Sexo	<i>spa</i>
1	Vcps	Espuito FQ	Positiva	gama	huevo frito	16	F	Positivo
2	<i>S. aureus</i>	Espuito FQ	Positiva	beta	puntiforme	14	M	Positivo
3	<i>S. aureus</i>	Espuito FQ	Positiva	beta	puntiforme	5	M	Positivo
4	<i>S. aureus</i>	Espuito FQ	Positiva	beta	puntiforme	6	M	Positivo
5	Vcps	Espuito FQ	Positiva	beta	huevo frito	1	F	Positivo
6	<i>S. aureus</i>	Espuito FQ	Positiva	beta	puntiforme	9	F	Positivo
7	<i>S. aureus</i>	Espuito FQ	Positiva	beta	puntiforme	16	F	Positivo
8	<i>S. aureus</i>	Espuito FQ	Positiva	beta	puntiforme	14	F	Positivo
10	<i>S. aureus</i>	Espuito FQ	Positiva	beta	puntiforme	27	F	Positivo
13	<i>S. aureus</i>	Espuito FQ	Positiva	beta	puntiforme	1	F	Positivo
15	Vcps	Espuito FQ	Positiva	beta	huevo frito	7	M	Positivo
16	<i>S. aureus</i>	Espuito FQ	Positiva	beta	puntiforme	1	F	Positivo
17	<i>S. aureus</i>	Espuito FQ	Positiva	beta	puntiforme	3	M	Positivo
19	<i>S. aureus</i>	Espuito FQ	Positiva	beta	puntiforme	13	F	Positivo
20	<i>S. aureus</i>	Espuito FQ	Positiva	beta	puntiforme	21	M	Positivo
22	<i>S. aureus</i>	Espuito FQ	Positiva	beta	puntiforme	10	M	Positivo
23	<i>S. aureus</i>	Espuito FQ	Positiva	beta	puntiforme	42	F	Positivo
26	<i>S. aureus</i>	Espuito FQ	Positiva	beta	puntiforme	24	M	Positivo
28	Vcps	Espuito FQ	Positiva	gama	huevo frito	36	F	Positivo
29	<i>S. aureus</i>	Espuito FQ	Positiva	beta	puntiforme	4	F	Positivo
32	<i>S. aureus</i>	Espuito FQ	Positiva	beta	puntiforme	10	F	Positivo
36	<i>S. aureus</i>	Espuito FQ	Positiva	beta	puntiforme	17	M	Positivo
43	<i>S. aureus</i>	Espuito FQ	Positiva	beta	puntiforme	23	M	Positivo
45	<i>S. aureus</i>	Espuito FQ	Positiva	beta	puntiforme	23	M	Positivo
52	<i>S. aureus</i>	Espuito FQ	Positiva	beta	puntiforme	2	F	Positivo
53	<i>S. aureus</i>	Espuito FQ	Positiva	beta	puntiforme	42	F	Positivo
54	<i>S. aureus</i>	Espuito FQ	Positiva	beta	puntiforme	26	F	Positivo

La **tabla 2** incluye información detallada sobre las cepas aisladas, distribuciones por edad, sexo M= masculino, F=Femenino y la presencia del gen *spa*. En cuanto a los datos demográficos, las edades de los pacientes con aislamientos oscilaron entre 1 y 42 años, incluyéndose tanto niños como adultos jóvenes. Todas las cepas analizadas fueron positivas para el gen *spa*, lo que confirma su identidad como *S. aureus*. De las 27 cepas de *S. aureus* aisladas, 4 cepas presentaron el fenotipo característico *S. aureus*-VCPs, identificadas mediante características distintivas. Estas variantes mostraron un tamaño

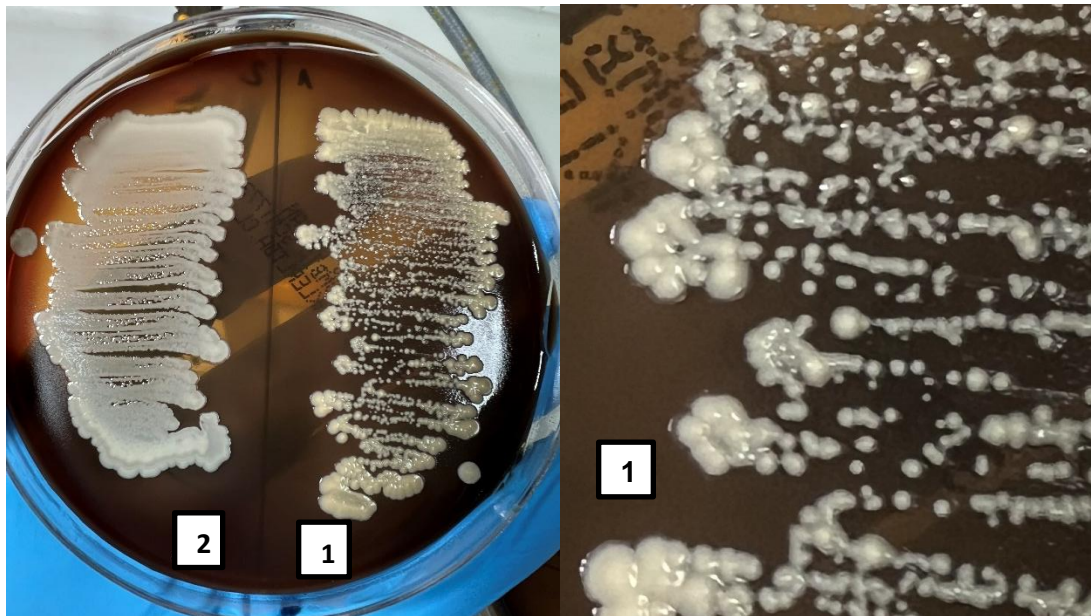
reducido en comparación con las colonias típicas de *S. aureus*, crecimiento lento y una morfología similar a un “frito huevo”.



**Figura 1:** Muestras representativas de cultivos de *S. aureus*, cepas 1 y 4 en agar sal manitol, resultados después de 24 h de incubación a 35-37°C.



**Figura 2:** Prueba de hemólisis después de 24 h de incubación a 35-37°C, como se clasificó en la tabla de características de los aislados se puede evidenciar los 2 tipos de hemólisis entre una cepa *S. aureus*-VCPs (1) y una *S. aureus* (2).

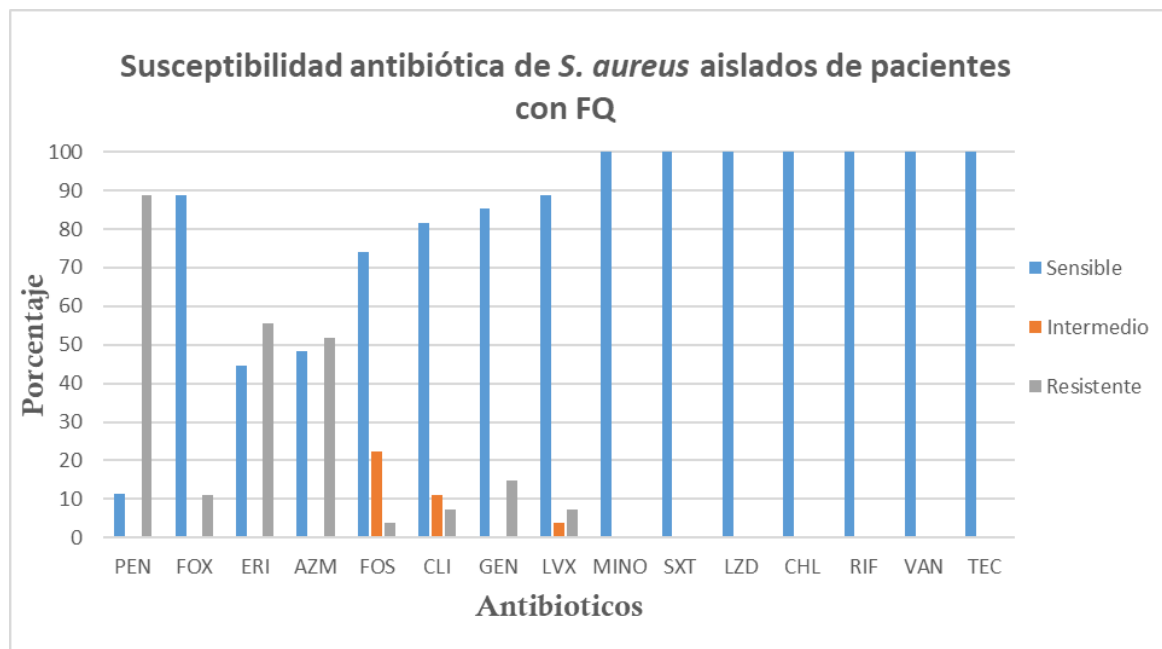


**Figura 3:** Diferencias morfológicas observadas entre las cepas 1 y 2 de *S. aureus*-VCPs y *S. aureus* después de 5 días de incubación a 35-37°C.

La **figura 1** representa la capacidad de fermentación de manitol en las cepas 1 y 4 cultivadas en agar sal manitol tras 24 h de incubación. La fermentación del manitol, evidenciada por el cambio de color amarillo en el medio, confirma la característica fenotípica de *S aureus*. En el medio de agar sangre, la cepa 2 presenta hemólisis  $\beta$  (**figura 2**), evidenciada por una zona clara alrededor de las colonias. La **figura 3** muestra las diferencias fenotípicas entre las cepas 1 y 2 de *S. aureus* después de 5 días de incubación en agar sangre. La cepa 1, identificada como *S. aureus* VCPs, exhibe un crecimiento lento y colonias de menor tamaño con una morfología característica de "huevo frito", definida por un centro opaco y bordes translúcidos. Además, no presenta hemólisis evidente en el medio de cultivo, lo que contrasta con el fenotipo de *S. aureus*. Por otro lado, la cepa 2, identificada como *S. aureus*, muestra colonias grandes, de bordes bien definidos y apariencia brillante, típicas de este microorganismo. Estas observaciones destacan las diferencias en la morfología y capacidad de hemólisis entre las VCPs y las colonias típicas de *S. aureus*, evidenciando la importancia de estos fenotipos en su identificación y caracterización.

#### **4.2 Susceptibilidad antibiótica**

La susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con FQ mostró una marcada heterogeneidad en los perfiles de resistencia. Para penicilina (PEN), la resistencia fue del **88,8%**, Eritromicina (ERI) y azitromicina (AZM) presentaron una resistencia del **55,5 %** y **51,8%** respectivamente. En el caso de clindamicina (CLI), la resistencia fue del **7,4%**. La resistencia a cefoxitina (FOX) y gentamicina (GEN) fue del **11,1 %** y **14,8%** respectivamente, mientras que para levofloxacino (LVX) y fosfomicina (FOS) fue del **7,4 %**. mientras que todas las cepas analizadas fueron sensibles a minoxiclina (MINO), sulfametoxazol-trimetoprima (SXT), linezolid (LZD), cloranfenicol (CHL), rifampicina (RIF) vancomicina (VAN) y teicoplanina (TEC) (**figura 4**).



**Figura 4:** Susceptibilidad antibiótica de cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con FQ en el Dr. Hospital Gustavo Fricke (HGF). La variable representada en el eje X representa los antibióticos evaluados, mientras que la variable representada en el eje Y muestra el porcentaje de las cepas analizadas. Los colores indican los niveles de susceptibilidad: resistente, sensible e intermedio.

Al analizar los perfiles de resistencia, el más frecuente fue el perfil de resistencia a penicilina, encontrado en el **36%** de las cepas. Este fue seguido por el perfil combinado de resistencia a penicilina, eritromicina y azitromicina, que abarcó el **28%** de las cepas. Otros perfiles, que incluyen combinaciones más complejas con resistencia a penicilina junto con fosfomicina, clindamicina, gentamicina, levofloxacino o cefoxitina, representaron cada uno un **4%**. Solo el **7,4 %** de las cepas fueron sensibles a todos los antibióticos probados, destacando la diversidad en los patrones de resistencia antimicrobiana observados en la **tabla 3**.

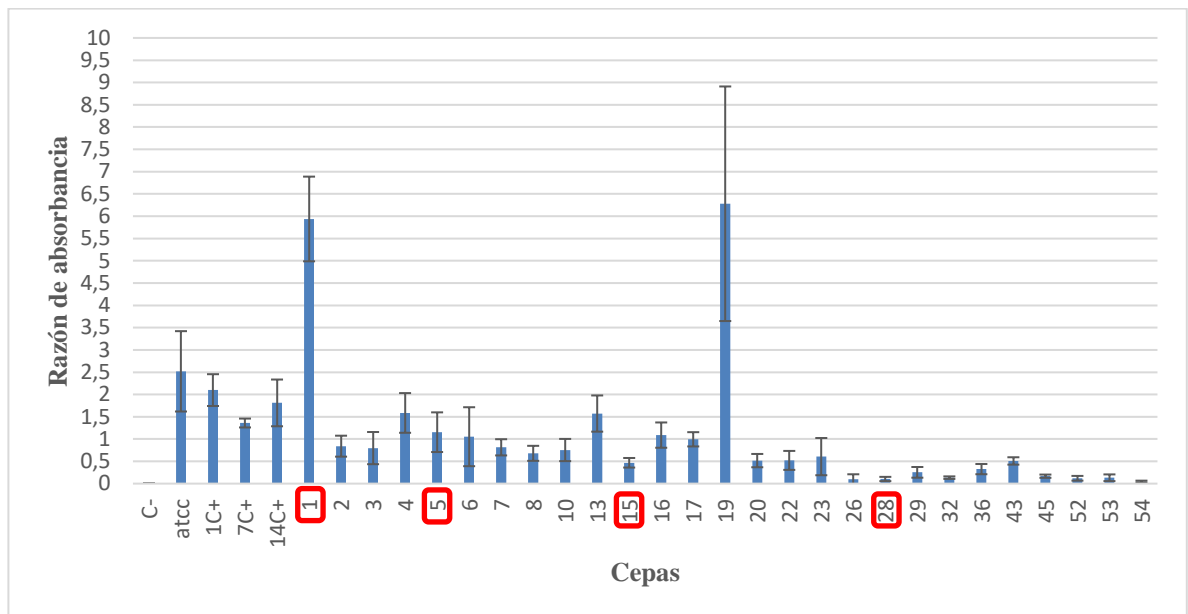
**Tabla 3.** Perfiles de resistencia antibiótica de las cepas evaluadas.

Antibióticos	N° de cepas	Tipos de antibióticos	Porcentaje
PEN	9	1	36%
PEN-ERI-AZM	7	2	28%
PEN-FOX	1	1	4%
PEN-ERI	1	2	4%
ERI- AZM	1	2	4%
PEN-ERI-FOS-AZM	1	3	4%
PEN-ERI-CLI-AZM	1	3	4%
PEN-ERI-GEN-AZM	1	3	4%
PEN-ERI-GEN-LVX-AZM	1	4	4%
PEN-ERI-CLI-GEN-FOX-AZM	1	4	4%
PEN-ERI-GEN-LVX-FOX-AZM	1	5	4%
<b>TOTAL</b>	<b>25</b>	<b>0-5</b>	<b>100%</b>
Sensible	2	0	7,4%

**PEN:**Penicilina-**ERI:**Eritromicina-**AZM:**Azitromicina-**FOX:**Cefoxitina-**FOS:**Fosfomicina-**CLI:**Clindamicina-**GEN:**Gentamicina-**LVX:**Levofloxacino-**MINO:**Minociclina-**SXT:**Sulfametoxazol trimetoprima-**LZD:**Linezolid-**CHL:**Cloranfenicol-**RIF:**Rifampicina-**VAN:**Vancomicina-**TEC:**Teicoplanina

Por otra parte, el **24%** de las cepas de *S. aureus* aisladas, es decir, 6 de las 27 cepas, presentaron resistencia a tres o más clases de antibióticos, clasificándolas como multirresistentes (MDR). Entre estas cepas, se identificaron 3 cepas resistentes a cefoxitina. En cuanto a las cepas VCPs, se observó que 2 de las 4 variantes aisladas también presentaron un perfil MDR. Estas cepas mostraron resistencia a penicilina, eritromicina, azitromicina, gentamicina y levofloxacino, además, de que una *S. aureus*-VCPs fue clasificada como SARM por su resistencia a la cefoxitina.

## Formación de Biofilm



**Figura 5: Cuantificación de formación de biofilm.** Resultados de la formación de biofilm en las diferentes cepas analizadas, la cepa ATCC 25923 de *S. aureus* se utilizó como control de referencia. Las cepas identificadas como 1c, 7c y 14c corresponden a cepas SARM provenientes de otros estudios, empleadas para comparación. Las cepas numeradas restantes corresponden a los aislamientos recolectados durante este estudio, de las cuales las cepas **1, 5, 15 y 28** fueron identificadas ***S. aureus*-VCPs**. La formación de biofilm fue evaluada a través de mediciones de absorbancia, realizada tras una incubación de 24 h en placas multipocillo. La formación de biofilm se clasifica como baja, moderada o alta según la relación de absorbancias A490nm/A600nm, baja formación: relación <0,120, formación moderada: relación entre 0,120 y 0,240, alta formación: relación >0,240 (Hait et al., 2021).

## Análisis General de la Formación de biofilm

La formación de biofilm mostró variaciones significativas entre las diferentes cepas de *S. aureus*. El control negativo no presentó formación de biofilm, mientras que el control positivo, representado por la cepa *S. aureus* ATCC 25923, demostró un nivel alto de formación. Las cepas controles 1C+, 7C+ y 14C+, seleccionadas debido a la presencia del gen *mecA* como controles positivos, también presentaron niveles altos de formación de biofilm.

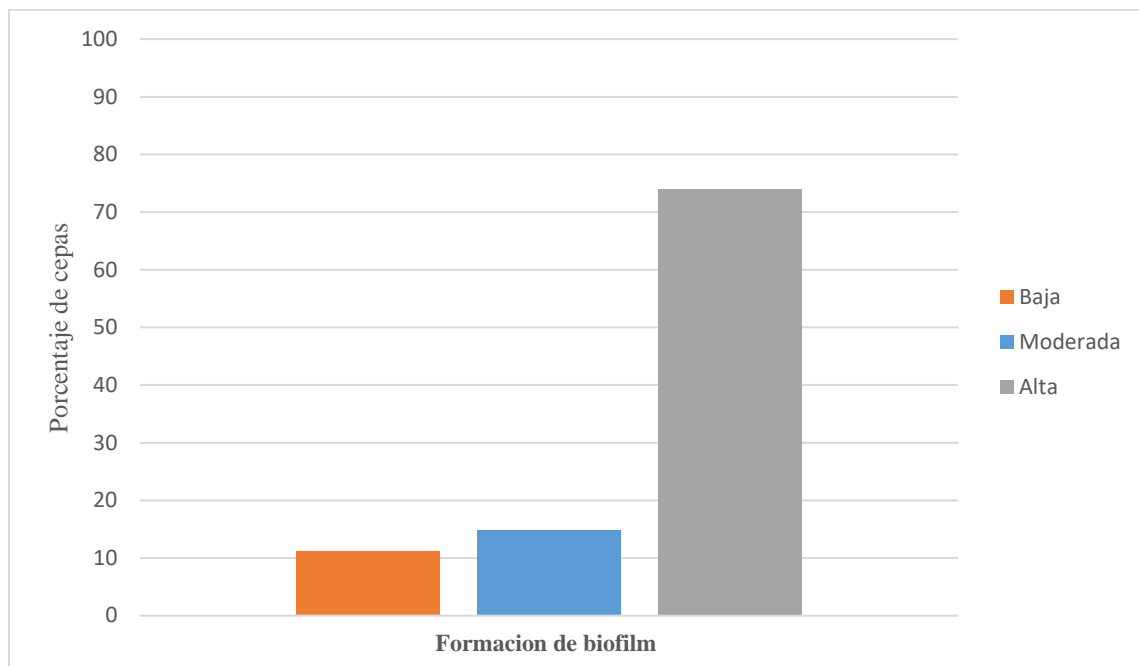
Las cepas 1 y 19, ambas clasificadas como SARM, exhibieron notables diferencias en la formación de biofilm en comparación con los controles positivos y negativos, destacando una variabilidad propia entre las cepas resistentes a meticilina.

En el caso de las VCPs, tres cepas (1, 5 y 15) mostraron una formación alta de biofilm según los valores establecidos en la referencia, mientras que una cepa (28) se clasificó como de baja formación de biofilm (**Figura 5**).

### **Análisis Estadístico**

Para analizar estadísticamente la capacidad de formación de biofilm entre las cepas de *S. aureus*, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, dado que los datos no siguieron una distribución normal según la prueba de Shapiro-Wilk. Esta prueba permitió identificar diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los grupos de cepas analizadas.

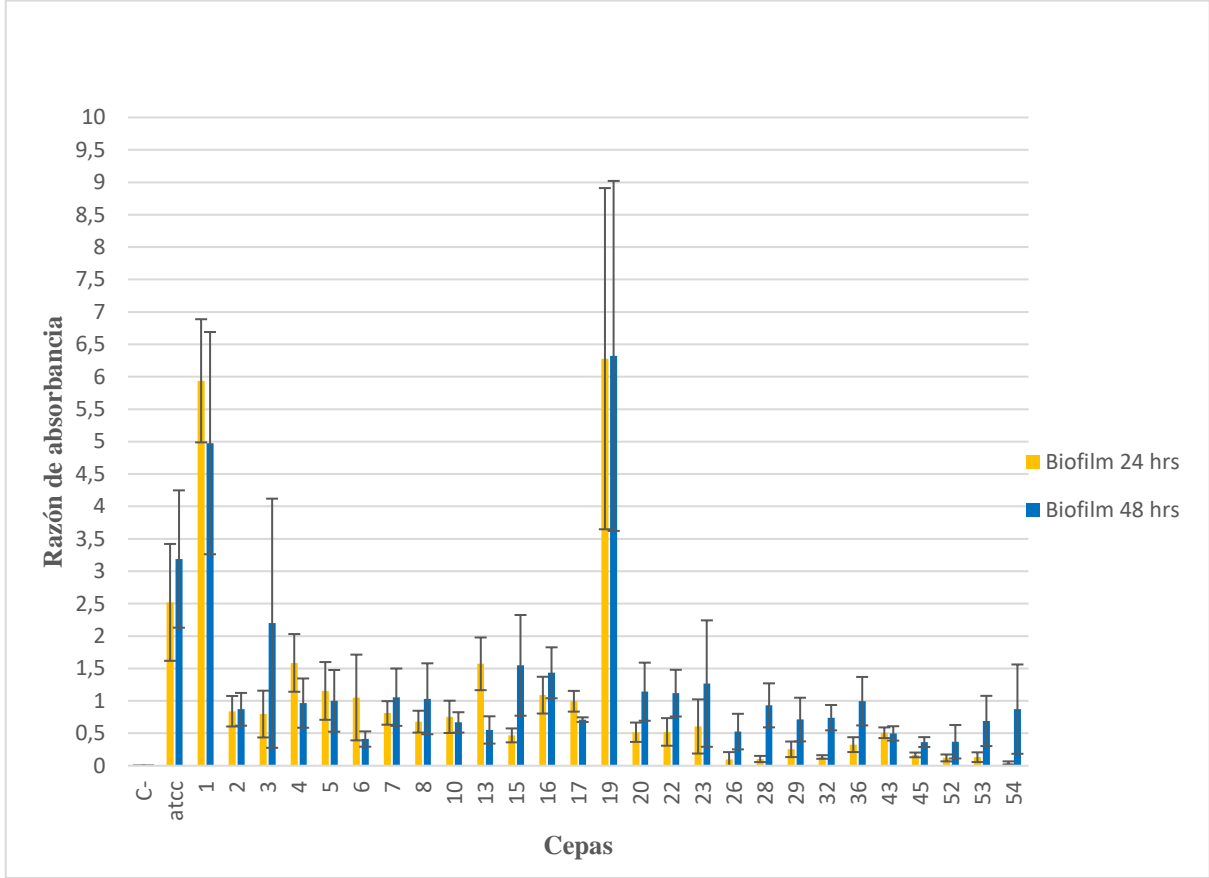
Las barras de error representadas en el gráfico corresponden a la desviación estándar de los valores de absorbancia, proporcionando una medida de la variabilidad dentro de cada grupo de cepas. La presencia de barras de error más amplias en algunos grupos sugiere una mayor dispersión de los datos. En contraste, las barras más reducidas indican resultados más homogéneos dentro del grupo. Estos hallazgos destacan la heterogeneidad en la formación de biofilm entre las cepas estudiadas.



**Figura 6: Representación gráfica del porcentaje en cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con FQ.** La formación de biofilm se clasifica como baja, moderada o alta según la relación de absorbancias A490nm/A600nm, medida tras 24 h de incubación en placas multipocillo. Baja formación: relación  $<0,120$ , formación moderada: relación entre  $0,120$  y  $0,240$ , alta formación: relación  $>0,240$  (Hait et al., 2021).

La clasificación de la formación de biofilm en las cepas de *S. aureus* analizadas mostró una marcada predominancia de la formación alta. Del total de las cepas evaluadas, un **74 %** presentó alta formación de biofilm, lo que sugiere una capacidad significativa de adherencia y producción de matriz extracelular en la mayoría de los aislamientos.

En contraste, un **14,8 %** de las cepas mostró una formación moderada de biofilm, mientras que solo un **11,2 %** presentó una formación baja (**figura 6**). Esta distribución revela que, aunque existe heterogeneidad en los niveles de formación de biofilm entre las cepas estudiadas, la mayoría tiende a exhibir una capacidad elevada de formación.

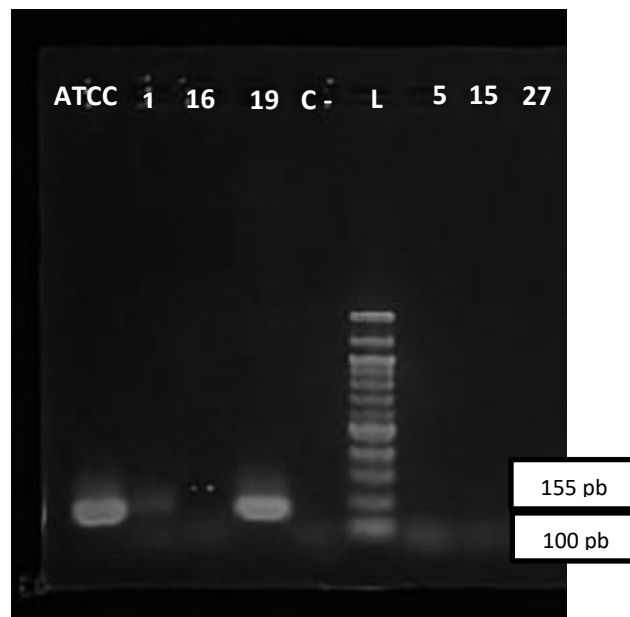


**Figura 7: Formación de biofilm de las cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con FQ.** La formación de biofilm fue evaluada a través de mediciones de absorbancia realizada tras la incubación de 24h y 48h. C- corresponde al control negativo, ATCC 25923 corresponde al control positivo *S. aureus*.

La **figura 7** compara la formación de biofilm en cepas de *S. aureus* a las 24h y 48h de incubación. El 74% de las cepas (20/27) presentaron alta formación de biofilm ( $A_{490}/A_{600} > 0.240$ ) a las 24h, aumentado este patrón a las 48h (27/27). Las cepas SARM (1 y 19) y VCPs (1, 5, 15 y 28) mostraron valores de absorbancia superiores a 0.240 en ambos tiempos, El control positivo (ATCC 25923) confirmó la validez metodológica, mientras que el control negativo no evidenció biofilm. Estos resultados resaltan la heterogeneidad fenotípica en la capacidad de formación de biofilm, independientemente de la susceptibilidad, fenotipo VCPs y tiempo.

### 4.3 Detección de Genes de Virulencia

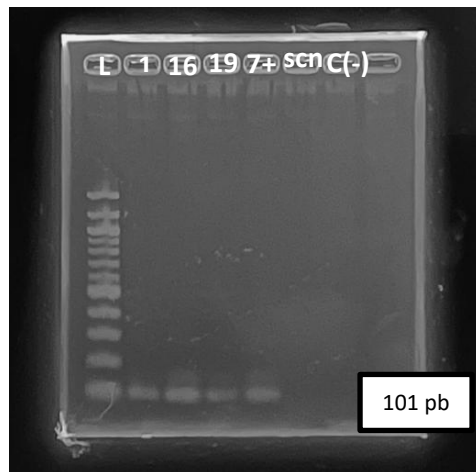
En este estudio, se evaluaron tres genes claves asociados a la virulencia de *S. aureus* en las cepas aisladas de pacientes con FQ *mecA*, *pvl* y *spa*. El gen *mecA*, relacionado con la resistencia a meticilina fue detectado en 2 (1 y 19) de las 3 (1, 16 y 19) cepas resistentes a la meticilina (**figura 8**), de las cuales la cepa 1 fue clasificada como VCP resistente a la metilica con el gen *mecA* detectado. Por su parte, el gen *pvl*, que codifica la leucocidina de Panton-Valentine asociado a infecciones graves y daño tisular significativo, se identificó en 4 (7, 23, 29, 53) cepas (**figura 9**). Finalmente, el gen *spa*, que codifica la proteína A, un factor de evasión del sistema inmune y marcador útil para la tipificación molecular estuvo presente en todas las cepas estudiadas (**figura 10**).



**Figura 8:** Electroforesis en gel agarosa teñido con GelRed de productos PCR para el gen *mecA*. Las bandas corresponden a los gen *mecA* amplificado a partir de las cepas de *S. aureus* izquierda a derecha. SARM ATCC BAA1026-1(VCP)-16-19-Control negativo-DNA Ladder (100pb)-5-15-27-30-38-42 61-71-77-84-105-73. Tamaño del amplicón 155 pb. Cepas posteriores a la 27 no fueron incluidas en el estudio.



**Figura 9:** Electroforesis en gel de agarosa teñido con GelRed de productos de PCR del gen *pvl*. Las bandas corresponden cepa positiva con el gen *pvl* amplificadas a partir de cepas de *S.aureus*. Izquierda a derecha. DNA Ladder(100pb)-7-23-29-53-1-19-16-7+-control negativo. Tamaño del amplicón 118 pb.



Las bandas corresponden a los genes *spa* amplificadas a partir de las cepas de *S. aureus* izquierda a derecha. DNA Ladder-1-16-19-7+SARM-S. coagulasa (-)-control negativo. Tamaño del amplicón 101 pb.

**Figura 10:** Electroforesis en gel de agarosa teñido con GelRed de productos de PCR del gen *spa*.

## Discusión

En el presente estudio se describen la prevalencia y características fenotípicas de 27 cepas de *S. aureus* aisladas de 40 pacientes con FQ. Obteniendo una prevalencia del 67,5% para *S. aureus* y del 10% para las cepas VCPs. Estos valores son consistentes con estudios internacionales que informan tasas de prevalencia entre 50% y 80% para *S. aureus* en pacientes con FQ, dependiendo del contexto geográfico, las prácticas de manejo clínico y el acceso a tratamientos antimicrobianos (Rumpf *et al.*, 2021, Nikmanesh *et al.*, 2022), si bien *S. aureus* es una de las especies más frecuentes aisladas en pacientes con FQ hay estudios que indican que hoy en día es el más prevalente debido a las estrategias de erradicación de otros patógenos que compiten con *S. aureus* (Aquino *et al.*, 2017, Schwerdt *et al.*, 2018). Por otro lado, las tasas de prevalencia en otros estudios hablan de un 11% de VCPs en pacientes con FQ lo que concuerda con nuestros datos, (Delgado-Valverde *et al.*, 2014) autores sugieren que su baja prevalencia se puede deber a su dificultad en el reconocimiento ya que pueden ser enmascaradas por colonias comunes de *S. aureus* y de otras especies.

La detección de VCPs es particularmente relevante, ya que estas variantes fenotípicas son conocidas por su capacidad de persistencia en entornos pulmonares crónicos, así como por su resistencia a múltiples terapias. Estas características destacan la importancia de incluir metodologías específicas para su identificación en estudios de vigilancia microbiológica y en la práctica clínica (Boza C. *et al.*, 2020).

La caracterización de las cepas de *S. aureus* mostró una alta heterogeneidad. En términos de morfología fenotípica, donde las cepas VCPs exhibieron la morfología y tamaño característica de colonias pequeñas "huevo frito" y un crecimiento lento, confirmando su identificación (Delgado-Valverde *et al.*, 2014).

En relación con los perfiles de resistencia antimicrobiana, la alta resistencia que se observó a macrólidos, eritromicina y azitromicina, lo que refleja la presión selectiva asociada al uso frecuente de estos antibióticos en el tratamiento de infecciones crónicas, es por ello por lo que en caso de portación de *S. aureus* no se recomienda el uso de antibióticos profiláctico, ya que favorece una infección precoz por *P. aeruginosa* por falta de inhibición competitiva entre estos patógenos. En contraste, todas las cepas fueron sensibles a vancomicina y linezolid, confirmando su efectividad como opciones terapéuticas para infecciones graves (Boza C. *et al.*, 2020). Cabe destacar que tres cepas presentaron resistencia a meticilina, pero solo dos de ellas estuvieron asociadas con la presencia del gen *mecA*. La resistencia observada en la tercera cepa podría deberse a la acción de otro mecanismo no evaluado en este estudio, como la presencia de un gen alternativo relacionado con la resistencia a meticilina, entre los cuales destacan *mecB* y *mecC*.

El gen *mecC*, identificado en 2011, ha sido reportado en cepas de *S. aureus* aisladas tanto de humanos como de animales, aunque su prevalencia es significativamente menor en comparación con *mecA*. Estudios han demostrado que la similitud entre *mecC* y *mecA* es de aproximadamente un 69%, lo que sugiere que podrían conferir mecanismos de resistencia similares, pero con una distribución epidemiológica más restringida (Vindel *et al.*, 2016).

Por otro lado, el gen *mecB* ha sido identificado con menor frecuencia en *S. aureus*, con informes limitados sobre su detección en aislamientos clínicos. Dado que este estudio no incluyó la búsqueda de estos genes, la posibilidad de que la resistencia en la cepa en cuestión sea atribuible a *mecC* o *mecB* no puede descartarse completamente y requeriría estudios adicionales para su confirmación (Vindel *et al.*, 2016, Chew *et al.*, 2021).

La susceptibilidad antibiótica de las cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con FQ presentó un comportamiento heterogéneo, con variaciones en los perfiles de resistencia entre los distintos antibióticos evaluados. En comparación con estudios previos en pacientes con FQ, los patrones de resistencia observados fueron similares a los reportados en Medio Oriente (Nikmanesh *et al.*, 2022), donde se describió una alta resistencia a penicilina y macrólidos (eritromicina y azitromicina), junto con una menor proporción de cepas multirresistentes. Esta similitud en los patrones de resistencia podría deberse a estrategias terapéuticas comunes utilizadas en el manejo de infecciones en pacientes con FQ, donde el uso prolongado de macrólidos como terapia moduladora de la inflamación puede generar una mayor presión selectiva sobre *S. aureus*, favoreciendo la selección de cepas resistentes. Asimismo, la alta resistencia a penicilina es un hallazgo esperado, dado que más del 90% de las cepas de *S. aureus* a nivel mundial presentan resistencia intrínseca a este antibiótico debido a la producción de  $\beta$ -lactamasas.

El estudio de (Nikmanesh *et al.*, 2022) , que incluyó tanto adultos como niños con FQ, reportó una prevalencia de *S. aureus* del 68% en su cohorte, valor cercano al 67,5% observado en nuestro trabajo. Sin embargo, mientras que en su población pediátrica (<18 años) la resistencia a macrólidos (eritromicina/azitromicina) alcanzó el 62%, en nuestros pacientes pediátricos (66,7% de la muestra, edad media: 8 años) este valor fue del 38,8%, sugiriendo una posible influencia del manejo ambulatorio en la reducción de la presión selectiva por antibióticos. Esto respalda la hipótesis de que la menor exposición a terapias prolongadas, como la profilaxis con azitromicina recomendada por (Boza C. *et al.*, 2020), podría contribuir a una menor emergencia de cepas multirresistentes (MDR) en nuestro contexto clínico 24% vs. 30% en (Nikmanesh *et al.*, 2022). Aun así, ambos estudios coinciden en que *S. aureus* sigue siendo el patógeno predominante en niños antes de la

colonización por *P. aeruginosa*, lo que refuerza la necesidad de vigilancia continua en este grupo etario para evitar complicaciones asociadas a resistencia.

La formación de biofilm es un mecanismo clave en la persistencia de *S. aureus* en infecciones pulmonares crónicas (Tahaei *et al.*, 2021). En este estudio se evaluó la capacidad de formación de biofilm en cepas de *S.aureus* de pacientes con FQ y se determinó variabilidad en esta característica de las cepas analizadas. En particular, las cepas 1 y 19, positivas para *mecA*, demostraron una mayor formación de biofilm, lo que sugiere una ventaja adaptativa frente a la presión antibiótica y la respuesta inmune del huésped (Idrees *et al.*, 2021). Sin embargo, no todas las cepas analizadas presentaron una alta capacidad de formación de biofilm, evidenciándose una notable heterogeneidad en este fenotipo. Esta variabilidad fue especialmente evidente entre las cepas con fenotipo VCPs y aquellas positivas para el gen *pvl*. A pesar de estas diferencias, la cuantificación demostró que todas las cepas incluidas en el estudio fueron capaces de formar biofilm en algún nivel, lo que sugiere que este fenómeno puede ocurrir independientemente de la resistencia antimicrobiana o de los factores genéticos específicos asociados a la virulencia, (Tahaei *et al.*, 2021) ellos concluyen a pesar de los resultados de otros estudios que han evaluado relación entre la resistencia a meticilina y una mayor capacidad para formar biofilm a la cual concuerdan a que no se puede sacar conclusiones de gran alcance con un número tan pequeño en estudio.

En la caracterización de los factores de virulencia, el gen *mecA* identificado en el 7,4% de las cepas, confirmó la presencia de *S. aureus* resistente a meticilina (SARM). La detección de SARM en pacientes con FQ es clínicamente relevante, ya que estas cepas están asociadas a infecciones persistentes y mayor dificultad de erradicación debido a su resistencia a  $\beta$ -lactámicos, lo que limita las opciones terapéuticas y podría acelerar el

deterioro pulmonar (Girón *et al.*, 2009). Estos resultados concuerdan con la variabilidad reportada en la prevalencia de SARM en FQ (2–25%), influenciada por factores como la edad, el contexto clínico (hospitalario vs. ambulatorio) y la exposición previa a antibióticos (Wolter *et al.*, 2019, Nikmanesh *et al.*, 2022).

Por otro lado, el gen *pvl*, asociado a la producción de leucocidina de Panton-Valentine, se detectó en el 14,8% de las cepas. Este factor de virulencia se ha relacionado con infecciones cutáneas y neumonía necrotizante, debido a su capacidad de inducir daño tisular severo y abscesos recurrentes. Sin embargo, ninguna de las cepas SARM fue positiva para *pvl*, lo que coincide con la hipótesis de que la mayoría de las cepas SARM nosocomiales suelen presentar resistencia a múltiples antibióticos y carecer de este factor de virulencia (Ceballos *et al.*, 2019).

Finalmente, el gen *spa*, presente en el 100% de las cepas analizadas, resalta la importancia de la proteína A como un mecanismo clave de evasión inmune en *S. aureus*. Esta proteína interfiere con la respuesta inmune del huésped al unirse a la región Fc de los anticuerpos, bloqueando la opsonización y facilitando la persistencia bacteriana en el tracto respiratorio. Además, el gen *spa* es específico de especie, lo que permitió confirmar la identidad de los aislamientos analizados (Cervantes-García *et al.*, 2014).

### **Limitaciones del estudio**

Es fundamental reconocer las siguientes limitaciones en este trabajo.

**Tamaño muestral:** La inclusión de 27 cepas de *S. aureus* limita la generalización de los resultados. Estudios con cohortes más amplias permitirían establecer patrones epidemiológicos robustos, especialmente en subgrupos como pacientes pediátricos vs. adultos o portadores de VCPs vs. no VCPs.

**Datos clínicos:** incluir variables clínicas detalladas (ej: función pulmonar, frecuencia de exacerbaciones, historial de uso de antibióticos o estadio de la enfermedad) puede correlacionar la presencia de *S. aureus* o sus factores de virulencia con el deterioro clínico.

**Herramientas de análisis genético:** La detección de genes de virulencia se restringió a *mecA*, *pvl* y *spa*. La inclusión de otros marcadores podría permitir un perfil más completo de patogenicidad.

## Conclusión

El presente estudio permitió caracterizar cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con FQ, evaluando su prevalencia, la detección de VCPs, factores de virulencia, susceptibilidad antimicrobiana y capacidad de formación de biofilm. Los resultados obtenidos evidencian la interacción entre estos factores, resaltando el papel de *S. aureus* como un patógeno relevante en las infecciones pulmonares crónicas de estos pacientes. Se identificó una alta formación de biofilm en la mayoría de las cepas analizadas, lo que sugiere su contribución en la persistencia de *S. aureus* y en la dificultad de erradicar estas infecciones con los tratamientos convencionales.

Desde una perspectiva epidemiológica, esto representa uno de los primeros estudios realizados en la región en pacientes con FQ, aportando información microbiológica y molecular relevante. Este estudio no solo responde a los objetivos iniciales, sino que la comparación con estudios previos internacionales permitió identificar similitudes en la prevalencia, patrones de resistencia y la presencia de genes de virulencia con matices propios de la práctica clínica local.

La necesidad de nuevos estudios radica en la importancia de incorporar análisis clínicos y genómicos más detallados, junto con un seguimiento longitudinal de los pacientes, lo que permitiría comprender mejor la evolución de la infección y su impacto en la progresión de la enfermedad. Además, estudios con un mayor número de muestras podrían fortalecer la evidencia y contribuir a estrategias terapéuticas más efectivas en el manejo de infecciones crónicas en esta población.

## Referencias bibliográficas

- Accurso, F. J., Sontag, M. K., & Wagener, J. S. (2005). Complications associated with symptomatic diagnosis in infants with cystic fibrosis. *Journal of Pediatrics*, 147(3 SUPPL.), S37–S41. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2005.08.034>
- Antonio Cordero Araya, E., Yelín Choque Núñez, D., & María José Quirós Chacón, D. (2020). Fibrosis Quística: Generalidades. *Revista Ciencia y Salud Integrando Conocimientos*, 4(5), ág. 20-33. <https://doi.org/10.34192/CIENCIAYSALUD.V4I5.167>
- Aquino, R., Gonzáles, E., Samaniego, S., Rivera, J., Cedeño, V., Urbina, Y., & Diringer, B. (2017). Molecular characterization of pathogenic bacteria of the respiratory tract in Peruvian patients with cystic fibrosis. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 34(3), 423–435. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2017.343.2529>
- Boudet, A., Sorlin, P., Pouget, C., Chiron, R., Lavigne, J. P., Dunyach-Remy, C., & Marchandin, H. (2021). Biofilm Formation in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated in Cystic Fibrosis Patients Is Strain-Dependent and Differentially Influenced by Antibiotics. *Frontiers in Microbiology*, 12, 750489. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.750489/FULL>
- Boza C., M. L., Melo T., J., Barja Y., S., Codner D., E., Gomolan G., P., Hernández M., R., Astorga F., L., Barrientos I., H., Bozzo H., R., Calderón R., M., Cáceres V., J., Chávez C., E., Contreras E., I., Henríquez Y., M. T., Fielbaum C., O., Jakubson S., L., Jara H., B., Jorquera P., P., Kogan A., R., ... Wong L., C. (2020). Consenso chileno para la atención integral de niños y adultos con fibrosis quística. *Revista Chilena de Enfermedades Respiratorias*, 36(4), 268–333. <https://doi.org/10.4067/S0717-73482020000400268>

- Cano Megías, M., & González Albarrán, O. (2015). Diabetes en la fibrosis quística: una entidad diferente. *Endocrinología y Nutrición*, 62(1), 38–44. <https://doi.org/10.1016/J.ENDONU.2014.06.010>
- Ceballos, S., Aspiroz, C., Ruiz-Ripa, L., Azcona-Gutierrez, J. M., López-Cerero, L., López-Calleja, A. I., Álvarez, L., Gomáriz, M., Fernández, M., Torres, C., Ezpeleta, C., Martín, C., Arribas, J., Navarro, C., Arias, A., Fortuño, B., Pereira, J., Milagro, A., Torres, L., ... Rezusta, A. (2019). Multicenter study of clinical non- $\beta$ -lactam-antibiotic susceptible MRSA strains: Genetic lineages and Panton-Valentine leukocidin (PVL) production. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 37(8), 509–513. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2019.01.015>
- Cervantes-García, E., García-González, R., & María Salazar-Schettino, P. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab*, 61(1), 28–40. [www.medigraphic.com/patologiaclinica](http://www.medigraphic.com/patologiaclinica)[www.medigraphic.org.mx](http://www.medigraphic.org.mx)
- Chaves, F. (2014). Infections due to small colony variants of *Staphylococcus aureus*: Clinical and microbiological implications. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32(2), 67–69. <https://doi.org/10.1016/J.EIMC.2013.10.015>
- Chew, K. L., Lin, R. T. P., & Teo, J. W. P. (2021). Absence of mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a tertiary hospital in Singapore. *Pathology*, 53(6), 808. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2020.11.006>
- Crespo González, A., & Porrás García de Blanes, T. (2021). La fibrosis quística: etiología, cuadro clínico y tratamiento. *MoleQla: Revista de Ciencias de La Universidad Pablo de Olavide*, ISSN-e 2173-0903, No. 41, 2021 (Ejemplar Dedicado a: Mujeres En Ciencia y Ciencia Por Mujeres), 41, 8.

<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7802351&info=resumen&idioma=SP>

A

- Delgado-Valverde, M., Fernández-Echauri, P., Batista-Díaz, N., & Pascual-Hernández, Á. (2014). Variantes pequeñas de *Staphylococcus aureus*: utilidad de distintas pruebas para su diagnóstico y estudio de sensibilidad. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32(2), 96–98. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.06.005>
- Dickinson, K. M., & Collaco, J. M. (2021). Cystic fibrosis. *Pediatrics in Review*, 42(2), 55–65. <https://doi.org/10.1542/pir.2019-0212>
- Esposito, C., Kamper, M., Trentacoste, J., Galvin, S., Pfister, H., & Wang, J. (2023). Advances in the Cystic Fibrosis Drug Development Pipeline. In *Life* (Vol. 13, Issue 9). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/life13091835>
- Fernández, P., & Labarca, G. (2012). Fibrosis quística en el adulto: experiencia de un centro de referencia nacional Cystic fibrosis in adults: experience of a national reference center. In *Rev Med Chile* (Vol. 140).
- Gartner, S., Mondéjar-López, P., & Asensio de la Cruz, Ó. (2019). Follow-up protocol of patients with cystic fibrosis diagnosed by newborn screening. *Anales de Pediatría*, 90(4), 251.e1-251.e10. <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2018.11.009>
- Girón, R. M., Buendía, B., Pinedo, C., Casanova, Á., Hoyos, N., & Ancochea, J. (2009). *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en pacientes adultos con fibrosis quística. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(2), 85–88. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.02.008>

- Goerke, C., & Wolz, C. (2010). Adaptation of *Staphylococcus aureus* to the cystic fibrosis lung. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(8), 520–525. <https://doi.org/10.1016/J.IJMM.2010.08.003>
- Hait, J. M., Cao, G., Kastanis, G., Yin, L., Pettengill, J. B., & Tallent, S. M. (2021). Evaluation of Virulence Determinants Using Whole-Genome Sequencing and Phenotypic Biofilm Analysis of Outbreak-Linked *Staphylococcus aureus* Isolates. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.687625>
- Howden, B. P., Giulieri, S. G., Wong Fok Lung, T., Baines, S. L., Sharkey, L. K., Lee, J. Y. H., Hachani, A., Monk, I. R., & Stinear, T. P. (2023). *Staphylococcus aureus* host interactions and adaptation. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 21, Issue 6, pp. 380–395). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00852-y>
- Idrees, M., Sawant, S., Karodia, N., & Rahman, A. (2021). *Staphylococcus aureus* biofilm: Morphology, genetics, pathogenesis and treatment strategies. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 18, Issue 14). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijerph18147602>
- Kahl, B. C. (2014). Small colony variants (SCVs) of *Staphylococcus aureus* - A bacterial survival strategy. *Infection, Genetics and Evolution*, 21, 515–522. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2013.05.016>
- Kumar, G., & Kiran Tudu, A. (2023). Tackling multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* by natural products and their analogues acting as NorA efflux pump inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 80, 117187. <https://doi.org/10.1016/J.BMC.2023.117187>
- Lay-Son, G., & Repetto, G. (2010). *Genética y fibrosis quística: Desde el gen CFTR a los factores modificadores*. <http://www.neumologia-pediatrica.cl>

- Lentini N., E., López-Millán, A., Lores L., A. M., Pesciullesi B., M. R., Ituarte R., L. M., & Viera C., T. B. (2014). Fibrosis quística: aumento de la sobrevida en un centro especializado a 10 años de seguimiento. *Revista Chilena de Pediatría*, 85(3), 281–287. <https://doi.org/10.4067/S0370-41062014000300003>
- Lewis, J. S. ., Weinstein, M. P. ., Bobenchik, A. M. ., Cameau, Shelley., Cullen, S. K. ., Dingle, Tanis., Galas, M. F. ., Humphries, R. M. ., Kirn, T. J. ., Limbago, Brandi., Mathers, A. J. ., Pierce, V. M. ., Richter, S. S. ., Satlin, Michael., Schuetz, A. N. ., Sharp, Susan., & Simner, Patricia. (2023). *M100: performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Lissarrague, S., Bernstein, J. C., Stagnaro, J. P., Schell, C. M. B., Córdoba, M. A., Molina, N. B., Vila Roza, M. V., Basualdo Farjat, J. Á., & Sparo, M. D. (2019). Caracterización fenotípica de variantes pequeñas de *Staphylococcus aureus*: un nuevo desafío. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 53, no. 3(3), 331–337. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/106156>
- López-Valdez, J. A., Aguilar-Alonso, L. A., Gándara-Quezada, V., Ruiz-Rico, G. E., Ávila-Soledad, J. M., Reyes, A. A., & Pedroza-Jiménez, F. D. (2021). *Cystic fibrosis: current concepts*. <https://doi.org/10.24875/BMHIM.20000372>
- McCague, A. F., Raraigh, K. S., Pellicore, M. J., Davis-Marcisak, E. F., Evans, T. A., Han, S. T., Lu, Z., Joynt, A. T., Sharma, N., Castellani, C., Collaco, J. M., Corey, M., Lewis, M. H., Penland, C. M., Rommens, J. M., Stephenson, A. L., Sosnay, P. R., & Cutting, G. R. (2019). Correlating cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function with clinical features to inform precision treatment of cystic fibrosis. *American Journal*

*of Respiratory and Critical Care Medicine*, 199(9), 1116–1126.  
[https://doi.org/10.1164/RCCM.201901-0145OC/SUPPL\\_FILE/DISCLOSURES.PDF](https://doi.org/10.1164/RCCM.201901-0145OC/SUPPL_FILE/DISCLOSURES.PDF)

McKight, P. E., & Najab, J. (2010). Kruskal-Wallis Test. In *The Corsini Encyclopedia of Psychology* (pp. 1–1). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470479216.corpsy0491>

Nikmanesh, Y., Foolady Azarnaminy, A., Avishan, P., Taheri, M., Sabeghi, P., Najibzadeh, E., & Khaledi, A. (2022). A Middle East systematic review and meta-analysis of prevalence and antibiotic susceptibility pattern in MRSA *Staphylococcus aureus* isolated from patients with cystic fibrosis. In *Journal of Health, Population and Nutrition* (Vol. 41, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s41043-022-00305-x>

Okolie, C. E., Wooldridge, K. G., Turner, D. P. J., Cockayne, A., & James, R. (2015). Development of a heptaplex PCR assay for identification of *Staphylococcus aureus* and CoNS with simultaneous detection of virulence and antibiotic resistance genes. *BMC Microbiology*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/S12866-015-0490-9>

Rafeeq, M. M., & Murad, H. A. S. (2017). Cystic fibrosis: current therapeutic targets and future approaches. *Journal of Translational Medicine*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/S12967-017-1193-9>

Rumpf, C., Lange, J., Schwartbeck, B., & Kahl, B. C. (2021). *Staphylococcus aureus* and cystic fibrosis—a close relationship. What can we learn from sequencing studies? In *Pathogens* (Vol. 10, Issue 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/pathogens10091177>

Schwerdt, M., Neumann, C., Schwartbeck, B., Kampmeier, S., Herzog, S., Görlich, D., Dübbers, A., Große-Onnebrink, J., Kessler, C., Küster, P., Schültingkemper, H., Treffon, J., Peters, G., & Kahl, B. C. (2018). *Staphylococcus aureus* in the airways of

- cystic fibrosis patients - A retrospective long-term study. *International Journal of Medical Microbiology*, 308(6), 631–639. <https://doi.org/10.1016/J.IJMM.2018.02.003>
- Schwiebert, E. M., Morales, M. M., Devidas, S., Egan, M. E., & Guggino, W. B. (1998). Chloride channel and chloride conductance regulator domains of CFTR, the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(5), 2674. <https://doi.org/10.1073/PNAS.95.5.2674>
- Stephen J. Cavalieri et al., M. B. Coyle. (2005). *Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana*.
- Tahaei, S. A. S., Stájer, A., Barrak, I., Ostorházi, E., Szabó, D., & Gajdács, M. (2021). Correlation Between Biofilm-Formation and the Antibiotic Resistant Phenotype in *Staphylococcus aureus* Isolates: A Laboratory-Based Study in Hungary and a Review of the Literature. *Infection and Drug Resistance*, 14, 1155. <https://doi.org/10.2147/IDR.S303992>
- van Duin, D., & Paterson, D. L. (2016). Multidrug-Resistant Bacteria in the Community: Trends and Lessons Learned. *Infectious Disease Clinics of North America*, 30(2), 377–390. <https://doi.org/10.1016/J.IDC.2016.02.004>
- Vargas-Roldán, S. Y., Lezana-Fernández, J. L., Cerna-Cortés, J. F., Partida-Sánchez, S., Santos-Preciado, J. I., & Rosales-Reyes, R. (2022). Cystic fibrosis: bacterial pathogenesis and CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) modulators. *Boletín Médico Del Hospital Infantil de México*, 79(4), 215–221. <https://doi.org/10.24875/BMHIM.21000128>

- Vindel, A., & Cercenado, E. (2016). *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina portadores del gen mecC: ¿un problema emergente? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 34(5), 277–279. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.01.010>
- Wolter, D. J., Emerson, J. C., McNamara, S., Buccat, A. M., Qin, X., Cochrane, E., Houston, L. S., Rogers, G. B., Marsh, P., Prehar, K., Pope, C. E., Blackledge, M., Déziel, E., Bruce, K. D., Ramsey, B. W., Gibson, R. L., Burns, J. L., & Hoffman, L. R. (2013). *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants Are Independently Associated With Worse Lung Disease in Children With Cystic Fibrosis. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 57(3), 384. <https://doi.org/10.1093/CID/CIT270>
- Wolter, D. J., Onchiri, F. M., Emerson, J., Precit, M. R., Lee, M., McNamara, S., Nay, L., Blackledge, M., Uluer, A., Orenstein, D. M., Mann, M., Hoover, W., Gibson, R. L., Burns, J. L., Hoffman, L. R., Qin, X., Buccat, A. M., Genatossio, A., Schaap, N., ... Slaten, K. (2019). Prevalence and clinical associations of *Staphylococcus aureus* small-colony variant respiratory infection among children with cystic fibrosis: The scvsa multicenter observational study. *The Lancet. Respiratory Medicine*, 7(12), 1027. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(19\)30365-0](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(19)30365-0)

## Anexos

### Anexo n°1: Documento de aprobación



MINISTERIO DE SALUD  
SERVICIO DE SALUD ACONCAGUA  
**COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO**  
EU / CCS / CCS

San Felipe, 26 de Julio de 2022.

#### Carta-C.E.C 12/2022

**Estimada:**  
**Carmen Aravena**  
**Investigador Principal**  
**Presente**

Informo a Ud., que el Comité Ético Científico de Investigación del Servicio de Salud Aconcagua, analizó versión 2 del Estudio: **"Prevalencia y caracterización de staphylococcus aureus y variante colonias pequeñas (VCPs) aisladas de pacientes con Fibrosis Quística controlados en el Hospital Gustavo Fricke, Viña del Mar"**.

En este contexto, se informa que se definió **APROBADO**, debido al cumplimiento de los aspectos científicos metodológico y éticos, revisados por este comité.

Sin otro particular, saluda Atentamente a Ud.



**DR. JOSE LUIS BUCAREY TAPIA**  
**PRESIDENTE**  
**COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO DE INVESTIGACIÓN**  
**SERVICIO DE SALUD ACONCAGUA**

**Distribución:**  
✓ Oficina de Partes CEC-SSA

## Anexo n°2: documento de autorización



MINISTERIO DE SALUD  
SERVICIO SALUD VIÑA DEL MAR-QUILLOTA  
HOSPITAL DR. GUSTAVO FRICKE  
DIRECCION

### COMPROMISO FORMAL

En Viña del Mar, a 9 de noviembre de 2022, entre el Hospital Dr. Gustavo Fricke de Viña del Mar, Persona Jurídica de Derecho Público, Rut N° 61.606.602-1, representado por su Director Jose Luis Moya Diaz, Chileno, C.I. N° 11.896.844-1, domiciliado en Álvarez N° 1532, Viña del Mar, en adelante "El Hospital" por una parte, y doña Carmen Aravena Molló chilena, de profesión bioquímica CI 9581430-1, con domicilio Los villares 4900 casa 10, Calle Larga, en adelante la Investigadora Principal, se celebra el siguiente acuerdo:

**PRIMERO:** Que en virtud de la ejecución del Estudio Clínico o Epidemiológico en el Hospital Dr. Gustavo Fricke, realizado por el Investigador Principal antes individualizado, se compromete en aceptar de manera absoluta, la prohibición de manipulación indebida en cuanto a cualquier información de los pacientes y su ficha médica, considerándose total mente confidencial, la cual debe permanecer siempre en el Establecimiento del Hospital Dr. Gustavo Fricke.

**SEGUNDO:** Que mediante sus firmas las partes manifiestan su entera conformidad respecto al acuerdo celebrado, el cual pasa a ser parte integrante del Contrato de Servicios para Ensayos Clínicos y Formulario Presentación de Antecedentes para Autorización de Estudio Clínico o Epidemiológico Hospital Dr. Gustavo Fricke.

CARMEN  
GLORIA  
ARAVENA  
MOLLO

Firmado digitalmente por  
CARMEN GLORIA  
ARAVENA MOLLO  
Fecha: 2022.11.08  
15:40:12 -03'00'

DRA. CARMEN ARAVENA MOLLÓ  
INVESTIGADOR PRINCIPAL  
Universidad de Valparaíso

D. JOSÉ LUIS MOYA DIAZ  
DIRECTOR  
HOSPITAL DR. GUSTAVO FRICKE

JMD/MITAL/DLD

## Anexo n°3 consentimiento informado

MINISTERIO DE SALUD  
SERVICIO DE SALUD ACONCAGUA  
COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO

### ANEXO N° 11 C

#### CONSENTIMIENTO INFORMADO

**Nombre del estudio:** Prevalencia y caracterización de *Staphylococcus aureus* y de pequeñas colonias variantes (VCPs) de *Staphylococcus aureus* aisladas de pacientes con Fibrosis Quística controlados en el Hospital Gustavo Fricke, Viña del Mar, Chile durante 2022.

**Versión N°:** 2

**Investigadora responsable:** Dra. Carmen Aravena Molló.

**Patrocinante:** Escuela de Medicina. Universidad de Valparaíso.

**Unidad Ejecutante:** Laboratorio de Microbiología y Genética Bacteriana (LMGB), Anexo HOSCA (Hospital San Camilo), Universidad de Valparaíso, San Felipe, en colaboración con el Centro de referencia y Unidad de Fibrosis Quística, Hospital Gustavo Fricke, Viña del Mar.

El propósito de esta información es ayudarle a tomar la decisión de participar en una investigación científica.

Tome el tiempo que requiera para decidir, lea cuidadosamente este documento y haga las preguntas que desee al investigador o al personal a cargo del a investigación.

#### 1. EL O LOS OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN Y SU DURACIÓN

- o Esta investigación busca estudiar la presencia de la bacteria *Staphylococcus aureus* que puede encontrarse en pacientes con fibrosis quística (FQ) produciendo infección pulmonar, esta bacteria se estudiará de las muestras de secreciones de los controles habituales que a usted le realizan en el Hospital Gustavo Fricke (HGF), Viña del Mar (VM) y también en los episodios de exacerbación de la enfermedad.
- o El estudio durara un año desde julio 2022 a julio 2023. Para esta investigación se les solicitara acceso a los datos de su ficha clínica (capacidad pulmonar, talla, peso, infección por otras bacterias, tipo de mutación genética del regulador), y datos como edad y género. Esto para el análisis de la relación entre la presencia o ausencia de esta bacteria con el estado clínico de la enfermedad.
- o Este estudio busca determinar la presencia de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) y VCPs y su relación con el estado clínico de la fibrosis quística (FQ).

#### 2. ATENCIÓN MÉDICA A LA QUE TIENE ACCESO CON LA INVESTIGACIÓN



- De aceptar participar en esta investigación no cambiarán su situación médica ni sus atenciones en la unidad de fibrosis quística, no se realizarán exámenes adicionales pues basta con asistir a sus controles habituales para que se realicen los exámenes de rutina.
- Tampoco se le solicitará muestras adicionales de secreciones respiratorias (flema) fuera de sus controles o episodios de exacerbación.

### 3. EL O LOS PROCEDIMIENTOS DE LA INVESTIGACIÓN INCLUYENDO LA PARTICIPACIÓN ESPECÍFICA DEL SUJETO

- Consistirá en estudio microbiológico de *Staphylococcus aureus* una vez que la bacteria se obtiene de las mismas muestras de secreciones tomadas a Ud. en los controles habituales o de episodio de exacerbación por los mismos profesionales del hospital Gustavo Fricke-Viña del Mar, quienes nos entregarán la bacteria para su estudio posterior en los laboratorios de microbiología de la Universidad de Valparaíso.
- Además, en esta investigación si, Ud. accede participar nos autorizará para utilizar la información de su ficha clínica y datos demográficos los que serán relacionados estadísticamente con la presencia o ausencia de esta bacteria en secreción pulmonar.
- Para este estudio no se requiere análisis o exámenes diferentes o extraordinarios a los de rutina.



### 4. DERECHO A NO PARTICIPAR O RETIRARSE DEL ESTUDIO.

- La decisión de participar en una investigación científica es totalmente **VOLUNTARIA**. Y se realiza firmando la declaración de consentimiento en caso de tener 18 o más años de edad, y en menores de 18 años la decisión la toman los tutores o padres y también el menor a través del asentimiento informado.
- Además, si Ud. una vez habiendo aceptado participar y cambia de opinión y quiere retirarse del estudio por alguna razón, Ud. lo puede hacer está en todo su derecho, ello no tendrá ninguna repercusión económica, social o en su tratamiento médico.
- Si Ud. ha decidido retirarse del estudio para comunicar su decisión puede enviar un mail a la investigadora responsable principal o comunicarse con ella telefónicamente. Además, no es necesario dar una justificación a su decisión.

#### 5. EL O LOS RIESGOS Y EVENTOS ADVERSOS POSIBLES

- o Esta investigación no presentará riesgos directos ni indirectos para su persona debido a que las bacterias que se estudiarán se obtendrán de muestras de sus controles usuales y en episodios de exacerbación, no se utilizarán otras técnicas ni muestras adicionales que no estén en los protocolos de la unidad de FQ del Hospital Gustavo Fricke.
- o La toma de muestra microbiológica será realizada por el mismo personal de la unidad de FQ del HGF, por lo que al aceptar participar en esta investigación no debería haber un riesgo u evento adverso mayor que el que ya existe en la toma de muestras realizadas en controles o en exacerbaciones, ni se pondrán en riesgo sus controles o tratamientos.
- o Riesgo de un mal tratamiento, los resultados de la investigación sobre las características de *S. aureus* solo serán para uso científico y no clínico.

#### 6. BENEFICIOS ESPERADOS PARA EL SUJETO Y PARA LA SOCIEDAD

- o El estudio no presenta beneficio directo para los pacientes en ningún ámbito y tampoco inmediato para la sociedad.
- o Los resultados de la Investigación podrían ser un beneficio indirecto de conocimiento sobre infecciones por *S. aureus* en pacientes con FQ, para la comunidad médica, microbiólogos e investigadores.

#### 7. USOS POTENCIALES DE LOS RESULTADOS.

- o Los resultados de esta investigación serán usados como parte del conocimiento científico y clínico sobre infecciones de *S. aureus* en pacientes con fibrosis quística que se controlan en el centro de referencia de fibrosis quística, Hospital Gustavo Fricke Viña del Mar.
- o Se espera que los resultados sean divulgados en congresos científicos y publicados en una revista científica nacional o internacional.

#### 8. GARANTÍA DE ACCESO A LA INFORMACIÓN NUEVA RELEVANTE

Ud. como pacientes tienen garantizado el acceso a la información y resultados de la investigación a través del nexo con el médico tratante del Centro de Referencia de FQ del Hospital Gustavo Fricke. Dr. Nicolas Johnson.

#### 9. GARANTÍA DE PROTECCIÓN A LA PRIVACIDAD Y RESPETO DE LA CONFIDENCIALIDAD EN EL TRATAMIENTO DE LOS DATOS PERSONALES CON MENCIÓN DE LA METODOLOGÍA A USAR PARA ELLO

- o En esta investigación, se garantizará la protección de la privacidad y respeto de la confidencialidad de datos personales como son nombre, rut, mail, teléfono y domicilio.
- o Los datos personales no se utilizarán como información en los resultados o análisis, en el estudio los pacientes se individualizarán con un código de número y letra, para su resguardo.



- o Los datos personales contenidos en los documentos usados en esta investigación serán resguardados por los investigadores, no serán de acceso público pues solo serán usados como documento oficial de su participación en la investigación.

**PREGUNTAS:**

Si tiene preguntas acerca de esta investigación científica o desea retirarse del estudio puede contactar o llamar a Carmen Aravena Molló, investigadora responsable del estudio, al teléfono (34) 2431241 o al mail: [carmen.aravena@uv.cl](mailto:carmen.aravena@uv.cl). Si tiene preguntas acerca de sus derechos como participante en una investigación Científica, usted puede llamar a Adriana Rojas, Secretaria Ejecutiva del Comité de Ética Científica del Servicio de Salud Aconcagua, al teléfono 34-2492898 (anexo Minsal 340900) o al mail: [claudia.camerati@redsalud.gov.cl](mailto:claudia.camerati@redsalud.gov.cl).



**DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO**

Se me ha explicado el propósito de esta investigación, los procedimientos, los riesgos, los beneficios y los derechos que me asisten y que me puedo retirar (o a mi hijo/hija, familiar o representado) de ella en el momento que lo desee.

- Firmo este documento voluntariamente, sin ser forzado a hacerlo.
- No estoy renunciando a ningún derecho que me asista.
- Se me ha informado que tengo el derecho a reevaluar mi participación en esta investigación según mi parecer y que puedo retirarme en cualquier momento sin dar explicación por ello.
- Al momento de la firma, se me entrega una copia firmada de este documento.

**FIRMAS**



Participante:  
Firma

fecha:

Investigador:  
Firma

fecha:

Testigo de Fe  
Firma

fecha:

**ANEXO N° 11 D**  
**ASENTIMIENTO PARA MENORES DE 18 AÑOS**  
(Se solicitará asentimiento desde los 6 años)

Este proyecto de investigación es realizado por la Dra. Carmen Aravena de la Escuela de Medicina de la Universidad de Valparaíso.

Estás invitado a participar en este estudio que busca conocer más acerca de una bacteria llamada *Staphylococcus aureus* y su relación con la enfermedad la fibrosis quística. También, se invitará a participar en este estudio a otros niños que tienen tu misma condición.

➤ Como parte de este estudio, se te pedirá que realices los controles rutinarios y tomarte los exámenes de siempre en la unidad de fibrosis quística del hospital Gustavo Fricke. Los riesgos de este estudio son bajos y todos ellos han sido explicados a tus padres quien te acompaña.

Puede que tú no te beneficies directamente por participar en este estudio, pero tu participación permitirá conocer más sobre tu enfermedad y esperamos obtener información científica para ayudar a otros niños como tú.

No se le pagará ni a tus padres ni a ti por tu participación en este estudio.

Tu participación es libre y voluntaria. Te puedes retirar en cualquier momento aun cuando hayas firmado este documento. Te puedes negar, aunque tus padres acepten. En cualquier caso, nadie se enojará contigo.

Tu participación en este estudio se mantendrá en secreto, y toda la información y muestras se usarán sólo para los que te estamos contando.

Si quieres o no participar en este estudio, por favor escribe tu nombre en la línea punteada y marca con una X tu decisión.

Yo,.....

Quiero participar 

No quiero participar 

Fecha:



**Anexo n°4** Procedimiento “cultivo de muestras de pacientes con diagnóstico de FQ”





**HOSPITAL  
+ DR. GUSTAVO FRICKE**

<b>Título del documento:</b>	<b>Cultivo de muestras en pacientes con Diagnóstico de fibrosis Quística.</b>
<b>Tipo de documento:</b>	<b>Procedimiento</b>
<b>Versión:</b>	<b>3</b>

	<b>Nombre</b>	<b>Cargo</b>	<b>Fecha</b>	<b>Firma</b>
Elaborado por:	<b>M.Graciela Bascuñán</b>	Tecnólogo Medico Laboratorio Clínico	Febrero 2023	
Revisado por:	<b>Nayade Arriagada</b>	Referente de Calidad Laboratorio Clínico	Abril 2023	
	<b>Patricia Flores</b>	Enfermera Unidad Calidad y Seguridad del paciente	Abril 2023	
Aprobado por:	<b>Tatiana Aldunate</b>	Subdirector Médico	Abril 2023	



Toda copia en PAPEL es un "Documento no Controlado" a Excepción del original, por favor asegúrese de que ésta es la versión vigente del documento consultando referente de calidad de su servicio o a Unidad de Calidad y Seguridad del Paciente.

	Hospital Dr. Gustavo Fricke	Código: APL 1.3	
	Microbiología Laboratorio Clínico	Versión: 3	
	Cultivo de muestras en pacientes con Diagnostico de fibrosis Quística	Fecha Aprobación: Abril 2023	
	Procedimiento	Página 2 de 8	

## Índice

1	Objetivos.....	3
1.1	Objetivo General.....	3
1.2	Objetivos Específicos .....	3
2	Alcance .....	3
3	Definiciones .....	3
4	Responsabilidades.....	3
5	Desarrollo .....	4
5.1	Equipamiento y materiales .....	4
5.1.1	Elementos de bioseguridad .....	4
5.2	Funciones del Técnico Paramédico.....	5
5.3	Funciones del Tecnólogo Médico.....	6
	Indicadores .....	7
6	Anexos.....	7
7	Bibliografía.....	8
8	Tabla de cambios.....	8

Toda copia en PAPEL es un "Documento no Controlado" a Excepción del original, por favor asegúrese de que ésta es la versión vigente del documento consultando referente de calidad de su servicio o a Unidad de Calidad y Seguridad del Paciente.

 <p>Hospital Dr. Gustavo Fricke Servicio de Salud Villa del Mar - Quilón Ministerio de Salud</p>	Hospital Dr. Gustavo Fricke	Código: APL 1.3	 <p>HOSPITAL Dr. GUSTAVO FRICKE</p>
	Microbiología Laboratorio Clínico	Versión: 3	
	Cultivo de muestras en pacientes con Diagnóstico de fibrosis Quística	Fecha Aprobación: Abril 2023	
	Procedimiento	Página 3 de 8	

## 1 Objetivos

### 1.1 Objetivo General

- Diagnóstico microbiológico de las infecciones bacterianas y/o fúngicas del tracto respiratorio inferior en pacientes con fibrosis quística, a través de técnicas de cultivo microbiológico estandarizadas, que permitan un adecuado tratamiento para el paciente.

### 1.2 Objetivos Específicos

- Identificar y cuantificar infecciones de muestras respiratorias tales como Aspirado endotraqueal y Lavado Broncoalveolar en pacientes con diagnóstico de fibrosis Quística
- Entregar información de susceptibilidad que permita orientar al adecuado tratamiento antibiótico
- Detectar mecanismos de resistencia.

## 2 Alcance

Dirigido a Tecnólogos Médicos que trabajen en Microbiología y Técnicos Paramédicos que se desempeñan en Laboratorio de Microbiología, en horario diurno y nocturno.



## 3 Definiciones

- Siembra o Inoculación: Siembra de la muestra o cepa bacteriana en un medio de agar determinado.
- Antibiograma: Uso de discos impregnados en antibióticos para evaluar susceptibilidad bacteriana o uso de métodos automatizados que entregan la CIM (Concentración mínima inhibitoria).
- Medio de cultivo: Solución que contiene agar y nutrientes indispensables para permitir el desarrollo bacteriano.
- Bateria Bioquímica: Uso de pruebas bioquímicas que permiten determinar el comportamiento metabólico de un germen, lo que permitirá su identificación bacteriana.
- MBT Sirius: Equipo automatizado que identifica microorganismos mediante espectrometría de masas.

## 4 Responsabilidades

- **Técnico Paramédico**
  - Verificar las condiciones de la recepción de muestras de acuerdo al instructivo de recepción de muestras microbiológicas
  - Realizar frotis y tinción de Gram.
  - Realizar check-in en sistema Dnlab, y confirmar datos en sistema EpiCenter
  - Sembrar las muestras
  - Realizar baterías bioquímicas y antibiogramas

Toda copia en PAPEL es un "Documento no Controlado" a Excepción del original, por favor asegúrese de que ésta es la versión vigente del documento consultando referente de calidad de su servicio o a Unidad de Calidad y Seguridad del Paciente.

	Hospital Dr. Gustavo Fricke	Código: APL 1.3	
	Microbiología Laboratorio Clínico	Versión: 3	
	Cultivo de muestras en pacientes con Diagnóstico de fibrosis Quística	Fecha Aprobación: Abril 2023	
	Procedimiento	Página 4 de 8	

- **Tecnólogo Médico**

- Realizar lectura de tinción de Gram.
- Realizar identificación y sensibilidad a través del método automatizado MBT Sirius y Phoenix M50. (referirse al instructivo de cada equipo)
- Revisar, interpretar y validar resultados.

## 5 Desarrollo



### 5.1 Equipamiento y materiales

- Mechero Bunsen
- Asa microbiológica
- Plumón permanente
- Medios de cultivos: Placas de agar chocolate, Placas agar sangre, agar Mac-Conkey, agar cetrimida, agar manitol sal, agar HAE, agar bulkorideria, agar Saburaud-Glucosa 2%, agar Cándida cromoagar.
- Sensidiscos con antimicrobianos
- Pinza iris
- Reactivos de rutina para pruebas diferenciales (catalasa, oxidasa y pruebas bioquímicas)
- Estufa de Cultivo a 35°C – 37°C.
- Microscopio binocular, incluye objetivo x 100 inmersión
- Aceite de inmersión.
- Colorantes para tinción de Gram.
- Portaobjetos esmerilado, lápices grafito
- Solución Buffer Fosfato estéril para toma de muestra
- Perlas de vidrio de 3 mm.
- Parafilm
- Phoenix M50
- MBT Sirius
- Tubos Khan con perlas de vidrio estéril
- Vortex
- Puntas estériles para micropipeta
- Tubos con 9.9 ml de NaCl
- Asa calibrada 100 ul
- Micropipeta (volumen 100ul)

#### 5.1.1 Elementos de bioseguridad

- Delantal protector
- Guantes de nitrilo.

Toda copia en PAPEL es un "Documento no Controlado" a Excepción del original, por favor asegúrese de que ésta es la versión vigente del documento consultando referente de calidad de su servicio o a Unidad de Calidad y Seguridad del Paciente.

	Hospital Dr. Gustavo Fricke	Código: APL 1.3	 <b>HOSPITAL</b> <b>DR. GUSTAVO FRICKE</b>
	Microbiología Laboratorio Clínico	Versión: 3	
	Cultivo de muestras en pacientes con Diagnóstico de fibrosis Quística	Fecha Aprobación: Abril 2023	
	Procedimiento	Página 5 de 8	

- Mascarilla N95
- Cubre calzado

## 5.2 Funciones del Técnico Paramédico

- Verificar las condiciones de la recepción de muestras de acuerdo al instructivo de recepción de muestras microbiológicas
- Realizar check-in en sistema Dnlab, y confirmar datos en sistema EpiCenter

### Muestra: lavado broncoalveolar

- Realizar frotis para tinción de Gram.
- Se agregan perlas de vidrio estéril
- Agitar la muestra en vortex por 1 minuto.
- Agregar a un tubo 100ul (0,1 ml) de muestra con micropipeta (usando puntas estériles), en 9,9 ml de suero fisiológico.
- Agitar en vortex por 1 minuto.
- Colocar 100 ul (0,01 ml) con micropipeta (usando puntas estériles) en medios de cultivos: Placas de agar chocolate, Placas agar sangre, agar Mac-Conkey, agar cetrimida, agar manitol sal, agar HAE, agar bulkorideria, agar Saburaud-Glucosa 2%, agar Cándida cromoagar.
- Realizar siembra en la placa completa con asa, por diseminación (figura :1) e incubar placas de agar chocolate, sangre y HAE en jarras de CO2 a 35 +-2°C.
- Incubación de placas en estufa a 35 +-2 °C.

*0,1 / 10 ml = 1/100 parte de cada*



Figura 1: Siembra para recuento



### Medios de transporte: Frasco estéril: EXPECTORACION

- Si la muestra es recibida en frasco estéril, incorporar al envase que contiene la muestra 10 perlas de vidrio de 3 mm y agitar en vortex por 1 minuto. Si la muestra es muy espesa, agregar 1 ml de suero fisiológico además de las perlas de vidrio.
- Agregar a un tubo 100ul (0,1 ml) de muestra con micropipeta (usando puntas estériles), en 9,9 ml de suero fisiológico.
- Agitar en vortex por 1 minuto.

Toda copia en PAPEL es un "Documento no Controlado" a Excepción del original, por favor asegúrese de que ésta es la versión vigente del documento consultando referente de calidad de su servicio o a Unidad de Calidad y Seguridad del Paciente.

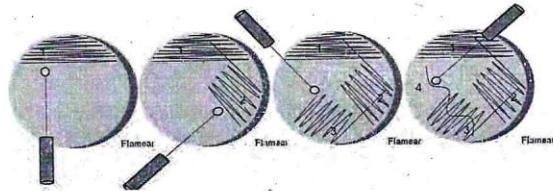
	Hospital Dr. Gustavo Fricke	Código: APL 1.3	 HOSPITAL DR. GUSTAVO FRICKE
	Microbiología Laboratorio Clínico	Versión: 3	
	Cultivo de muestras en pacientes con Diagnostico de fibrosis Quística	Fecha Aprobación: Abril 2023	
	Procedimiento	Página 6 de 8	

- Realizar frotis para tinción de Gram.
- Colocar 10ul (0,01 ml) con micropipeta (usando puntas estériles) en placas: Medios de cultivos: Placas de agar chocolate, Placas agar sangre, agar Mac-Conkey, agar cetrimida, agar manitol sal, agar HAE, agar bulkolderia, agar Saburaud-Glucosa 2%, agar Cándida cromoagar
- Incubación de placas en estufa a 35+-2 °C.
- Incubar placas de agra chocolate y sangre en jarras de CO2.

#### Medios de transporte: Medio de transporte Stuart

- Realizar frotis para tinción de Gram.
- Realizar siembra por agotamiento (figura: 2) según instructivo de siembra en medios de cultivos: Placas de agar chocolate, Placas agar sangre, agar Mac-Conkey, agar cetrimida, agar manitol sal, agar HAE, agar bulkolderia, agar Saburaud-Glucosa 2%, agar Cándida cromoagar
- Incubación de placas en estufa a 35 +-2°C.
- Incubar placas de agra chocolate y sangre en jarras de CO2 a 35 +-2°C.



Figura 2 : Siembra por agotamiento



#### 5.3 Funciones del Tecnólogo Médico.

- Lectura microscópica de frotis teñidos con Tinción Gram, informe de observación en base a morfología y afinidad tintorial.
- Observación diaria de colonias microbianas desarrolladas en los diferentes medios de cultivos. Si no hubo desarrollo bacteriano se reincuban hasta por 5 días a 35-37° C y se revisaran diariamente.
- Las placas de agar candida y agar saboureaud se incubaran hasta por 15 días y se revisaran diariamente.
- Se procederá a identificación por método automatizado MBT Sirius y susceptibilidad antimicrobiana por método automatizado Phoenix M50, referirse a manuales de cada equipo .
- La lectura de pruebas de susceptibilidad se interpretará según Tabla CLSI. vigente.
- Interpretación e ingreso de resultados de identificación y susceptibilidad microbiana en sistema EpiCenter.
- Realizar lectura de recuento según procedimiento normado. (Ver anexo 1 de este documento)

Toda copia en PAPEL es un "Documento no Controlado" a Excepción del original, por favor asegúrese de que ésta es la versión vigente del documento consultando referente de calidad de su servicio o a Unidad de Calidad y Seguridad del Paciente.

	Hospital Dr. Gustavo Fricke	Código: APL 1.3	
	Microbiología Laboratorio Clínico	Versión: 3	
	Cultivo de muestras en pacientes con Diagnóstico de fibrosis Quística	Fecha Aprobación: Abril 2023	
	Procedimiento	Página 7 de 8	

- Validación de resultados ingresados a sistema EpiCenter.

#### 5.4 Consideraciones

- Estudios de susceptibilidad a Pseudomonas aeruginosa y Enterobacterias realizar inóculo a 0.5 Mc Farland y sembrar en césped en medio Mueller Hinton e incorporar sensidisco de TOBRAMICINA
- Para identificación de Pseudomonas con morfotipo MUCOSO, informar que presenta dicho morfotipo.
- Enviar al Laboratorio de referencia ISP, todas las cepas obtenidas que son de confirmación obligatoria. Ver instructivo de notificaciones obligatorias.
- Enviar informe por correo a epidemiología y a SEREMI de todas las muestras que sean de notificación obligatoria según decreto N°7 (Decreto que reemplaza al decreto N° 158)

#### Indicadores

- El procedimiento no posee indicador(es) asociado(s).

#### 6 Anexos

##### Anexo 1

Si hubo desarrollo bacteriano en el cultivo se realiza recuento y se aplica el siguiente criterio:



- En el procesamiento de la muestra se realiza una dilución para obtener el recuento final, esto significa que:
  - Cada colonia presente equivale a 10.000 ufc/ml

Ejemplo:

- 1 colonia = 10.000 ufc/ml =  $1 \times 10^4$
- 5 colonias = 50.000 ufc/ml =  $5 \times 10^4$
- 50 colonias = 500.000 ufc/ml =  $5 \times 10^5$
- 100 colonias = 1.000.000 ufc/ml =  $1 \times 10^6$
- 200 colonias = 2.000.000 ufc/ml =  $2 \times 10^6$

Agregar como comentario en informe final: NO existe valor de referencia, se recomienda interpretar en base al contexto clínico.

Toda copia en PAPEL es un "Documento no Controlado" a Excepción del original, por favor asegúrese de que ésta es la versión vigente del documento consultando referente de calidad de su servicio o a Unidad de Calidad y Seguridad del Paciente.

	Hospital Dr. Gustavo Fricke	Código: APL 1.3	
	Microbiología Laboratorio Clínico	Versión: 3	
	Cultivo de muestras en pacientes con Diagnóstico de fibrosis Quística.	Fecha Aprobación: Abril 2023	
	Procedimiento	Página 8 de 8	

## 7 Bibliografía

- Manual Procedimientos y Técnicas de Laboratorio, Vol. I, II y III Microbiología General, Instituto de Salud Pública de Chile 1983
- Tablas HTLM de identificación de pruebas bioquímicas. ISP.
- Microbiología Medica, Koneman Ed. Panamericana 6° ed 2008
- Microbiología Medica, Jawetz, Melnick y Adelberg Ed 27° Mc Graw Hill 2016 Autor1,.

## 8 Tabla de cambios

Modificaciones Realizadas	Responsable	Fecha Modificación	Nueva Versión
En Instructivo Cultivo de Secreciones versión 3, se incluye procedimiento de "Muestras provenientes de pacientes con diagnóstico de Fibrosis Quística".	TM. Alejandro Joyas	agosto 2017	1
Se crea "instructivo de procedimientos de muestras en pacientes con diagnóstico de fibrosis quística".	TM. Juana Escobar	Junio 2020	2
Se actualiza Instructivo de procedimiento por cambio de formato, de equipamiento y sistema informático nuevo de microbiología.	TM. Graciela Bascuñán	Febrero 2023	3

Toda copia en PAPEL es un "Documento no Controlado" a Excepción del original, por favor asegúrese de que ésta es la versión vigente del documento consultando referente de calidad de su servicio o a Unidad de Calidad y Seguridad del Paciente.