



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE
TUMBES**

ESCUELA DE POSGRADO

**TESIS DE MAESTRO EN CIENCIAS CON
MENCIÓN EN:**

BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS
PATÓGENAS CULTIVABLES PRESENTES EN LAS VÍAS
RESPIRATORIAS DE PACIENTES PERUANOS CON
FIBROSIS QUÍSTICA**

RUTH ELIZABETH AQUINO ORDINOLA

TUMBES, PERÚ

(2016)



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE
TUMBES**

ESCUELA DE POSGRADO

**TESIS DE MAESTRO EN CIENCIAS CON
MENCIÓN EN:**

BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS
PATÓGENAS CULTIVABLES PRESENTES EN LAS VÍAS
RESPIRATORIAS DE PACIENTES PERUANOS CON
FIBROSIS QUÍSTICA**

RUTH ELIZABETH AQUINO ORDINOLA

TUMBES, PERÚ

(2016)

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Yo Ruth Elizabeth Aquino Ordinola declaro que los resultados reportados en esta tesis, son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Asimismo declaro que hasta donde yo sé no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona excepto donde se reconoce como tal a través de citas y con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información presentada sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de esta tesis es producto de mi propio trabajo con la dirección y apoyo de mis asesores de tesis y mi jurado calificador, en cuanto a la concepción y al estilo de la presentación o a la expresión escrita.

RUTH ELIZABETH AQUINO ORDINOLA

ACTA DE REVISIÓN Y DEFENSA DE TESIS



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
ESCUELA DE POSGRADO
 Tumbes - Perú

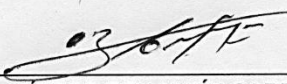
ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS

En Tumbes, a los trece días del mes de junio del año dos mil dieciséis, a las 8:05 horas, en el Auditorio de la Facultad CCs- Salud, se reunieron los miembros del Jurado designados con **Resolución Directoral N° 028-2016/UNT-EPG**, **Dr. VÍCTOR BENJAMÍN CARRIL FERNÁNDEZ** - Presidente; **Dr. AUBERTO HIDALGO MOGOLLÓN** Secretario; **Dr. ERIC MIALHE, PH.D. D.E** – vocal; y con **Resolución Directoral N° 57-2016/UNT-EPG-D** se fijó la fecha de sustentación y defensa de la tesis: **CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS PATOGENAS CULTIVABLES PRESENTES EN LAS VÍAS RESPIRATORIAS DE PACIENTES PERUANOS CON FIBROSIS QUÍSTICA**; presentada por la egresada del Programa de maestría en Biotecnología Molecular **AQUINO ORDINOLA, RUTH ELIZABETH**, asesorada por el **M.Sc. BENOIT DIRINGER**.

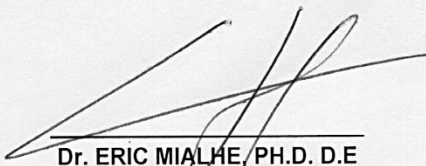
Concluida la exposición y sustentación, absueltas las preguntas y efectuadas las observaciones, lo declaran: Aprobado Sobresaliente, dando cumplimiento al Art. 29° del Reglamento de Investigación con fines de Graduación en la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes.

Siendo las 8:35 horas, se dio por concluido el acto académico, y dando conformidad se procedió a firmar la presente acta en presencia del público.

Tumbes, 13 de junio de 2016


 Dr. VÍCTOR BENJAMÍN CARRIL FERNÁNDEZ
 Presidente


 Dr. AUBERTO HIDALGO MOGOLLÓN
 Secretario


 Dr. ERIC MIALHE, PH.D. D.E
 Vocal

RESPONSABLES

Blga. Ruth Elizabeth Aquino Ordinola

EJECUTOR

M.Sc. Benoit Diringier

ASESOR

JURADO DICTAMINADOR

DR. VICTOR CARRIL FERNÁNDEZ

PRESIDENTE

DR. AUBERTO HIDALGO MOGOLLON

SECRETARIO

DR. ERIC MIALHE MATONNIER

VOCAL

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.	ix
ABSTRACT.	x
1. INTRODUCCIÓN.	11
2. MARCO DE REFERENCIA DEL PROBLEMA.	14
2.1. Antecedentes.	14
2.2. Bases teórico-científicas.	16
2.3. Definición de términos básicos.	19
3. MATERIAL Y MÉTODOS.	21
3.1. Localidad y periodo de ejecución.	21
3.2. Tipo y diseño de investigación.	21
3.3. Declaración de Ética.	21
3.4. Población estudiada.	21
3.5. Recolección de la muestra.	22
3.6. Cultivo microbiológico estándar.	22
3.7. Extracción de ADN y secuenciación del gen16SARN.	23
3.8. Espectrometría de masas MALDI TOF.	24
3.9. Espectrometría de masas MALDI TOFTOF.	25
4. RESULTADOS.	28
5. DISCUSIÓN.	36
6. CONCLUSIONES.	45
7. RECOMENDACIONES.	47
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	49
9. ANEXOS.	65

RESUMEN

En los pacientes con Fibrosis Quística (FQ), la morbilidad y la mortalidad se asocian principalmente a infecciones microbianas crónicas de las vías respiratorias inferiores. En el presente trabajo las comunidades bacterianas cultivables procedentes de muestras de esputo de 21 pacientes pediátricos fueron identificadas a nivel molecular. Las bacterias fueron aisladas mediante técnicas microbiológicas estándares, mientras que la caracterización de las cepas puras se realizó por secuenciación del gen ARNr 16S y análisis por espectrometría de masas MALDI TOF y MALDI TOF TOF. Se lograron aislar 127 cepas que fueron diferenciadas en 25 especies y 10 géneros. Los patógenos predominantes fueron *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *klebsiela oxytoca* y diferentes Enterobacterias. El análisis por MALDI TOF permitió obtener espectros representativos de cada especie aislada, lográndose también recuperar y caracterizar por MALDI TOF TOF secuencias peptídicas de las especies más comunes. Nuestros datos muestran que los microorganismos colonizadores de las vías inferiores de los pacientes con FQ forman parte de un ecosistema microbiano complejo. Los resultados obtenidos servirán para la construcción de una base de datos de cepas patógenas nativas mientras que la identificación de péptidos por MALDI TOF TOF abre el camino para establecer la relación entre el proteoma bacteriano y su patogenicidad.

Palabras clave: *Infecciones pulmonares, bacterias, ARNr 16S, Espectrometría doble masa Maldi TOF TOF, Perú.*

ABSTRACT

In patients affected by cystic fibrosis (CF), morbidity and mortality are mainly associated with chronic microbial infections of the lower respiratory tract caused by opportunistic pathogens. In this study the cultivable bacterial communities were characterized from sputum samples from 21 Peruvian paediatric patients with CF. Bacteria were grown and isolated by standard microbiological culture techniques, while the characterization of inbred strains was performed by sequencing the 16S rRNA gene and analysis by MALDI TOF and MALDI TOF TOF mass spectrometry. It was possible to isolate 127 strains which were differentiated into 25 species and 10 genera by sequencing the 16S rRNA gene. The predominant pathogens were *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella oxytoca*, and different species of Enterobacterias. MALDI TOF analysis allowed us to get mass spectra representative of each isolated species, whereas the application of MALDI TOF TOF permitted to recover and characterise peptidic sequences of the most common species. Our data show that microorganisms colonizing the lower airways of CF patients are part of a complex microbial ecosystem. With the results obtained by 16S rRNA and MALDI TOF analysis, we obtained specific spectra of bacteria of Peruvian patients which will serve to build a database of native pathogenic strains for future studies while protein identification by MALDI TOF TOF paved the way to establish the relationship between bacterial proteome and its pathogenicity.

Key words: *Pulmonar infections, bacterias, 16S rRNA, double mass spectrometry MALDI TOF TOF, Peru.*

1. INTRODUCCIÓN.

La Fibrosis Quística (FQ) es una enfermedad autosómica recesiva, potencialmente mortal, que afecta alrededor de 70.000 personas en todo el mundo (Paganin *et al.* 2015). Es causada por mutaciones en el gen regulador de la conductancia transmembrana de la FQ (CFTR). Las mutaciones en el CFTR reducen el volumen de líquido de la superficie de las vías respiratorias, disminuyendo de este modo el aclaramiento mucociliar de los patógenos bacterianos, lo que causa inflamaciones crónicas (Chmiel and Davis 2003).

Las infecciones pulmonares crónicas son la principal causa de muerte en la FQ (Nixon *et al.* 2001). Las vías respiratorias de los pacientes con FQ están colonizadas e infectadas por numerosas bacterias, desde una edad temprana. Muchas de las bacterias que se aíslan de esputo de FQ son microorganismos ambientales comunes que pueden llegar a ser patógenos o son cepas patógenas que primero afectan las vías respiratorias superiores antes de colonizar todo el sistema respiratorio (Armougom *et al.* 2009). Entre los patógenos cultivables más comunes, se incluyen *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Burkholderia cepacia* complex (BCC). En los últimos años un creciente número de patógenos emergentes ha sido asociado a problemas respiratorios en FQ como especies de *Achromobacter* y *Stenotrophomonas* (Ramsay *et al.* 2016).

Estudios basados en Secuenciación de Próxima Generación (Next Generación Sequencing, NGS) han reportado que la composición de la microbiota de pulmón evoluciona con la edad. En tanto que los niños pequeños se infectan comúnmente con *S. aureus* y *H. influenzae*, a medida que van creciendo se contaminan con microbios más problemáticos como *P. aeruginosa* y *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) o BCC (Ramsay *et al.* 2016). Finalmente *P. aeruginosa* termina dominando completamente la microbiota pulmonar en el 80% de los casos, conllevando a una muerte progresiva por paro respiratorio. Se ha

documentado la existencia de cepas epidémicas específicas a FQ, por lo que se requiere una identificación a nivel molecular (Keravec *et al.* 2015).

La correcta identificación de estas bacterias por métodos microbiológicos convencionales es frecuentemente limitada debido a su pobre carácter de discriminación (Bosshard *et al.* 2006). La secuenciación del gen ARNr 16S se ha vuelto, progresivamente, la técnica de referencia para la identificación microbiana (Ferroni *et al.* 2002) siendo utilizada frecuentemente para identificar bacterias aisladas de las vías respiratorias (Cox *et al.* 2010; Lynch and Bruce 2013; Caverly *et al.* 2014). La identificación temprana de los patógenos de las vías respiratorias inferiores permite una respuesta rápida para evitar eventos de infecciones agudas crónicas (exacerbaciones) que provocan respuestas inmunitarias fuertes y conllevan a la degradación rápida de los pulmones (Castilla 2008).

La espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por matriz con tiempo de vuelo (MALDI TOF) ha venido imponiéndose en los laboratorios de microbiología clínica por ser una tecnología rápida, precisa y menos costosa de identificación de microorganismos que las técnicas convencionales (Desai *et al.* 2012; Marko *et al.* 2012). Esta técnica se basa en el análisis de espectros de masas de proteínas bacterianas, principalmente proteínas ribosomales. La identificación se realiza por comparación del espectro del microorganismo investigado con espectros de masas en una base de datos de referencia (Desai *et al.* 2012; Fernandez-Olmos *et al.* 2012; Lay 2001; Marko *et al.* 2012). El MALDI-TOF ha demostrado ser eficiente para la identificación de bacterias, particularmente micobacterias y levaduras comunes que son difícilmente identificables por los métodos de rutina (Desai *et al.* 2012; AbdulWahab *et al.* 2015).

Varios estudios han reportado el uso de MALDI-TOF MS para la identificación de bacterias en FQ (Sandrin *et al.* 2013; Fernández-Olmos *et al.* 2012). Sin embargo, estos estudios subrayan que la identificación a nivel de especies sigue siendo complicada para especies nuevas, poco frecuentes o muy emparentadas (ejemplo *E. coli* y *Shigella*) (AbdulWahab *et al.* 2015).

La identificación de microorganismos patógenos por MALDI TOF necesita de bases de datos robustas de amplia información por ejemplo, Alby *et al.* (2013) emplearon tres bases de datos (Viteck MS SARAMIS (RUO), Vitek MS v2.0 (IVD) y Bruker Biotyper) para la identificación de diversas cepas patógenas pertenecientes al grupo de *Burkholderia cepacia complex*, sin embargo, sugirieron que se requiere una mejor representatividad en las bases de datos de algunos microorganismos para hacer una identificación más consistente a nivel de especie. Este hallazgo también fue reportado para la identificación de especies de los géneros *Acinetobacter* y *Achromobacter*, pues la identificación de los espectros proteicos de varias cepas fue inconsistente con los resultados de secuenciación del gen ARNr 16S (Homem *et al.* 2014; Rodrigues *et al.* 2015). Sin embargo, se ha demostrado que las bases de datos individualizadas (propias) pueden lograr la identificación a nivel de especies > 98% (Degand *et al.* 2008) destacando la importancia de crear bases de datos específicas a partir de cepas nativas correctamente identificadas. Esto podría ser realizado por identificación de ARNr 16S complementada con el perfil MALDI TOF o con una caracterización más profunda del proteoma por MALDI TOF TOF.

En el Perú, la FQ es una enfermedad poco conocida, con deficiente tratamiento, falta de pruebas de tamizaje neonatal y falta de centros de diagnóstico de prueba del sudor lo que conduce a que la mayoría de niños con FQ no sean diagnosticados o sean diagnosticados muy tardíamente. En consecuencia, los pacientes peruanos tienen una esperanza de vida de alrededor de 14 años, por debajo del promedio sudamericano (25 años) y muy inferior a la de los países del Norte (38 años) (Samienigo S., *com. pers.*).

El objetivo de este estudio fue identificar y caracterizar los patógenos bacterianos de las vías respiratorias detectados en el esputo de pacientes peruanos con FQ. La composición de la microbiota de un total de 21 muestras de esputo de pacientes peruanos, fue investigada utilizando métodos basados en cultivo, secuenciación del gen ARNr 16S y análisis por espectrometría de masas MALDI TOF y doble masa MALDI TOF TOF.

2. MARCO DE REFERENCIA DEL PROBLEMA.

2.1. Antecedentes.

Hoffman (2013) afirma que, la Fibrosis Quística (FQ) es una enfermedad genética autosómica recesiva humana letal que requiere la herencia de dos alelos defectuosos y que es provocada por mutaciones en el gen que codifica para una proteína conocida como Regulador de la Conductancia Transmembrana de la Fibrosis Quística (CFTR por sus siglas en inglés). Esta proteína transmembrana controla el transporte de cloro y regula indirectamente el intercambio de sodio entre la célula y el medio extracelular. Los alelos mutados provocan la disminución del transporte de cloruro. La FQ se expresa solo en los pacientes que presentan mutaciones para el CFTR en ambos alelos, cada alelo siendo heredado por vía materna y paterna. Los defectos de la CFTR inducen la acumulación de Cl^- y Na^+ en las células epiteliales de los órganos que producen secreciones mucosas en órganos como pulmones, páncreas, hígado, intestinos, canales deferentes y glándulas de sudor. Las concentraciones de iones intracelulares inducen la entrada de agua en las células por ósmosis resultando en un mucus deshidratado y espeso en estos órganos. Esta condición provoca disfunciones digestivas severas y acumulación de mucus en las vías respiratorias lo que se traduce en falta de crecimiento y de ganancia de peso, bronquitis, rinitis, cirrosis, diabetes, esterilidad y, lo más grave, deterioro de la función pulmonar. En consecuencia, los pacientes con FQ presentan un promedio de vida de 38 años en los Estados Unidos o la Unión Europea y raramente superan algunos años sin tratamientos adecuados

El gen CFTR responsable de la FQ fue identificado mediante técnicas de clonación en 1989, se localiza en el brazo largo del cromosoma 7 en el sector denominado q31- q32, (Tsui 1995). Este gen mide aproximadamente 250 kilobases, contiene 27 exones y transcribe un ARN mensajero de 6500 bases, se expresa en las células secretoras, senos paranasales, pulmones, páncreas, hígado y tracto reproductivo. El producto de la traducción es una proteína que contiene 1480

aminoácidos, y que se ubica en la porción apical de la membrana de las células epiteliales después de sufrir cambios postraduccionales (Tsui 1995).

Según García (2009) el test del sudor es el principal método de validación del diagnóstico de la FQ. Los pacientes que sufren esta afección presentan una concentración de cloruro sódico en el sudor más alta que las personas sanas; basándose en este hecho se realiza la prueba con la intención de demostrar la existencia de la enfermedad en aquellos pacientes que presentan síntomas sugestivos, generalmente niños con infecciones respiratorias repetidas o signos de malnutrición. Resultados inferiores a 30 mEq de cloruro por litro, son considerados negativos, es decir que el paciente no tendría la enfermedad. Cuando los valores están entre 30 y 60 mEq de cloruro por litro se considera que el resultado es dudoso; y, cuando es superior a 60 mEq de cloruro por litro, el resultado es considerado positivo, es decir el paciente padece de Fibrosis Quística.

A falta de una cura confiable, el 95% de los pacientes con FQ siguen muriendo por fallas respiratorias debido a las infecciones microbianas crónicas. La escasez de adultos o pre adultos con FQ en las listas de personas atendidas en los hospitales nacionales es reveladora de la corta edad de fallecimiento de los pacientes. La identificación y la caracterización temprana de los patógenos que colonizan las vías respiratorias inferiores permiten una respuesta rápida y adecuada para evitar eventos de infecciones agudas crónicas (exacerbaciones) que provocan respuestas inmunitarias fuertes y conllevan a la degradación rápida de los pulmones.

Insuficientes trabajos han sido publicados sobre la prevalencia de patógenos bacterianos en los pulmones de los pacientes en el país. Torres (2002) determinó que *P. aeruginosa* estaba presente en el 81% de las muestras de esputo, seguida por *S. aureus*, y *S. pneumoniae*. Más recientemente, Castilla (2008) identificó que *P. aeruginosa*, *S. aureus* eran los primeros patógenos colonizadores en 35% y 25% de los casos, respectivamente. También analizó que *P. aeruginosa* estaba presente

en el 72% de los casos de fallecimientos. Sin embargo, los laboratorios de microbiología de los hospitales nacionales cuentan únicamente con técnicas de cultivo básicas, relativamente confiables y carecen de herramientas de biología molecular que permitan una caracterización específica de las cepas bacterianas y fúngicas. En consecuencia, 1) no se tiene una visión detallada de las cepas que infectan a los pacientes del país, 2) no se sabe si las cepas están relacionadas (cepas silvestre o nosocomiales) y si existe transmisión paciente a paciente y 3) se desconoce si son específicas al país.

2.2. Bases teórico-científicas.

La Fibrosis Quística está sujeta a intensas investigaciones alrededor del mundo. Existe entonces un desarrollo constante de nuevas drogas destinadas a corregir los defectos de las mutaciones del CFTR, nuevos antibióticos o moléculas para eliminar a los patógenos, agentes de tipo mucolíticos, broncodilatadores, biomarcadores y otros que disminuyan los síntomas (Penque 2007; Gomes-Alves *et al.* 2010; Balch y Yates 2011; Pérez *et al.* 2013; Hoffman 2013); evaluaciones de terapia génica mediante vectores virales y no virales (Prickett *et al.* 2013), trabajos sobre el cultivo, la transformación y la renovación celular mediante herramientas de terapia y regeneración celular (Duchesneau *et al.* 2010). Además, tanto el diagnóstico molecular de las mutaciones como la microbiología clínica han progresado fuertemente en los últimos años.

La caracterización molecular de los microorganismos se basa en el análisis de los genes que se encuentran en un entorno como sustitutos del propio organismo, esto ha revolucionado nuestra comprensión de las comunidades microbianas (Lane *et al.* 1985). Los estudios de los genes universales, especialmente la pequeña subunidad rRNA, proporcionan retratos filogenéticos de las comunidades, incluyendo organismos que aún no han sido cultivadas (Frank *et al.* 2008). Estos datos aumentan en valor con el tiempo y proporcionan más puntos de anclaje que se relacionan la filogenia y la fisiología de los organismos. Por otra

parte, las comunidades se comparan con facilidad entre ubicaciones y con el tiempo (Lane *et al.* 1985). Una contribución esencial para la utilidad de este enfoque es la interspersión de secuencias más o menos conservadas dentro de los genes de ARNr. Las porciones más variadas distinguen los grupos filogenéticos, mientras que las porciones conservadas proporcionan secuencias universales (o casi universales) para la unión de primers de PCR. Esto permite la amplificación específica de los genes de interés fuera del ADN genómico total de la comunidad (metagenoma) (Frank *et al.* 2008).

Hasta los años 90s, la taxonomía microbiana estaba basada en técnicas de cultivo clásicas, medios selectivos, coloración de Gram y pruebas fisicoquímicas. Estos elementos siguen vigentes pero han demostrado importantes limitaciones en la identificación de bacterias patógenas. El problema reside en la extraordinaria capacidad de modulación genética de las bacterias gracias a fenómenos de mutación, recombinación, intercambios de genes entre bacterias como se observa en la creciente resistencia a antibióticos de numerosas cepas microbianas. Estos complejos fenómenos inducen que dos bacterias “morfológicamente” pertenecientes a la misma especie demuestren comportamientos distintos en términos de virulencia, relativizando así la noción de “especies” en estos microorganismos.

Las biotecnologías moleculares revolucionaron este campo, en particular con la posibilidad de detectar genes específicos, secuenciar genomas completos o identificar bacterias no cultivables. En la actualidad, el análisis de la secuencia del gen ARNr 16S (bacteria) o ARNr 18S (hongos) se impuso como la técnica de referencia para la taxonomía microbiana (Slabbinck *et al.* 2010). En los últimos años, técnicas moleculares emergentes basadas en la caracterización del perfil proteico por MALDI TOF están desplazando la taxonomía clásica y la secuenciación (Khot *et al.* 2012). Numerosos trabajos han demostrado las increíbles ventajas de esta técnica en términos de rapidez (identificación de una cepa en 3 segundos a 2 horas), disminución del costo operativo, simplicidad (Steensels *et al.* 2011; Champion 2012). Al igual que la secuenciación, la identificación por MALDI TOF

compara el perfil proteico de ribosomas de una bacteria con los presentes en un banco de datos de bacterias previamente identificadas. El resultado es expresado en porcentaje de homología para la secuenciación y en un valor absoluto para el MALDI TOF y permite determinar la cercanía del perfil propuesto con los miles existentes en los bancos de datos. En microbiología médica el MALDI TOF demostró ser una herramienta muy eficaz en la identificación en comparación con las otras técnicas (Wieser *et al.* 2012). Desai *et al.* (2012) demostraron que el MALDI TOF permitía identificar la gran mayoría de los microorganismos aislados de esputos de pacientes con FQ, en particular en algunos géneros complicados como el *Burkholderia cepacia complex* u hongos. En algunos casos, el MALDI TOF ha mostrado dificultades para identificar ciertos tipos de bacterias como *Shigella sp.* requiriéndose la identificación por secuenciación (Welker *et al.* 2011). En teoría, se podría también recurrir al uso de taxonomía por MALDI TOF TOF (identificación basada sobre todas las proteínas) aunque aún no existen tales trabajos, la realización de perfiles microbianos por MALDI TOF TOF y secuenciación permitirá crear una “proteínoteca” completa para cada cepa aislada propia a la UNT.

2.3. Definición de términos básicos.

CFTR: El gen CFTR (Regulador de la Conductancia Transmembrana de la Fibrosis Quística). Este gen codifica para una proteína transmembrana que controla el transporte de cloro y regula indirectamente el intercambio de sodio entre la célula y el medio extracelular. Las importantes concentraciones en iones intracelulares inducen la entrada de agua en las células por ósmosis resultando en un mucus deshidratado y espeso en estos órganos (Hoffman 2013)

ADN: El ácido desoxirribonucleico, frecuentemente abreviado como ADN, es un ácido nucleico que contiene instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los organismos vivos conocidos y algunos virus, y es responsable de su transmisión hereditaria. Tiene una estructura doble cadena complementaria y anti paralela. La unidad formadora del ADN es el nucleótido, y cada nucleótido, a su vez, está formado por un azúcar (la desoxirribosa), una base nitrogenada (que puede ser Adenina→A, Timina→T, Citosina→C o Guanina→G) y un grupo fosfato que actúa como unión con el siguiente nucleótido (Ferrer *et al.* 2011).

GEN: Un gen es una secuencia ordenada de nucleótidos en la molécula de ADN (o ARN, en el caso de algunos virus) que contiene la información necesaria para la síntesis de una macromolécula con función celular específica, habitualmente proteínas pero también ARNm, ARNr y ARNt, ARNs (Bruce *et al.* 2002).

PCR: La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction), es una técnica de biología molecular desarrollada en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta

partir de una única copia de ese fragmento original, o molde para obtener billones de billones de copias (Bartlett and Stirling 2003).

ARNr 16S: ARN ribosómico 16S (o 16S rRNA) es un componente de la subunidad pequeña 30S de los ribosomas procariontes. Los genes que lo codifican se conocen como genes 16S rRNA y se utilizan en caracterización molecular debido a que varias regiones de este gen son muy variables y discriminatorias a nivel de especies mientras que otras porciones son muy conservadas (también llamadas universales) en los procariontes y sirven como molde para la amplificación por PCR (Janda and Abbott 2007).

MALDI TOF TOF: Es una técnica de ionización suave utilizada en espectrometría de masas. Se denomina MALDI por sus siglas en inglés *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* (desorción/ionización láser asistida por matriz) y TOF por el separador de iones que se acopla al MALDI y cuyo nombre procede también de sus siglas en inglés *Time-Of-Flight*. Es un equipo que permite el análisis de biomoléculas (biopolímeros como las proteínas, los péptidos, los azúcares y los lípidos). El principio consiste en depositar una muestra sobre una placa de metal, recubrirla con una matriz ionizada para protegerla, facilitar su vaporización y su ionización. La muestra es entonces irradiada con un láser pulsado que permite despegar suavemente las moléculas de la muestra que van a cargarse iónicamente. Esta nube se eleva en una cámara de vacío y las moléculas ionizadas son atraídas por un campo eléctrico. El “tiempo de vuelo” (*Time Of Flight*) de la molécula hasta el detector depende de su masa y de su carga. En función de este tiempo el equipo puede deducir la identidad de la molécula. La función TOF TOF consiste en desintegrar completamente (al nivel de amino ácido) una molécula específica para poder reconstituirla. Esta función es particularmente interesante en caso de moléculas desconocidas (Desai *et al.* 2012).

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1. Localidad y periodo de ejecución

Esta investigación se desarrolló en el laboratorio del centro de investigación INCA'BIOTEC S.A.C. ubicado en la ciudad de Tumbes – Perú. El período de ejecución fue entre febrero del 2015 a febrero del 2016.

3.2. Tipo y diseño de investigación.

De acuerdo al objetivo que persigue: Aplicada.

De acuerdo a la técnica de contrastación que utiliza: Descriptiva.

3.3. Declaración de Ética

La aprobación ética para realizar este estudio fue otorgada por el Instituto Nacional de Salud del Niño (INSN) obteniéndose el consentimiento informado de los padres y/o apoderados de los pacientes, también se les hizo firmar una carta de aceptación, según las normas éticas institucionales y nacionales.

3.4. Población estudiada

Pacientes con Fibrosis Quística registrados en el hospital Edgardo Rebagliati Martins (ESSALUD) y en el Instituto Nacional de Salud del Niño (INSN), Lima, por presentar al menos un síntoma característico de la enfermedad y con diagnóstico positivo por la prueba del sudor ($> 60\text{mEq/L}$).

3.5. Recolección de la muestra

Se colectó una muestra de esputo por cada paciente (2 – 4 ml) aproximadamente, estas fueron conservadas a 4 °C hasta su procesamiento (dentro de 1 hora). En algunos pacientes que no sabían expectorar se realizó un hisopado faríngeo. La toma de muestra se realizó en ayuno y después de un lavado bucal. La calidad de las muestras de esputo fue evaluada mediante un examen citológico de frotis frescos y fue clasificada de acuerdo al número de células epiteliales y leucocitos polimorfonucleares. Las muestras de esputo fueron clasificadas en tres categorías de calidad: calidad deficiente, cuando el número de células epiteliales (células/campo) fue ≥ 25 y el número de leucocitos (células/campo) fue ≤ 10 ; calidad apropiada cuando el número de células epiteliales fue ≤ 25 y el número de leucocitos (células/ campo) fue ≥ 10 . Las otras combinaciones entre células epiteliales fueron consideradas de calidad moderada.

3.6. Cultivo microbiológico estándar

De forma general, todos los protocolos de microbiología siguieron las recomendaciones de las fundaciones europeas de FQ (Euro Care CF y CF UK trust) cuyos protocolos están detallados en Hogart *et al.* (2009); Denton *et al.* (2010); Coman *et al.* (2012).

Se vertió 10 μ l de la muestra directamente sobre placas de diferentes medios selectivos; agar Sangre, agar Cetrimide, agar MacConkey y agar *Burkholderia Cepacia Complex*.

Se realizó la incubación de placas de agar sangre a 37 °C (5% de CO₂) usando el sistema GasPak™ anaerobic por 24 a 48 h. Las placas de agar cetrimide y agar MacConkey fueron incubadas en condiciones de aerobiosis a 37 °C por 24

a 48 h con una vigilancia de hasta 3 días adicionales en caso de ausencia de crecimiento. Las placas de agar *Bulkholderia Cepacia Complex* fueron incubadas también en condiciones de aerobiosis a 37 °C por 5 días aproximadamente.

3.6.1. Aislamiento y Purificación de cepas

Luego de observar crecimiento en los diferentes medios de cultivo, se seleccionaron cepas bacterianas de acuerdo a las características fenotípicas de las colonias más 2-4 cepas por placa recuperadas al azar. Estas fueron sembradas por método de estrías hasta lograr su aislamiento. Cada colonia seleccionada fue codificada de acuerdo al medio de cultivo, número de paciente y número de colonia encontrada por placa. Una vez que se obtuvieron colonias separadas se sembró una colonia en tubos de 1.5 ml que contenían 1 ml de caldo Tryptic Soy Broth (TSB) y se incubó a 37 °C por 24-48 h. Posteriormente se realizó la tinción de Gram de los diferentes cultivos aislados y se observó en el microscopio. La observación se hizo primero a 40X para localizar las bacterias y después a 100X con aceite de inmersión para determinar si el cultivo es puro o no en base al tipo de tinción (Gram negativo o Gram positivo) y la forma de las colonias (cocos, bacilos, cocobacilos, etc).

3.7. Extracción de ADN y secuenciación del gen ARNr 16S

El ADN fue extraído a partir de cultivos puros de cada aislado seleccionado usando el protocolo rápido de extracción de ADN bacteriano siguiendo las recomendaciones del proveedor (Concepto Azul DNA extraction kit). El ADN se amplificó mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando el kit Gold® de Taq DNA Polimerase Recombinant (Thermo Scientific), en un volumen total de 25 µl que contenía 0.6 pmol/µl de primer 27F Forward (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) y 0.6 pmol/µl de primer 1492R Reverse (GGYTACCTTGTTAGGACTT) (Frank *et al.* 2008), 1X buffer de polimerasa, 0.2 mM

de dNTPs, 2 mM de MgCl₂, 1U/μl de Taq polimerasa y 20 mg de ADN extraído. Las condiciones térmicas de amplificación fueron desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min (1 ciclo) seguido de 35 ciclos de; desnaturalización a 95 °C durante 30 s, hibridación a 58 °C durante 45 s, y extensión a 72 °C durante 1.½ min, con una etapa de extensión final a 72 °C durante 6 min, y se llevaron a cabo en un termociclador (Biometra-USA). Los productos de amplificación de aproximadamente 1500 pb de tamaño se separaron por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.5% suplementado con Bromuro de Etidio (10 mg/ml) en una cámara electroforética (Cleaver scientific-Reino Unido) y se observaron en un transiluminador (Vilber lourmat-Francia). Las muestras positivas fueron enviadas a la compañía biotecnológica MacroGen-USA, para ser secuenciadas con los primers 16SrRNAF518 (CCAGCAGCCGCGGTAATACG) y 16SrRNAR800 (TACCAGGGTATCTAATCC).

3.7.1. Análisis de Datos

Los resultados de las secuencias de nucleótidos del gen ARNr 16S se alinearon empleando el programa Mega 6 y se analizaron utilizando el BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de NCBI (National Center for Biotechnology Information).

3.8. Espectrometría de masas MALDI TOF

Para la obtención de perfiles de masas de cada bacteria, las cepas puras fueron cultivadas en medio Trypticase Soy Broth (TSB) durante 24 h a 37 °C. Después se recuperaron las células bacterianas por centrifugación a 10 000 rpm durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y se le agregó 500 μl de agua grado Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) para el lavado del pellet bacteriano, se homogenizó en un vortex durante 30 s (Vortex Mixer-USA) y se volvió a centrifugar 10 000 rpm durante 10 min, se eliminó el sobrenadante, luego

se resuspendió con 50 μ l de agua HPLC y se homogenizó para ser espotado directamente a la placa MALDI.

Para el espoteo, se dejó secar durante 20 min a temperatura ambiente 1 μ l de muestra, luego se le adicionó 1 μ l de matriz Acido Sinápico (10 mg/ml disuelta en 70% de acetonitrilo y 30% de agua grado HPLC con 0.1% de TFA (V/V), se homogenizó y se colocó 1 μ l sobre la placa MALDI de acero inoxidable, se dejó secar durante 10 min a temperatura ambiente. Cada muestra fue analizada por duplicado. Las muestras fueron analizadas en un espectrómetro de masa MALDI AB SCIEX TOF TOF™ 5800, en un rango de masas de 2 000 – 20 000 Da. La lectura se hizo en un modo operacional linear positivo, para obtener espectros de una lectura MS.

3.9. Espectrometría de masas MALDI TOF TOF

3.9.1. Extracción de proteínas bacterianas

Se realizó una extracción de las proteínas totales de las células bacterianas, usando el kit de extracción de proteínas (*Qproteome® Bacterial Protein*). Previamente el cultivo bacteriano se incubó a 24 h y se midió la densidad óptica a 600 nm con el espectrofotómetro (biophotometer model AG, Eppendorf®). Se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y el pellet bacteriano se incubó a -20 °C durante 30 min; se agregó 100 μ l de buffer de lisis (1 ml de buffer nativo, 10 μ l de lisozima, 1 μ l de benzonasa/ nucleasa), se homogenizó con un vortex durante 30 s y se sonicó durante 2 min usando un sonicador (40 KHz) (Ultrasonic Cleaner-Korea). Luego se incubó a -20 °C durante 30 min con homogenización cada cierto tiempo, se volvió a vortexear durante 30 s y se sonicó durante 5 min, finalmente se centrifugó a 16000 rpm durante 30 min, y se recuperó aproximadamente 80 μ l de sobrenadante.

3.9.2. Preparación del gel SDS-PAGE 1D

Se preparó el gel de separación al 12% con un volumen de 15 ml, para ello se utilizó 6 ml de mix acrilamida al 30%, 5 ml de agua desionizada autoclavada, 3.8 ml de Tris pH 8.8 a 1.5 M, 0.15 ml de SDS al 10%, 0.15 ml de APS (persulfato de amonio) al 10%, y 0.006 ml de TEMED. También se preparó el gel de alineamiento a un volumen final de 5 ml, se utilizó 0.83 ml de mix acrilamida al 30%, 3.40 ml de agua desionizada autoclavada, 0.63 ml de tris pH 6.8 a 1M, 0.05 ml de SDS al 10%, 0.05 ml de APS (Persulfato de amonio) al 10%, y 0.005 ml de TEMED (Laemmli 1970).

Para el tratamiento de las proteínas, se tomó 25 µl de muestra y 10 µl de buffer de carga (2X loading protein loading buffer) (TRIS pH 6.8, SDS, glicerol, azul de bromofenol, DDTdithiothreitol (DDT), agua bidestilada) en un tubo y se calentó durante 5 min a 95°C. Una vez frías las muestras se cargaron en el gel de alineamiento y se migraron durante 2½ h a 90 voltios en una cámara vertical (Cleaver scientific-Reino Unido).

Para el revelado del gel, éste se hidrató con agua destilada autoclavada durante 15 min, luego se agregó búfer de fijación (50% de Metanol, 40% de agua bidestilada y 10% de ácido acético glacial) durante 30 min, seguido a esto, se agregó búfer de coloración durante 2 a 3 h, y por último se agregó buffer de decoloración (45% de etanol, 45% agua bidestilada, 10% de ácido acético glacial) (Lomonte 2007). Después se analizaron las bandas de diferente peso molecular.

3.9.3. Digestión de proteínas

Posteriormente se cortaron las bandas de las proteínas, se agregó 50 µl de bicarbonato de amonio (100 mM)/50 µl Acetonitrilo (V/V), se vortexeó durante 30 s y se le dio agitación durante 30 min.

Seguido a esto se agregó 100 µl de Acetonitrilo, se vortexeó por 30 s, se incubó durante 15 min a temperatura ambiente (homogenizando ocasionalmente), después se eliminó el contenido, luego las piezas de gel se sumergieron en 25 µl de búfer de tripsina (10 mM de bicarbonato de amonio, 10% acetonitrilo y 13 ng/µl de tripsina), se incubó durante 120 min sobre hielo. Seguidamente se incubó a 37 °C durante 5-6 h, se centrifugó a 8000 rpm durante 30 s, el siguiente paso fue recuperar una alícuota de 1.5 µl, con 1.5 µl de matrix CHCA (10 mg/ml) para ser espoteadas. Después de esto se extrajo los péptidos agregando 50 µl de buffer de extracción (5% de ácido fórmico/Acetonitrilo (1V/2V), se incubó a 37 °C durante 15 min, se sacó una alícuota de 10 µl del sobrenadante previo vortexeo y sonicado de las muestras, se secó en una cámara de vacío (Boeco, Alemania) a una presión de 80 psi, se agregó 1.5 µl de agua grado HPLC conteniendo 0.1% de TFA, y 1.5 µl de matriz CHCA (10 mg /ml) (V/V) y se espoteó 1.5 µl a la placa MALDI por duplicado (Shevchenko *et al.* 2007).

Finalmente se llevó a cabo la lectura de las muestras usando el equipo MALDI AB SCIEX TOF TOF™ 5800. Las muestras fueron analizadas con un modo reflectron MS positivo, luego fueron interpretadas con modo MS 1 Kv positivo.

3.9.4 Análisis de datos

Los datos fueron analizados con el software protein pilot 4.0 con bases de datos específicas para cada microorganismo. Se procedió a corroborar la secuencia de aminoácidos para cada proteína usando el programa bioinformático Protein blast.

4. RESULTADOS.

En este estudio se lograron aislar 127 cepas de 21 pacientes peruanos con FQ (con un rango de edades de 3 a 14 años). El análisis de secuencias del gen ARNr 16S permitió identificar bacterias a diferentes niveles taxonómicos lo que incluyó 11 familias, 25 especies y 10 identificaciones a nivel de género. La familia *Pseudomonadaceae* presentó el mayor número de cepas (56), seguido por *Enterobacteriaceae* (21), *Staphylococcaceae* (21) y *Bacillaceae* (8). En términos de diversidad, la familia *Enterobacteriaceae* presentó 11 especies, seguida por *Bacillaceae* (6) y *Streptococcaceae* (4). A nivel de cepas las bacterias cultivables más aisladas fueron *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Pseudomona sp*, *Klepsiella oxytoca*. Otros microorganismos de la familia *Enterobacteriaceae*, *Bacillaceae*, etc se presentaron en menores cantidades (Cuadro 1). Las cepas caracterizadas hasta el nivel de especie estuvieron reconocidas con un nivel de similitud (99%-100%) con la principal base de datos mundial NCBI.

En cuanto al análisis epidemiológico, se observó que la población de pacientes peruanos esta principalmente colonizada por *P. aeruginosa* (61,9%), seguida por *Pseudomonas sp.* (47,6%), *S. aureus* (33,3%), *E. hormaechei*, *E faecalis* (14.3%) que fueron encontrados en 13, 10, 7 y 3 pacientes, respectivamente.

Entre los patógenos más asociados a la degradación pulmonar resaltan *P. aeruginosa*, *S. aureus*, y *Stenotrophomonas maltophilia*, mientras *Achromobacter xylosoxidans* es considerada una cepa patógena emergente (Parkins y Floto. 2015). Varios pacientes contaban con contaminaciones cruzadas de tipo *P. aeruginos/P. spp.* (5) o *P. aeruginosa/S. spp. /S. aureus* (3) *P. aeruginosa/S. maltophilia* (1) (datos no presentados).

Cuadro 1. Bacterias aisladas a partir de 21 muestras de esputo de pacientes peruanos con FQ.

Microorganismos	Familia	N° de aislamientos	Frecuencia de aislamientos (%)	N° de pacientes	Frecuencia de pacientes (%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	40	31.5	13	61.9
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	16	12.6	7	33.3
<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	15	11.8	10	47.6
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	4	3.1	2	9.5
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	3	2.4	2	9.5
<i>Enterobacter hormaechei</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	3	2.4	3	14.3
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	3	2.4	2	9.5
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcaceae</i>	3	2.4	3	14.3
<i>Staphylococcus sp.</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	2	1.6	2	9.5
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	2	1.6	2	9.5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	2	1.6	1	4.8
<i>Klebsiella variicola</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	2	1.6	2	9.5
<i>Enterobacter sp.</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	2	1.6	2	9.5
<i>Neisseria flavescens</i>	<i>Neisseriaceae</i>	2	1.6	2	9.5
<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillaceae</i>	2	1.6	2	9.5
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillaceae</i>	2	1.6	2	9.5
<i>Achromobacter sp.</i>	<i>Alcaligenaceae</i>	2	1.6	2	9.5
<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Streptococcaceae</i>	2	1.6	2	9.5
<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Streptococcaceae</i>	2	1.6	1	4.8
<i>Stenotrophomonas sp.</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>	2	1.6	2	9.5
<i>Streptococcus sp.</i>	<i>Streptococcaceae</i>	2	1.6	2	9.5
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillaceae</i>	1	0.8	1	4.8
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	<i>Alcaligenaceae</i>	1	0.8	1	4.8
<i>Achromobacter denitrificans</i>	<i>Alcaligenaceae</i>	1	0.8	1	4.8
<i>Klebsiella sp.</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	1	0.8	1	4.8
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	1	0.8	1	4.8
<i>Serratia sp.</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	1	0.8	1	4.8
<i>Bacillus vallismortis</i>	<i>Bacillaceae</i>	1	0.8	1	4.8
<i>Bacillus sp.</i>	<i>Bacillaceae</i>	1	0.8	1	4.8
<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillaceae</i>	1	0.8	1	4.8
<i>Pseudomonas luteola</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	1	0.8	1	4.8
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>	1	0.8	1	4.8
<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Streptococcaceae</i>	1	0.8	1	4.8
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	<i>Moraxellaceae</i>	1	0.8	1	4.8
<i>Paenibacillus sp.</i>	<i>Paenibacillaceae</i>	1	0.8	1	4.8
25 especies, 10 géneros	11 familias	127 cepas	100	21 pacientes	

Todas las especies aisladas y caracterizadas por ARNr 16S fueron analizadas por espectrometría de masas MALDI-TOF. A continuación se presentan los espectros de masas de las bacterias más representativas de los pacientes peruanos con FQ (Figura 1, 2 3,4).

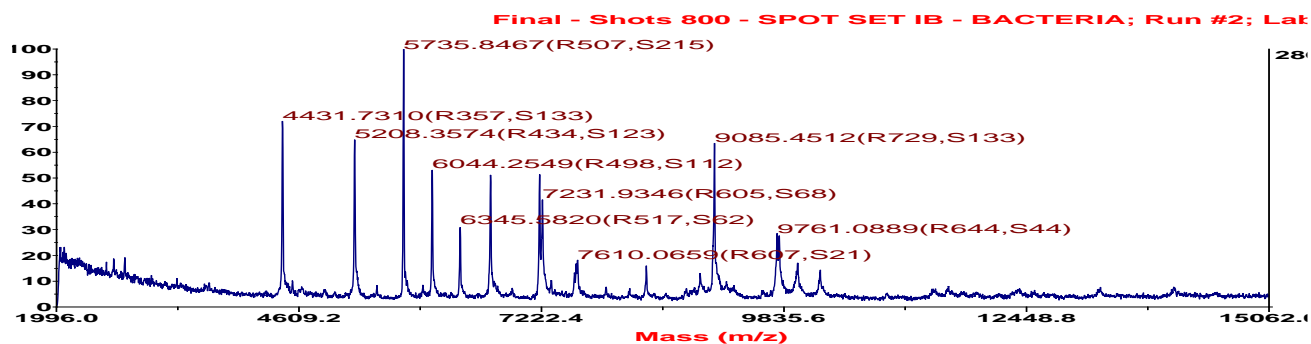


Figura 1. Espectro de masas de *Pseudomonas aeruginosa* (Cepa P1C3)

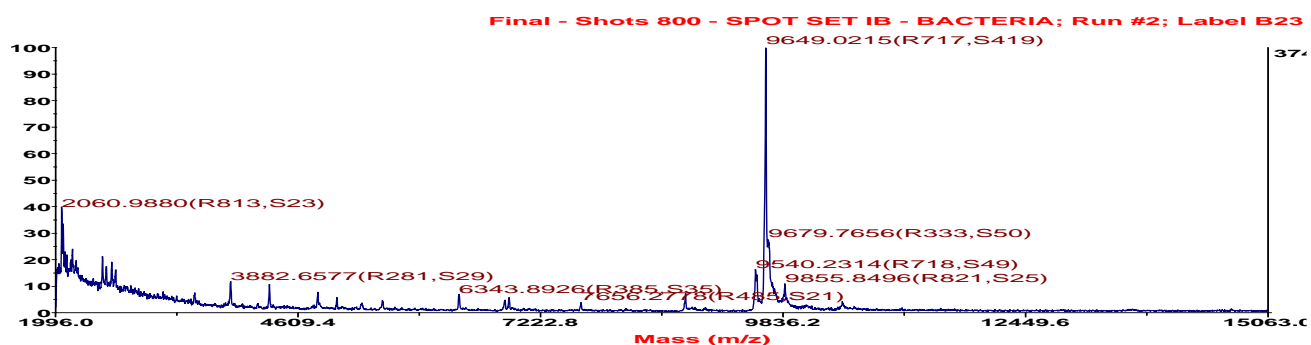


Figura 2. Espectro de masas de *Staphylococcus aureus* (Cepa P14C2-A)

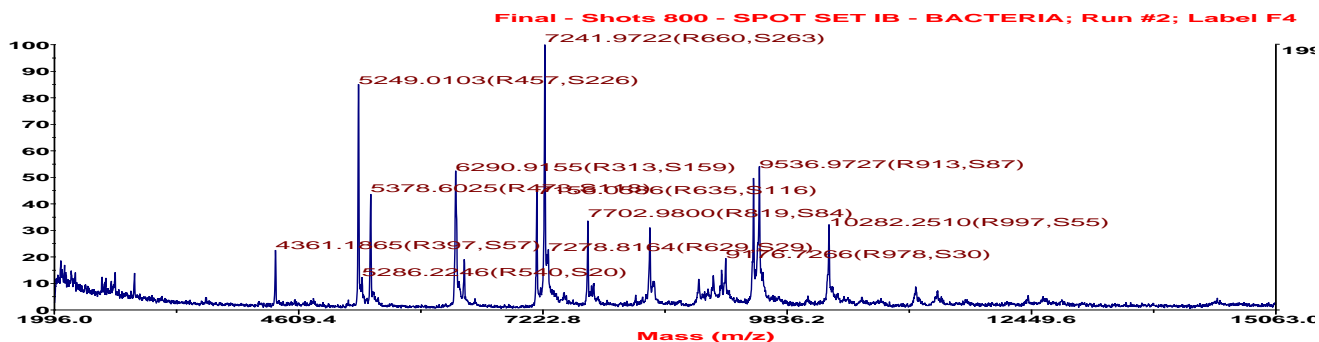


Figura 3. Espectro de masas de *Klebsiella pneumoniae* cepa P5C1-B

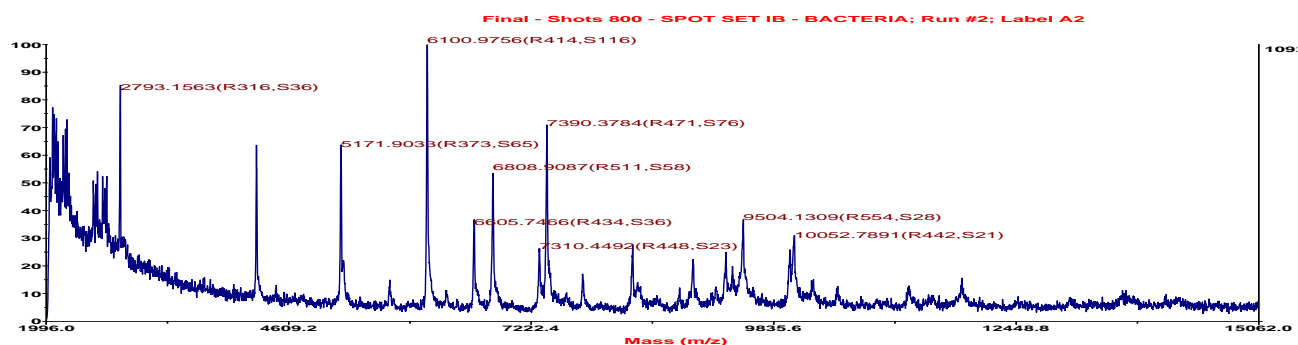


Figura 4. Espectro de masas de *Acinetobacter haemolyticus* P2C2

También se realizaron los análisis por espectrometría de masas MALDI TOF TOF y se obtuvieron diversidad de proteínas de las bacterias más representativas encontradas en este estudio (Figura 5, Cuadro 2).

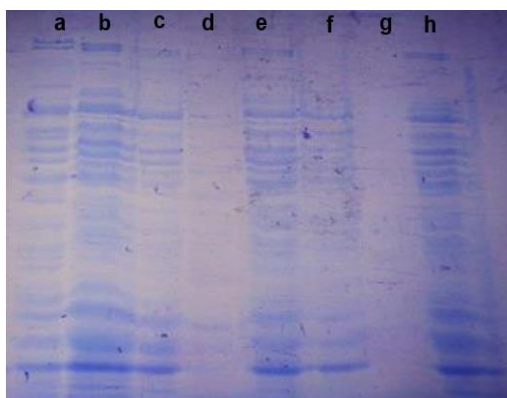


Figura 5. Proteínas migradas en SDS-PAGE 1D presentes en (a) *Leccrercia adecarboxylata*, (b) *Klebsiella pneumoniae*, (c) *Pseudomonas sp*, (d) *Enterobacter sp*, (e) *Pseudomonas aeruginosa*, (f) *Klebsiella oxytoca*, (g) *Staphylococcus aureus*, (h) *Klebsiella varicola*, aisladas de pacientes con fibrosis quística del Perú.

Cuadro 2. Secuencia de aminoácidos identificadas por MALDI TOF TOF a partir de bacterias aisladas de paciente con FQ del Perú.

Familia	Nombre de bacteria	Secuencia de aminoácidos	Nombre de proteína	Confiabilidad %	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	# Accesoión
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MVVTLIAPIAMEDGLR	elongation factor Tu	99	55.4	55.4	100%	2.00E-08	100%	CDI92771.1
		AIDQPFLMPIEDVFSISGR	hypothetical protein CR64_36475	98	65.5	65.5	100%	3.00E-11	100%	KEA39046.1
		PLLIVAEDVEGEALATLVVNNMR	60 kDa heat shock protein	98	75.3	75.3	100%	8.00E-15	100%	AGH20653.1
		ALQAIEGLKGDNEEQNVGIALLR	molecular chaperone GroEL	89	73.6	73.6	100%	4.00E-13	100%	WP_050442419.1
		ENTTIIDGAGVQADIEAR	molecular chaperone GroEL	95	58.7	58.7	100%	2.00E-08	100%	WP_050442419.1
		LVETLDSYIPEPVR	elongation factor Tu	99	48.6	48.6	100%	3.00E-05	100%	WP_058133630.1
		GITINTSHVEYDSAVR	elongation factor Tu	99	53.7	53.7	100%	8.00E-07	100%	WP_058133384.1
		DVLVNEYGVEGGR	Porina	90.4	43.9	43.9	100%	0.001	100%	WP_031640668.1
			Porina extramembrana	90.4	43.9	43.9	100%	0.001	100%	ETV25622.1
		VNAVGYGESRPVADNATAEGR	Outer membrane porin F	78.7	66.8	66.8	100%	5.00E-11	100%	ETV25622.1
	Porina		78.7	66.8	66.8	100%	5.00E-11	100%	WP_031640668.1	
	<i>Pseudomonas sp.</i>	AAVEEGVVPGGGVALVR	Chaperona molecular GroEI	99	52.4	52.4	100%	3.00E-06	100%	WP_040261855.1
		AVVGKMIDAARAREAR	DNA gyrase subunit B	99	54.9	54.9	100%	4.00E-07	100%	WP_060507770.1
		ELSKPCADFR	molecular chaperone GroEL	90	35.8	35.8	100%	0.4	100%	WP_010795293.1

Familia	Nombre de bacteria	Secuencia de aminoácidos	Nombre de proteína	Confiabilidad %	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	# Accesoión
Staphylococcaceae	<i>staphylococcus aureus</i>	VAAWYDNEMSYTAQLVR	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1	99	60.9	60.9	100%	5.00E-10	100%	KAE76271.1
		FGEEQVHIWR	phosphoglycerate mutase 1 family protein	99	38.8	38.8	100%	0.033	100%	KXA40701.1
		GNPTVEVEVLTESGAFGR	enolase	97	57.9	57.9	100%	4.00E-09	100%	EUS02549.1
	<i>staphylococcus epidermidis</i>	MFDGIEFR	Ornithine carbamolytransferasa	100	31.6	31.6	100%	7.7	100%	EES57471.1
	<i>Staphylococcus sp</i>	EKMPIEVIYGFAQLKR	class II fumarate hydratase	90	56.6	56.6	100%	9.00E-08	100%	WP_016425467.1
Enterobacteriaceae	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AIDKPFLPIEDVFSISGR	Factor de elongacion Tu	99	63.4	63.4	100%	6.00E-10	100%	WP_057172038.1
		MVVTLIHPIAMDDGLR	Factor de elongacionTu	99	56.6	56.6	100%	6.00E-09	100%	EXF38670.1
		NMITGAAQMDGAILVVAATDGPMPQTR	Factor de elongacion Tu	98.9	89.3	89.3	100%	7.00E-19	100%	KKY73578.1
		IIELAGHLDTYIPEPER	Factor de elongacion Tu	99	59.2	59.2	100%	1.00E-08	100%	WP_049198835.1
		CDMVDDEELLELVEMEV	Translation elongation factor Tu	78.1	65.1	65.1	100%	1.00E-10	100%	WP_004228632.1
			Factor de elongacion Tu	78.1	65.1	65.1	100%	1.00E-10	100%	WP_046622034.1
		AIDKPFLPIEDVFSISGR	Elongation factor Tu	99	63.4	63.4	100%	6.00E-10	100%	WP_057172038.1
		FGDAGSFDYGR	OmpK36 porin	99	38	38	100%	0.086	100%	WP_049013186.1
		YDANNIYLATQYTQTYNATR	OmpK36 porin	99	69.8	69.8	100%	5.00E-12	100%	WP_039819425.1

	Secuencia de aminoácidos	Nombre de proteína	Confiabilidad %	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	# Accesoión
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	INLLDDNSFTR	Outer membrane protein C	98.3	38.8	38.8	100%	0.042	100%	KMD16877.1
	ADSSNSIAGDNHDTGVSPVFAGGVEWAVTR	Outer membrane protein A	99	95.2	95.2	100%	3.00E-20	100%	KMI37931.1
	LGYPITDDLDIYTR	Membrane protein	99	49.8	49.8	100%	1.00E-05	100%	WP_015965053.1
	VPTPNVSVVDLTVR	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	99	46.4	46.4	100%	2.00E-04	100%	BAS35931.1
	WDEVGVDVVAEATGIFLTDETAR	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	99	76.1	76.1	100%	4.00E-14	100%	AAA25068.1
	IEEALGEQAPFNGR	Enolase	99	47.3	47.3	100%	7.00E-05	100%	KPS05582.1
	<i>Klebsiella sp</i>	YAEIADHLGLSAPGDR	Bifunctional acetaldehyde-CoA/alcohol dehydrogenase	99	52.8	52.8	100%	2.00E-06	100%
<i>Enterobacter hormaechei</i>	FDEFGSFDYGR	Porin	95,1	40.1	40.1	100%	0.017	100%	WP_058688205.1
	DGSVVVLGFTDR	Hypothetical protein	99	39.7	39.7	100%	0.026	100%	WP_058687656.1
	LGYPVTDDLDVYTR	Hypothetical protein	99	49	49	100%	2.00E-05	100%	WP_058687656.1
<i>Enterobacter cloacae</i>	LGYPVTDDLDVYTR	Outer membrane protein A	99	49	49	100%	2.00E-05	100%	AGU09686.1
	YDANNIYLAAYGEMR	Outer membrane protein F	82	57.5	57.5	100%	4.00E-08	100%	WP_023299735.1

Familia	Nombre de bacteria	Secuencia de aminoácidos	Nombre de proteínas	Confiabilidad %	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	# Accesoión
Alcaligenaceae	<i>Achromobacter sp</i>	GAYVAVAMER	Acid--CoA ligase	86,5	35.0	35.0	100%	0.77	100%	WP_043547358.1
		QMALGLVEPLPRGSIAER	TetR family transcriptional regulator	98	59.6	59.6	100%	9.00E-09	100%	WP_054416899.1
		GELPSPLDPPGGCAFHPR	Glutathione import ATP-binding protein GsiA	98	60.9	60.9	100%	4.00E-09	100%	CUJ76330.1
		VIDAEAPAVGRNGEPALLGV	chemotaxis protein	95	57.5	57.5	95%	8.00E-08	95%	WP_054456248.1
	<i>Achromobacter xyloxidans</i>	KPKALYRAMR	Adenylate cyclase	95,9	36.3	36.3	100%	0.28	100%	WP_020927698.1
		NHANVADWTWNNAGGR	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit I	85,2	57.1	57.1	100%	6.00E-08	100%	AKP88517.1
Bacillaceae	<i>Bacillus thuringiensis</i>	GNPTVEVEVYTESGAFGR	Enolase	99	59.2	59.2	100%	2.00E-08	100%	WP_060632838.1
		AMLEDIAILTGGEVITEELGR	Molecular chaperone GroEL	99	68.9	68.9	100%	1.00E-11	100%	WP_001029991.1
	<i>Bacillus pumilus</i>	VISWYDNESGYSHR	Type I glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	99	51.1	51.1	100%	5.00E-06	100%	WP_044138978.1

5. DISCUSIÓN.

Los métodos basados en técnicas de secuenciación de ADN son cada vez menos costosos y más frecuentes en el entorno clínico. La secuenciación del gen ARNr 16S sigue siendo la técnica estándar para la taxonomía bacteriana. Esta técnica es muy útil por el carácter universal del gen ARNr 16S que es lo suficientemente grande y específico para permitir diferenciar a nivel de especies por análisis de bioinformática (Janda and Abbott 2007).

Mediante la secuenciación del gen ARNr 16S se encontraron un total de 25 especies, 10 identificadas hasta el género y 11 a nivel de familia. Las especies más predominantes fueron *Pseudomonas aeruginosa* (31.5%), *Staphylococcus aureus* (12.6%), y *Pseudomonas sp* (11.8%) (Cuadro 1). Es importante notar la presencia adicional de *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans* que son también considerados patógenos importantes encontrados en este estudio. Estos resultados son los primeros obtenidos a partir de un número significativo de muestras, 21 pacientes de los 49 registrados en el país (42.8%) (Samieniego S., *com. pers.*).

La bacteria con mayor predominancia en este estudio fue *P. aeruginosa* (31.5%), habiéndosela encontrado en 13 de 21 (61.9%) de los pacientes analizados, lo que no es sorprendente por ser uno de los patógenos oportunistas más representativos reportados para esta enfermedad y que se encuentra en aproximadamente el 80% de los pacientes con FQ (Hampton *et al.* 2014). Esta bacteria es la presunta causante de la mayoría de las exacerbaciones pulmonares y, por lo tanto, el principal objetivo del tratamiento antibiótico en los pacientes con FQ (Hurley *et al.* 2012). La presencia de *P. aeruginosa* en cultivos de las vías respiratorias se ha asociado con una disminución más rápida de la función pulmonar, especialmente cuando el fenotipo mucóide está presente (Emerson *et al.* 2002). Sin embargo, Vandenbranden *et al.* (2012) encontraron que la presencia o

ausencia de *P. aeruginosa* o *P. aeruginosa* mucoide no era predictivo de la disminución de la función pulmonar, lo que indica que el deterioro de la capacidad pulmonar es probablemente multifactorial.

Otro de los patógenos más representativos de los pacientes peruanos fue *S. aureus* (12.6% de los aislados) también reportado como uno de los patógenos más virulentos y predominante en pacientes con FQ (Johnson *et al.* 2016; Sibley *et al.* 2009). Dentro de los *S. aureus*, existen varios fenotipos como los MRSA (Methicillin-resistant *S. aureus*) antiguamente conocidos como SCV (Small colony variant) que representan una amenaza para los pacientes infectados (Seifert *et al.* 1999). El factor de virulencia se asocia a menudo con la resistencia a la meticilina, otorgada por una exoproteína llamada Pantón Valentine leucocidina (PVL). Cepas de MRSA han sido asociadas con el desarrollo de infecciones pulmonares invasivas incluyendo absceso pulmonar en pacientes con FQ (Elizur *et al.* 2007) y capacidades de resistencias a un amplio espectro de diferentes antibióticos (Proctor *et al.* 2006; Besier *et al.* 2007; Smyth 2005; Davies *et al.* 2009). Los pacientes más jóvenes expuestos a antibioterapias severas con antifolatos y aminoglucósidos son más propensos a adquirir MRSA (Kahl *et al.* 1998; Massey *et al.* 2001). Sin embargo, en este estudio no pudimos observar MRSA, ni fenotípicamente ni por proteómica. En efecto, el diagnóstico de este tipo de *S. aureus* requiere de métodos dependientes de cultivo o por PCR que podrían ser aplicados a futuro (Harbarth *et al.* 2011).

Bacterias del género *Achromobacter*, tales como; *Achromobacter sp* (1.6%), *A. xylosoxidans* (0.8%), *A. denitrificans* (0.8%) (Cuadro 1) también fueron aisladas. Las especies pertenecientes a este género son microorganismos ambientales cultivados a partir de una gama de hábitats naturales y son patógenos oportunistas que muestran una mayor resistencia a un amplio espectro de antibióticos (Amoureux *et al.* 2013; Wittmann *et al.* 2014). Por otra parte, *A. xylosoxidans* es un patógeno emergente cada vez más aislado de muestras de pacientes con FQ. Su

papel e importancia clínica en la patogénesis de pulmón aún no se han aclarado (Magni *et al.* 2010).

En la FQ los pacientes están predispuestos a la infección respiratoria crónica por bacilos Gram-negativos, no fermentadores incluyendo *Stenotrophomonas maltophilia*. Esta bacteria es altamente resistente a la mayoría de los antibióticos, con la excepción de sulfametoxazol-trimetoprima (SXT). Se ha reportado la existencia de *S. maltophilia* resistentes a SXT sin poder elucidar el mecanismo de resistencia (Anderson *et al.* 2007). En este estudio se encontró *S. maltophilia* que fue aislada a partir de la muestra de esputo de un paciente con FQ.

Dentro de las principales especies patógenas se observa la ausencia de *S. pneumoniae* y *Burkholderia Cepacia Complex* que no fueron detectadas. *Haemophilus influenzae*, que es considerado problemático a fuertes concentraciones, no fue evaluado en este estudio ya que necesita medios y condiciones de crecimiento particulares (Hogart *et al.* 2009; Denton *et al.* 2010; Coman *et al.* 2012).

En conjunto nuestros resultados son parcialmente parecidos a los presentados por dos investigadores peruanos; Torres (2002), que determinó que *P. aeruginosa* estaba presente en el 81% de las muestras de esputo analizadas, seguida por *S. aureus* y *S. pneumoniae*; y Castilla (2008) que identificó que *P. aeruginosa*, *S. aureus* eran los primeros patógenos colonizadores en 35% y 25% de los casos, respectivamente. También analizó que *P. aeruginosa* estaba presente en el 72% de los casos de fallecimientos. Sin embargo, estos autores trabajaron sobre un número de muestras muy limitado y evaluando únicamente *S. aureus* y *P. aeruginosa* por métodos de cultivo. Es muy probable que en estos estudios la metodología utilizada no permitía distinguir entre *P. aeruginosa* y otras especies de *Pseudomonas* e igualmente para *S. aureus* con *Staphylococcus spp.*

En nuestro estudio varios pacientes contaban con contaminaciones cruzadas de tipo *P. aeruginosa/Pseudomonas sp.* (5) o *P. aeruginosa/Staphylococcus sp./S. aureus* (3) *P. aeruginosa/S. maltophilia* (1) (datos no presentados). La presencia de múltiples patógenos en un mismo paciente ha sido evidenciada frecuentemente debido a que todos estos patógenos son bacterias oportunistas ubicuitarias presentes en abundancia en suelos, aguas, que son comensales de la piel o de la boca, o en animales domésticos (Ramsay *et al.* 2016; Beck *et al.* 2012). Estas cepas “silvestres” se adaptan a las condiciones de los pulmones y terminan adquiriendo progresivamente resistencia a los antibióticos (Parkins *et al.* 2015; Ramsay *et al.* 2016). Es importante resaltar que probablemente una buena proporción de las cepas de *Pseudomonas sp.* sean en realidad *P. aeruginosa*, pero con mayor similitud de secuencia con cepas aisladas de muestras ambientales y registradas como *Pseudomonas sp.* (Ramsay *et al.* 2016).

Una particularidad interesante en los aislamientos realizados en pacientes con FQ en Perú y que no ha sido reportada, es la presencia de varias cepas de *Bacillus* y *Klebsiellas*. Estos géneros no son muy comunes en FQ, tampoco en la flora de pulmones sanos que son generalmente dominados por *Pseudomonas*, *Streptococcus Prevotella*, *Fusobacteria*, *Veillonella*, *Haemophilus* y *Neisseria* basados en estudios de metagenómica (Beck *et al.* 2012). Es interesante reportar que estas cepas fueron generalmente aisladas de pacientes más jóvenes que presentaban una mayor diversidad de gérmenes en sus pulmones. La pérdida de diversidad microbiana en las vías respiratorias de pacientes con FQ es característica y resulta de la eliminación no selectiva por tratamientos antibióticos y de la fuerte capacidad de desplazamiento/resistencia a antibióticos de las cepas patógenas como *P. aeruginosa*, *S. aureus* o BCC (Fodor *et al.* 2012; Rudkjøbing *et al.* 2011).

Además de considerar la edad, la microbiota puede ser fuertemente influenciada por la geografía, y es razonable suponer que las comunidades microbianas podrían diferir en función del clima, la microbiota ambiental, la

exposición a otras personas, e incluso animales domésticos (Beck *et al.* 2012). Por ejemplo, en uno de los pocos estudios de comparación geográfica, muestras de esputo de 19 pacientes con FQ atendidos en un centro del Reino Unido se compararon con muestras de 19 pacientes provenientes de un solo centro de Estados Unidos (Stressmann *et al.* 2011). Las diferencias en las especies fueron evidentes entre los dos grupos y los análisis de conglomerados mostraron diferencias geográficas significativas en la composición de la comunidad, abundancia y diversidad (Beck *et al.* 2012). En un país mega diverso como el Perú, los análisis de metagenómica podrían ser interesantes en particular para evaluar la microbiota de pacientes que viven en ambientes tan diferentes como la costa, sierra y selva.

En el presente estudio también utilizamos la tecnología de espectrometría de masas MALDI-TOF MS con el fin de obtener espectros de masas representativos de los patógenos bacterianos comunes de los pacientes peruanos, que previamente habían sido caracterizados mediante la secuenciación del gen ARNr 16S. La identificación de las cepas por secuenciación del gen ARNr 16S ha logrado proporcionar resultados confiables, que fueron positivamente comparados con los resultados obtenidos por espectrometría de masas MALDI-TOF. Este hallazgo no es sorprendente ya que además de ser de bajo costo y rápido, la identificación bacteriana por comparación de espectros de masa es también confiable y repetible (Veloo *et al.* 2012; Veloo *et al.* 2014; Hsu and Burnham 2014).

Sin embargo, varios autores reportan que la “no identificación” de algunas cepas por MALDI-TOF MS está asociada con la aún limitada disponibilidad de espectros en las bases de datos. Algunos estudios muestran que usando una base de datos comercial se mejora la identificación rutinaria de aislados de FQ (Fernández-Olmos *et al.* 2012). Estas bases de datos específicas han sido principalmente desarrolladas en los espectrómetros de masa del constructor Bruker. El equipo utilizado en este estudio no cuenta con este tipo de bases. Ello nos condujo a construir nuestra propia base de espectros de masas a partir de bacterias caracterizadas por ARNr 16S. Esta base podrá ser usada en estudios

posteriores en particular para la identificación de bacterias recuperadas de pacientes con FQ. Además, esta base requerirá ser actualizada y ampliada continuamente para enriquecerla con una gama más amplia de especies microbianas incluyendo organismos no frecuentes o raros (Fernández-Olmos *et al.* 2012).

Se obtuvo espectros de masas de todas las especies aisladas y caracterizadas molecularmente, sin embargo, se presentaron los espectros de masas de las bacterias más frecuentes de los pacientes peruanos (Figura 1, 2, 3 4). Como se puede observar los perfiles espectrales son muy diferentes y característicos entre las especies. La implementación del sistema de MALDI-TOF MS en los procesos de identificación de rutina de aislados de FQ no sólo reducirá el tiempo de análisis, sino que también proporcionará información de valor para el tratamiento antimicrobiano. Además, la correcta identificación de los microorganismos se ha destacado en las directrices de control de infecciones de pacientes con FQ como un primer paso en su manejo clínico (Saiman 2003; Kerem 2005).

La subsecuente identificación de los péptidos obtenidos frente a base de datos de los principales patógenos bacterianos, mostró altos porcentajes de confiabilidad de identificación (Cuadro 2). Algunos de los fragmentos de las proteínas obtenidas están relacionados con la patogenicidad o con las exacerbaciones producidas por bacterias de las vías respiratorias de los pacientes con FQ.

En particular, la proteína GroEL que pertenece a la familia de proteínas de choque térmico bacteriano de 60-65 kDa fue encontrada entre las proteínas extraídas de *P. aeruginosa*. Los estudios han reportado que una fuerte respuesta de anticuerpos a GroEL fue observada en pacientes con FQ con infecciones pulmonares crónicas causada por *P. aeruginosa* (Ulanova 1997). Otro péptido abundantemente encontrado pertenece a la proteína de membrana externa porina

F (OprF), que se conserva a través de aislados clínicos (Mutharia y Hancock 1983; Yoshimura *et al.* 1983). En una comparación entre las biopelículas de *P. aeruginosa* producidas en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, la OprF estuvo sobre expresada hasta 39 veces durante el crecimiento anaeróbico (Yoon *et al.* 2002). Adicionalmente, la OprF ha recibido atención como un inmunógeno que confiere protección a ratones desafiados experimentalmente para la inmunogenicidad como una vacuna anti *P. aeruginosa* en seres humanos (Krause *et al.* 2013; Westritschnig *et al.* 2014; Thomas *et al.* 2009; Baumann *et al.* 2004; Weimer 2009; Krause *et al.* 2011; Worgall *et al.* 2005). Esta proteína es abundantemente expresada en la membrana externa de *P. aeruginosa* (Azghani *et al.* 2002).

En *Pseudomonas sp.* se identificó la proteína DNA girasa subunidad B. Estudios anteriores han mostrado que el dominio de unión a ATP N-terminal de la ADN girasa subunidad B es un blanco terapéutico validado para el descubrimiento de fármacos antibacterianos. Sin embargo, la información estructural para este dominio (pGyrB) sigue limitada (Li *et al.* 2015).

Las proteínas que se encontraron en el patógeno *S. aureus* fueron glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1, phosphoglycerate mutase 1 family protein, enolase, class II fumarate hydratase. Se ha reportado que dos de estas proteínas participan en la patogénesis de la enfermedad; 1) Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), tiene una actividad glucolítica clave, es irreversiblemente oxidada bajo estrés oxidativo y es responsable del sostenimiento del patógeno dentro del huésped (Mukherjee *et al.* 2010), y 2) Enolasa es una enzima conservada evolutivamente que juega un papel central en la producción de energía a través de la glucólisis. Además, enolasa se encuentra en la superficie de *S. aureus* y participa en los procesos que conduce a la infección (Wu *et al.* 2015).

En las especies de la familia *Enterobacteraceae*, la bacteria *Klebsiella pneumoniae*, mostró las proteínas: Factor de elongación Tu, OmpK36 porin, Outer

membrane protein C, que se asocian con los factores de patogenicidad en la leucopenia que es causada por bacteriemia de *Klebsiella* (Liu *et al.* 2014). Estudios previos también han reportado otras proteínas como S-adenosilmetionina sintetasa, piruvato deshidrogenasa, glutatión sintetasa, UDP-galactosa-4- epimerasa, acetato quinasa A y factor de elongación Tu (EF-Tu). La proteína EF-Tu podría ser un factor de patogenicidad potencial de leucopenia causada por *Klebsiella pneumoniae* (Liu *et al.* 2014) y también se reporta en este estudio. Las proteínas OmpK36 porin se relacionan con la resistencia al antibiótico carbapenémico. La porina más relevante en cuanto a la resistencia a carbapenemas en *Klebsiella pneumoniae* es OmpK36 (Nikaido *et al.* 1983; Albertí *et al.* 1995; Doménech-Sanchez *et al.* 2003). Esta porina permite que el carbapenema se difunda en la célula bacteriana, por lo tanto, la falta o la disminución de la expresión de porinas conduce a la resistencia a carbapenemas. La presencia de esta porina indicaría indirectamente que esta bacteria sería sensible a carbapenemas lo que es una importante información para la elección de una terapia antibiótica adecuada.

Otras proteínas identificadas en *K. pneumoniae* fueron Outer membrane protein C, Outer membrane protein A. La proteína de membrana externa A (OmpA) es una clase de proteínas altamente conservadas en la familia *Enterobacteriaceae* y al largo de la evolución (Poolman 1996). De hecho en nuestro estudio esta proteína también se encontró en *Enterobacter cloacae*. Las bacterias Gram-negativas expresan otras proteínas de membrana externa (OMP) como OmpA y porinas (OmpC y OmpF). OmpF fue también identificada en *E. cloacae*. Dentro de las funciones atribuidas a la OmpA están el mantenimiento de la integridad estructural celular y un rol en la conjugación bacteriana en unión a bacteriófagos y en el crecimiento celular. También contribuye a la capacidad de las bacterias Gram-negativas para invadir células de mamíferos (Jeannin *et al.* 2002).

La familia de reguladores transcripcionales TetR fue identificada en *Achromobacter sp.* Los reguladores TetR están involucrados en el control transcripcional de una multitud de sistemas y vías, incluyendo resistencia a

múltiples fármacos, producción de antibióticos, patogenicidad, *quórum sensing*, estrés osmótico, formación de biopelículas, citocinesis y diversas vías catabólicas (Aramaki *et al.* 1995; Deng *et al.* 2013). Las proteínas TetR exhiben un alto grado de conservación de la secuencia en la región N-terminal de unión a ADN, y están implicadas en la regulación de mecanismos de resistencia a múltiples fármacos. (Ramos *et al.* 2005; Yu *et al.* 2010).

El análisis por MALDI TOF TOF también permitió encontrar un fragmento de adenilato ciclasa (AC) en *Achromobacter xylosoxidans*. AC es una enzima que cataliza la conversión de Adenosin trifosfato (ATP) a adenosin monofosfato cíclico (AMPc) y pirofosfato inorgánico (PPi). Es mediador de muchas actividades fisiológicas y está implicado en procesos tales como secreción de insulina, respuestas inmunológicas, también está vinculado con condiciones de enfermedades o predisposiciones particulares tales como FQ, diabetes tipo 2 y arritmias (Cooper and Tabbasum 2014).

Estudios comparativos entre *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, y *Bacillus anthracis* han mostrado que sus proteínas de la pared celular y del citosol son muy similares entre sí, resaltando que estas especies comparten un fondo genético similar (Gohar *et al.* 2005). Estos autores identificaron las proteínas citosólicas: enolasa, GroEI, PdhB entre otras. Nuestro estudio también encontró las proteínas enolasa y GroEL en *Bacillus thuringiensis* con un porcentaje de similitud del 99%.

Es importante, destacar que algunas proteínas encontradas en este estudio, no han sido previamente relacionadas a la fisiopatología de la FQ o descritas en proteomas bacterianos. Son necesarios estudios de proteómica más amplios para lograr comprender la relación que existe entre las proteínas expresadas por las bacterias y dicha enfermedad.

6. CONCLUSIONES

El 95% de los pacientes con FQ mueren por fallos respiratorios debidos a las infecciones microbianas crónicas. En Perú, de los 49 pacientes diagnosticados con FQ, solo 2 son mayores de edad. La identificación y la caracterización temprana de los patógenos que colonizan las vías respiratorias inferiores son centrales para prevenir la degradación rápida de los pulmones de los pacientes con FQ.

Este estudio colectó muestras de esputos de 21 pacientes del total del país (49), que fueron entregadas de forma voluntaria. Las muestras fueron analizadas mediante técnicas de cultivo microbiológico clásicas asociadas a técnicas de identificación moleculares por secuenciación del gen ARNr 16S, realización de perfiles proteicos por MALDI TOF y secuenciación de péptidos microbianos por MALDI TOF TOF.

Un total de 127 colonias representando 11 familias, 10 géneros y 25 especies diferentes fueron aisladas y caracterizadas molecularmente. El análisis epidemiológico de cepas patógenas reveló que los pacientes peruanos están principalmente colonizados por *P. aeruginosa* (61,9%), seguido por *Pseudomonas sp.* (47,6%), *S. aureus* (33,3%), *S. maltophilia* (4,8%) *A. xylooxidans* (4.8%). De los 21 pacientes 9 contaban con al menos 2 patógenos importantes a la vez.

Se logró obtener el perfil proteómico de cada cepa aislada. La asociación de las secuencias del ARNr 16S y de los espectros de masas permitió elaborar la primera base de datos del país a partir de cepas nativas, abriendo el camino al diagnóstico clínico por análisis MALDI TOF.

La obtención y comparación de las secuencias peptídicas de las principales cepas patógenas con bases de datos de proteínas concordaron con las

identificaciones realizadas por ARNr 16S. Es la primera vez que se utiliza el MALDI TOF TOF como herramienta de identificación en diagnóstico de patógenos asociados a la FQ.

Las tecnologías desarrolladas han mejorado la capacidad de diagnóstico del país mientras que los resultados obtenidos correspondieron al primer estudio epidemiológico representativo de la microbiota cultivable presente en las vías aéreas de pacientes con FQ en el Perú.

7. RECOMENDACIONES

Se recomienda completar este estudio con la adición de medios de cultivos o técnicas moleculares que permitirían la detección de *Haemophilus influenzae* y del MRSA por ser dos patógenos asociados al deterioro de las funciones respiratorias cuando alcanzan concentraciones altas. Igualmente, este estudio no evaluó la presencia de hongos patógenos como *Aspergillus spp.*, *Candida spp.* o virus respiratorios que están también relacionados a exacerbaciones y hospitalizaciones.

Sería importante realizar antibiogramas y diagnosticar por PCR la presencia de los principales factores de virulencia de cada cepa. Ello permitiría afinar la caracterización molecular y mejorar nuestro banco de datos de cepas nativas, en particular si estas diferencias generan variaciones detectables en los perfiles de masa y de doble masa.

Por otra parte, se debe considerar la utilización de tecnologías de metagenómica para poder evaluar la diversidad microbiana completa presente en los pulmones de pacientes. Un estudio interesante sería comparar la microbiota de pacientes de edades similares que viven en los principales ecosistemas del país (Selva, Sierra y Costa, Norte y Sur) entre sí y con individuos sanos para evidenciar particularidades en el infectoma (microbiota infecciosa).

También sería interesante comparar las muestras de esputos de los mismos pacientes en diferentes etapas de sintomatología de las infecciones respiratorias para evaluar la evolución de la colonización de bacterias patógenas.

Un próximo nivel de análisis sería relacionar las mutaciones de los pacientes con la flora microbiana ya que otros estudios mostraron un efecto significativo del genotipo del paciente sobre el fenotipo patogénico. Este análisis sería particularmente interesante puesto que estudios anteriores de nuestro equipo evidenciaron genotipos muy raros o únicos a nivel mundial en varios pacientes con FQ de Perú.

Una recomendación adicional consistiría en mejorar la capacidad de análisis del equipo MALDI TOF TOF mediante la adquisición de un software comercial capaz de optimizar el análisis de nuestros bancos de datos y de relacionar/integrar bases de datos de otros constructores. De esta manera la capacidad de análisis sería fuertemente mejorada, en particular para las cepas raras o no encontradas en nuestro estudio.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AbdulWahab A, Taj-Aldeen SJ, Ibrahim EB, Talaq E, Abu-Madi M, Fotedar R. 2015. Discrepancy in MALDI-TOF MS identification of uncommon Gram-negative bacteria from lower respiratory secretions in patients with cystic fibrosis. *Infect Drug Resist.* 8:83-8.

Albertí S, Rodríguez F, Schirmer T, Rummel G, Tomás J, Rosenbusch J, Benedí V. 1995. A porin from *Klebsiella pneumoniae*: sequence homology, three-dimensional model, and complement binding. *Infect Immun.* 63(3):903-10.

Alby K, Gilligan P, Miller M. 2013. Comparison of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry Platforms for the Identification of Gram-Negative Rods from Patients with Cystic Fibrosis. *J Clin Microbiol.* 51(11):3852-3854.

Amoureux L, Bador J, Fardeheb S, Mabilie C, Couchot C, Massip C, Salignon AL, Berlie G, Varin V, Neuwirth C. 2013. Detection of *Achromobacter xylosoxidans* in hospital, domestic, and outdoor environmental samples and comparison with human clinical isolates. *Appl Environ Microbiol.* 79 (23):7142-7149.

Anderson S, Stapp J, Burns J, Qin X. 2007. Characterization of Small-Colony-Variant *Stenotrophomonas maltophilia* Isolated from the Sputum Specimens of Five Patients. *J Clin Microbiol.* 45(2):529-35.

Aramaki, H., Yagi, N. and Suzuki, M. 1995. Residues important for the function of a multihelical DNA binding domain in the new transcription factor family of Cam and Tet repressors. *Protein Eng.* 8. 1259–1266.

Armougom F, Bittar F, Stremler N, Rolain JM, Robert C, Dubus JC, Sarles J, Raoult D, La Scola B. 2009. Microbial diversity in the sputum of a cystic fibrosis patient studied with 16S rDNA pyrosequencing. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 28(9):1151-4.

Azghani A, Idell S, Bains M, Hancock R. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F is an adhesin in bacterial binding to lung epithelial cells in culture. *Microb Pathog.* 33:109–114.

Balch W.E., Yates J.R., 2011. Application of mass spectrometry to study proteomics and interactomics in cystic fibrosis. *Methods Mol. Biol.* Vol.742: 227-47.

Bartlett & Stirling (2003) A Short History of the Polymerase Chain Reaction. In: *Methods Mol Biol.* 226:3-6

Baumann U, Mansouri E, von Specht BU. 2004. Recombinant OprF-OprI as a vaccine against *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Vaccine.* 22:840–847.

Beck J, Youngc V, Huffnagleb G. 2012. The Microbiome of the Lung. *Translational Research.*160 (4): 258–266.

Besier S, Smaczny C, von Mallinckrodt C, Krahl A, Ackermann H, Brade V, Wichelhaus. 2007. Prevalence and clinical significance of *Staphylococcus aureus* small colony variants in cystic fibrosis lung disease. *J. Clin Microbiol.* 168:172-45.

Bosshard P, Zbinden R, Abels S, Böddinghaus B, Altwegg M, Böttger E. 2006. 16S rRNA gene sequencing versus the API 20 NE system and the VITEK 2 ID-GNB card for identification of nonfermenting Gram-negative bacteria in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 44(4):1359–1366.

Bruce A; Johnson, A; Lewis, J; Raff, M; Roberts, K; Peter, W (2002) .Molecular Biology of the Cell. *New York: Garland Science.* ISBN 978-0-8153-3218-3.

Castilla G. 2008. Epidemiología de infecciones respiratorias en pacientes con Fibrosis Quística en el Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins. *Rev. Perú. pediatr.* 61(2).

Champion M. 2012. Direct Detection of Bacterial Protein Secretion Using Whole Colony Proteomics. *Mol.Cell.Proteomics.* 11(9):596-604.

Chmiel J, Davis P. 2003. State of the art: Why do the lungs of patients with cystic fibrosis become infected and why can't they clear the infection. *Respir Res.* 4:8.

Coman G, Petraru E, Dahorea C, Anton D. 2012. Current microbiological data on lower respiratory tract infection in cystic fibrosis. Part II: recommendations for microbiological diagnosis in cystic fibrosis. *Rev Med.Chir.Soc.Med.Nat.Iasi.* 116(3):898-901.

Cooper D, Tabbasum V. 2014. Adenylate cyclase-centred microdomains. Department of Pharmacology, *University of Cambridge.*:462. 199–213.

Davies J, Bilton D. Bugs. 2009. biofilms, and resistance in cystic fibrosis. *Respir Care*. 628:640-54.

Degand N, Carbonnelle E, Dauphin B, Beretti J, Le Bourgeois M, Sermet-Gaudelus I, Segonds C, Berche P, Nassif X, Ferroni A. 2008. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Nonfermenting Gram-Negative Bacilli Isolated from Cystic Fibrosis Patients. *J Clin Microbiol*. 46(10):3361-3367.

Deng W, Li C, Xie J. 2013. The underlying mechanism of bacterial TetR/ AcrR family transcriptional repressors. *Cell Signal*. 25. 1608–1613.

Denton M, Doherty C, Foweraker J, Govan J, Hall M, Isalska B. 2010. Laboratory standards for processing microbiological samples from people with cystic fibrosis. [http://www.cftrust.org.uk/aboutcf/publications/consensusdoc/CD_Laboratory_Standards_\(for_web\)_4_Oct_2010.pdf](http://www.cftrust.org.uk/aboutcf/publications/consensusdoc/CD_Laboratory_Standards_(for_web)_4_Oct_2010.pdf).

Desai A, Stanley T, Atuan M, McKey J, Lipuma, J, Rogers B, Jerris R. 2012. Use of matrix assisted laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry in a paediatric clinical laboratory for identification of bacteria commonly isolated from cystic fibrosis patients. *J. Clin. Pathol*. 65(9):835-838

Doménech A, Martínez L, Hernández S, del Carmen M, Pascual A, Tomás J, Albertí S, Benedí V. 2013. Role of *Klebsiella pneumoniae* OmpK35 porin in antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 47(10):3332-5.

Duchesneau P, Wong A, Waddell T. 2010. Optimization of Targeted Cell Replacement Therapy: A New Approach for Lung Disease. *Mol Ther.* 18(10): 1830–1836.

Elizur A, Orscheln R, Ferkol T, Atkinson J, Dunne W, Buller R, Armstrong J, Mardis E, Storch G, Cannon C. 2007. Panton-Valentine Leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lung infection in patients with cystic fibrosis. *Chest.* 131(6):1718-25.

Emerson J, Rosenfeld M, McNamara S, Ramsey B, Gibson R. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.*34 (2):91-100.

Fernández A, Garclá M, Morosini M, Lamas A, Máiz L, R Cantón. 2012. MALDI-TOF MS improves routine identification of non-fermenting Gram negative isolates from cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros.* 59:62-11.

Ferrer S. 2011. El verdadero sentido de la vida. *Journal of Feelsynapsis (JoF)*. ISSN2254-3651. (1): 119-127.

Ferroni A, Sermet-Gaudelus I, Abachin E, Quesne G, Lenoir G, Berche P, Gaillard J. 2002. Use of 16S rRNA gene sequencing for identification of nonfermenting gram-negative bacilli recovered from patients attending a single cystic fibrosis center. *J Clin Microbiol.* 40(10):3793–3797.

Fodor A, Klem E, Gilpin D, Elborn J, Boucher R, Tunney M, Wolfgang M. 2012. The adult cystic fibrosis airway microbiota is stable over time and infection type, and highly resilient to antibiotic treatment of exacerbations. *PLoS One.* 7(9):e45001.

Frank JA, Reich CI, Sharma S, Weisbaum JS, Wilson BA, Olsen GJ 2008. Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Microbiology*. 2461–2470.

García I. 2009. Fibrosis quística. *Revista de Pediatría Electronica*.

Gohar M, Gilois N, Graveline R, Garreau C, Sanchis S, Lereclus D. 2005. A comparative study of *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus anthracis* extracellular proteomes. *Proteomics*. 5. 3696–3711

Gomes P, Penque D. 2010. Proteomics uncovering posible key players in F508del-CFTR processing and trafficking. *Expert.Rev.Proteomics*. 7(4): 487-494.

Hampton T, Green D, Cutting G, Morrison H, Sogin M, Gifford A, Stanton B, O'Toole G. 2014. The microbiome in pediatric cystic fibrosis patients: the role of shared environment suggests a window of intervention. *Microbioma*. 2049:2618-2.

Harbarth S, Hawkey P, Tenover F, Stefani S, Pantosti A, Struelens M. 2011. Update on screening and clinical diagnosis of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Int J Antimicrob Agents*. 37(2):110-117.

Hoffman L.R., Ramsey B.W., 2013. Cystic fibrosis therapeutics: the road ahead. *Chest*. Vol.1. No.143(1):207-13.

Hogardt M, Ulrich J, Riehn H, Tummler B. 2009. EuroCareCF quality assessment of diagnostic microbiology of cystic fibrosis isolates. *J Clin Microbiol.* 47:3435–8.

Homem H, Dalla-Costa L, Vicenzi V, Camargo D, Riedi C, Rosario N, Pilonetto M. 2014. MALDI-TOF: A useful tool for laboratory identification of uncommon glucose non-fermenting Gram-negative bacteria associated with cystic fibrosis. *J Med Microbiol.* 63:1148-1153.

Hurley M, Ariff A, Bertenshaw C, Bhatt J, Smyth A. 2012. Results of antibiotic susceptibility testing do not influence clinical outcome in children with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 11:288–292.

Hsu Y, Burnham C. 2014. MALDI-TOF MS identification of anaerobic bacteria: assessment of pre-analytical variables and specimen preparation techniques, *Diag. Microbiol Infect Dis.* 79 144-148.

Janda J, Abbott S. 2007. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *J Clin Microbiol.* 45(9):2761-2764.

Jeannin P, Magistrelli G, Goetsch L, Haeuw J, Thieblemont N, Bonnefoy J, Delneste Y. 2002. Outer membrane protein A (OmpA): a new pathogen-associated molecular pattern that interacts with antigen presenting cells-impact on vaccine strategies. *Vaccine.* 20:A23-A27.

Johnson E, Zemanick E, Accurso F, Wagner B, Robertson C, Harris J. 2016. Molecular Identification of *Staphylococcus aureus* in Airway Samples from Children with Cystic Fibrosis. *PLoS One.* 11(1):1-12.

Kahl B, Herrmann M, Everding A, Koch H, Becker K, Harms E, Proctor R, Peters G. 1998. Persistent infection with small colony variant strains of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis.* 177(4):1023-1029.

Keravec M, Mounier J, Prestat E, Vallet S, Jansson JK, Burgaud G, Rosec S, Gouriou S, Rault G, Coton E, Barbier G, Héry-Arnaud G. 2015. Insights into the respiratory tract microbiota of patients with cystic fibrosis during early *Pseudomonas aeruginosa* colonization. *Springerplus.*4:405.

Kerem E, Conway S, Elborn S, Heijerman H. 2005. Standards of care for patients with cystic fibrosis: a European consensus. *J Cyst Fibros.* 4:7–26.

Khot P, Couturier M, Wilson A, Croft A, Fisher M. 2012. Optimization of MALDI-TOF Mass Spectrometry Analysis for Bacterial Identification. *J.Clin.Microbiol.* Vol. In Press.

Krause A, Whu W, Qiu J, Wafadari D, Hackett N, Sharma A, Crystal R, Worgall S. 2013. RGD capsid modification enhances mucosal protective immunity of a non-human primate adenovirus vector expressing *Pseudomonas aeruginosa* OprF. *Clin Exp Immunol.* 173:230–241.

Krause A, Whu WZ, Xu Y, Joh J, Crystal RG, Worgall S. 2011. Protective anti-*Pseudomonas aeruginosa* humoral and cellular mucosal immunity by AdC7-mediated expression of the *P. aeruginosa* protein OprF. *Vaccine.* 29:2131–2139.

Laemmli U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259): 680-685.

Lane, D. J., B. Pace, G. J. Olsen, D. A. Stahl, M. L. Sogin, and N. R. Pace. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*82:6955-6959.

Lay J. MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. 2012. *Mass Spectrom Rev*. 172:194.

Li Y, Xuan Y, Ying Z, Wong Y, Yueqi M, Qi Y, Liu B, Hung A, Cherian J, Hill J, Keller T, Kang C. 2015. NMR structural characterization of the N-terminal active domain of the gyrase B subunit from *Pseudomonas aeruginosa* and its complex with an Inhibitor. *FEBS Lett*. 2683-9.

Liu H, Cheng Z, Song W, Wu W, Zhou Z. 2014. Immunoproteomic to analysis the pathogenicity factors in leukopenia caused by *Klebsiella pneumonia* bacteremia. *PLoS One*. 16-9(10):e110011.

Lomonte B. Manual de Metodos Inmunologicos. 2007. 138pp. Universidad de Costa Rica. Acceso libre en: <http://www.icp.ucr.ac.cr/~blomonte/>.

Lynch SV, Bruce KD. 2013. The cystic fibrosis airway microbiome. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 3(3):a009738.

Magni A, Trancassini M, Varesi P, Iebba V, Curci A, Pecoraro C, Cimino G, Schippa S, Quattrucci S. 2010. *Achromobacter xylosoxidans* Genomic Characterization and

Correlation of Randomly Amplified Polymorphic DNA Profiles of Cystic Fibrosis Patients. *Journal of clinical microbiology*. 48: 1035–103.

Marko D, Saffert C, Cunningham R, Hyman S, Walsh J, Arbefeville J, Howard S, Pruessner W, Safwat J. 2012. Evaluation of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems for identification of nonfermenting Gram-negative bacilli isolated from cultures from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*. 2034:2039-50.

Massey R, Buckling A, Peacock S. 2001. Phenotypic switching of antibiotic resistance circumvents permanent costs in *Staphylococcus aureus*. *Curr Biol*. 11(22):1810-1814.

Nikaido H, Y Rosenberg, and J Foulds. Porin channels in *Escherichia coli*: studies with beta-lactams in intact cells. 1983. *J Bacteriol*. 153(1): 232-240.

Nixon GM, Armstrong DS, Carzino R, Carlin JB, Olinsky A, Robertson CF, Grimwood K. 2001 . Clinical outcome after early *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *J Pediatr*. 138(5):699-704.

Mukherjee S, Dutta D, Saha B, Das A. 2010. Crystal Structure of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase 1 from Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* MRSA252 Provides Novel Insights into Substrate Binding and Catalytic Mechanism. *J Mol Biol*. 401(5):949-68.

Mutharia L, Hancock R. 1983. Surface localization of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin protein F by using monoclonal antibodies. *Infect Immun*. 42:1027–1033.

Paganin P, Fiscarelli E, Tuccio V, Chiancianesi M, Bacci G, Morelli P, Dolce D, Dalmastrì C, De Alessandri A, Lucidi V, Taccetti G, Mengoni A, Bevivino A. 2015. Changes in Cystic Fibrosis Airway Microbial Community Associated with a Severe Decline in Lung Function. *PLoS ONE*. 10(4):e0124348.

Parkins M, Floto R. 2015. Emerging bacterial pathogens and changing concepts of bacterial pathogenesis in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 14 (3):293-304.

Penque D. 2007. Proteomic biomarker discovery for the monogenic disease cystic fibrosis. *Expert.Rev.Proteomics*. 4(2):199-209.

Perez L, Machado A, Barth A. 2013. The Presence of Quorum-Sensing Genes in Pseudomonas isolates Infecting Cystic Fibrosis and Non-cystic Fibrosis Patients. *Curr.Microbiol*. In Press.

Poolman J. 1996. Bacterial outer membrane protein vaccines. In Novel Strategies in design and production of vaccines, Cohen S, Shafferman A, editors. *Plenum Press*. 73–77.

Prickett M, Jain M. 2013. Gene therapy in cystic fibrosis. *Transl. Res*. In Press.

Proctor R, Von Eiff C, Kahl A, Becker K, Mcnamara P, Herrmann M, Peters G. 2006. Small colony variants: a pathogenic form bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat. rev. Microbiol*. 295:305-4.

Ramirez IA, Caverly LJ, Kalikin LM, Goldsmith AM, Lewis TC, Burke DT, LiPuma JJ, Sajjan US, Hershenson MB. . 2014. Differential responses to rhinovirus- and influenza-associated pulmonary exacerbations in patients with cystic fibrosis. *Ann Am Thorac Soc.* 11(4):554-61.

Ramos J, Martínez M, Molina A, Terán W, Watanabe K, Zhang X, Gallegos M, Brennan R, Tobes R. 2005. The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69. 326–356.

Ramsay K, Stockwell R, Bell S, Kidd T. 2016. Infection in cystic fibrosis: impact of the environment and climate. *Expert Review of Respiratory Medicine.* 1747-6348.

Rodrigues E, Ferreira A, Leão R, Leite C, Carvalho-Assef A, Albano R, Marques E. 2015. Characterization of *Achromobacter* Species in Cystic Fibrosis Patients: Comparison of bla(OXA-114) PCR Amplification, Multilocus Sequence Typing, and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol.* 53(12):3894-3906.

Rudkjøbing V, Thomsen T, Alhede M, Kragh K, Nielsen P, Johansen U, Givskov M, Høiby N, Bjarnsholt T. 2011. True microbiota involved in chronic lung infection of cystic fibrosis patients found by culturing and 16S rRNA gene analysis. *J Clin Microbiol.* 49(12):4352-5.

Saiman L, Siegel J. 2003. Infection control recommendations for patients with cystic fibrosis: microbiology, important pathogens, and infection control practices to prevent patient- to- patient transmission. Cystic Fibrosis Consensus. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 24:S6–S52.

Sandrin T, Goldstein J, Schumaker S. 2013. MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: a review. *Mass Spectrom Rev.* 32(3): 188–217.

Seifert H, von Eiff C, Fätkenheuer G. 1999. Fatal case due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* small colony variants in an AIDS patient. *Emerg Infect Dis.* 5(3): 450-453

Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, V Olsen J, Mann M. 2006. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature protocols.* 1(6):2856-60.

Sibley C, Parkins M, Rabin H, Surette M. 2009. The relevance of the polymicrobial nature of airway infection in the acute and chronic management of patients with cystic fibrosis. *Curr Opin Investig Drugs.* 10:787–794.

Slabbinck B, Waegeman W, Dawyndt P, De Vos P, De Baets B. 2010. From learning taxonomies to phylogenetic learning: Integration of 16S rRNA gene data into FAME-based bacterial classification. *BMC Bioinformatics.* 11: 69.

Smyth A. 2005. Multiresistant pulmonary infection in cystic fibrosis - prevention is better than cure. *Lancet.* 433:435-336.

Steensels D, Verhaegen J, Lagrou K. 2011. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of bacteria and yeasts in a clinical microbiological laboratory: a review. *Acta Clin. Belg.* 66(4): 267-273

Stressmann F, Rogers G, Klem E, Lilley A, Donaldson S, Daniels T. 2011. Analysis of the bacterial communities present in lungs of patients with cystic fibrosis from American and British centers. *J Clin Microbiol.* 49:281–291.

Thomas LD, Cripps AW, Kyd JM. 2009. Immune response mechanisms against *Pseudomonas aeruginosa* associated with mucosal immunization with protein antigens in a rat model of acute lung infection. *Vaccine.* 27:3324–3330.

Torres D. 2002. Estudio clínico epidemiológico de la fibrosis quística en el instituto de salud del niño, Lima 1991 – 2001. *Pediátrica.* 4(3):7-15.

Tsui L. 1995. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Am J Respir Crit Care Med.* 151(3 Pt 2):S47-53

Ulanova M, Petersen T, Ciofu O, Jensen P, Hahn-Zoric M, Hanson L, Høiby N. 1997. The clonal antibody response to *Pseudomonas aeruginosa* heat shock protein is highly diverse in cystic fibrosis patients. *APMIS.* 105(6):449-56.

Vandenbranden S, McMullen A, Schechter M, Pasta D, Michaelis R, Konstan M, Wagener J, Morgan W, McColley S. 2012. Lung function decline from adolescence to young adulthood in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 47(2):135-143.

Veloo A, Elgersma P, Friedrich A, Nagy E, van Winkelhoff A. 2014. The influence of incubation time, sample preparation and exposure to oxygen on the quality of the MALDI-TOF MS spectrum of anaerobic bacteria, *Clin Microbiol Infect.* 20:1091-1097.

Veloo A, Welling G, Degener J. 2011. The identification of anaerobic bacteria using MALDI-TOF MS. *Anaerobe* 17:211-212.

Weimer ET, Ervin SE, Wozniak DJ, Mizel SB. 2009. Immunization of Young African green monkeys with OprF epitope 8-OprI-type A- and B-flagellin fusion proteins promotes the production of protective antibodies against nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Vaccine* 27:6762–6769.

Welker M, Moore E. 2011. Applications of whole-cell matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. *Syst. Appl. Microbiol.* 34(1):2-11.

Westritschnig K, Hochreiter R, Wallner G, Firbas C, Schwameis M, Jilma B. 2014. A randomized, placebo-controlled phase I study assessing the safety and immunogenicity of a *Pseudomonas aeruginosa* hybrid outer membrane protein OprF/I vaccine (IC43) in healthy volunteers. *Hum Vaccin Immunother.* 10:170–183.

Wieser A, Schneider L, Jung J, Schubert S. 2012. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93(3):965-74.

Wittmann J, Dreiseikelmann B, Rohde C, Rohde M, Sikorski J. 2014. Isolation and characterization of numerous novel phages targeting diverse strains of the ubiquitous and opportunistic pathogen *Achromobacter xylosoxidans*. *PLoS One.* 9 (1):e86935.

Worgall S, Krause A, Rivara M, Hee K, Vintayen E, Hackett N, Roelvink P, Bruder J, Wickham T, Kovesdi I. 2005. Protection against *P. aeruginosa* with an adenovirus vector containing an OprF epitope in the capsid. *J Clin Invest*. 115:1281–1289.

Wu Y, Wang C, Lin S, Wu M, Han L, Tian C, Zhang X, Zang J. 2015. Octameric structure of *Staphylococcus aureus* enolase in complex with phosphoenolpyruvate. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 1-71(12):2457-70.

Yoon S, Hennigan R, Hilliard G, Ochsner U, Parvatiyar K, Kamani M, Allen H, DeKievit T, Gardner P, Schwab U, Rowe J, Iglewski B, McDermott T, Mason R, Wozniak D, Hancock R, Parsek M, Noah T, Boucher R, Hassett D. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis. *Dev Cell*. 3:593–603.

Yoshimura F, Zalman L, Nikaido H. 1983. Purification and properties of *Pseudomonas aeruginosa* porin. *J Biol Chem*. 258:2308–2314.

Yu Z, Reicheld S, Savchenko A, Parkinson J, Davidson A. 2010. A comprehensive analysis of structural and sequence conservation in the TetR family transcriptional regulators. *J. Mol. Biol.*:400. 847–864.

9. ANEXOS.

ANEXO 1. Resumen publicado a partir de una ponencia realizada en el congreso europeo de fibrosis quística de Bruselas (Junio 2015).

Cystic Fibrosis

The Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society


Articles and Issues ▾ Collections ▾ For Authors ▾ Journal Info ▾ Society Info ▾ Resource Center ▾


All Content ▾ [Advanced Search](#)

< Previous Article **June 2015** Volume 14, Supplement 1, Page S43 Next Article >

ePSO1.5 Update of CFTR mutation spectrum in cystic fibrosis patients from Peru

[M.-P. Audrézet](#), [B. Diringer](#), [K. Le Millier](#), [M.N. Kervennic](#), [R. Aquino Ordinola](#), [N. Purizaga Izquierdo](#), [C. Férec](#)

 0

DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1569-1993\(15\)30135-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1569-1993(15)30135-1) 

Abstract

Objectives

Reliable data on the spectrum of CFTR gene mutations in populations where the disease is unknown, are difficult to obtain. The aim of this study was to analyze the *CFTR* gene in cystic fibrosis patients, affected by CF and referred to CF Centers of Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins and Instituto Nacional de Salud del Niño (INSN) of Tumbes (Peru).

Methods

32 patients were included in the study. DNA samples were first tested for the 30 frequent mutations covered by the Elucigene CF30 kit (GeneProbe Diagnostics), followed by comprehensive CFTR coding sequence analysis by Next Generation sequencing on a PGM (Ion Torrent) using an Ampliseq CFTR optimized panel (Life Technologies).

Results

As expected, the frequency of the p.F508del mutation is low, representing only 26.5% of the CF alleles. Among the other 15 identified mutations, only 6 [p.G542X (7.5%), c.3140–26A>G (4.5%), c.2657+5G>A (3%), p.I507del (1.5%), p.R334W (1.5%), and p.R1162X (1.5%)] are part of the Elucigene kit and represent 12.3% of alleles. Interestingly, after the second mutation p.G542X, which represent 7.5% of alleles, three rare or novel mutations, c.739_742dup in exon 6 (4.7%), p.P499L in exon 11 (4.7%) and p.L571S in exon 13 (3.1%) were frequent in this population. Finally, nearly 70% of the alleles were characterized.

Conclusion

These preliminary results, obtained on a small population of CF patient from Peru provide important data on the CFTR gene mutation spectrum in this population and are important for diagnosis and genetic counseling.

ANEXO 2. Abstract del manuscrito obtenido a partir de esta tesis que será publicado en la revista indizada “Journal of Cystic Fibrosis”.

Molecular characterization of pathogenic bacteria present in the airways of cystic fibrosis patients of Peru by sequencing of 16S rRNA gene and MALDI TOF mass spectrometry and MALDI TOF / TOF.

Ruth Aquino-Ordinola^{1,2}, Emely Gonzales-Gomez^{1,2}, Ingrid Meza-Guzmán², S. Samaniego³, I. Urbina¹, B. Diringer²

- 1. Laboratory of Molecular Biology, Faculty of Human Medicine, National University of Tumbes, Tumbes, Peru**
- 2. Company Research and Training in Biotechnology -Inca'Biotec S.A.C, Tumbes, Peru**
- 3. Association of Parents of Children with Cystic Fibrosis (FIQUI Peru), Lima, Peru.**

Corresponding author. Programa de postgrado-Maestria en Biotecnología molecular, National University of Tumbes Av. Universitaria S / N Pampa Grande, Tumbes-Peru. Tel. : + 51-73-948359340. Email: ruthaquinord@gmail.com.

ABSTRACT

Background: In patients suffering from cystic fibrosis (CF) morbidity and mortality are mainly associated with chronic lower respiratory tract infections caused by opportunistic pathogens.

Methods: cultivable bacterial communities were characterized from sputum samples from 21 pediatric Peruvian patients with CF registered in the National Hospital Edgardo Rebagliati Martins (ESSALUD) and the National Institute of Child Health (INSN). Bacteria were grown and isolated by techniques standard microbiological culture, whereas the characterization of inbred strains was performed by 16S rRNA gene sequencing and analysis by MALDI TOF mass spectrometry and MALDI TOF / TOF.

Results: We successfully isolated 127 strains which were differentiated in 35 species by 16S rRNA gene sequencing. The predominant pathogens were *Pseudomonas aeruginosa* (31.5%), *Staphylococcus aureus* (12.6%), *klebsiela oxytoca* (3.1%) and other uncommon species as *Acrhomobacter xylosoxidans* (0.8%) and *Paenibacillus sp.* (0.8%). Analysis by MALDI TOF mass spectrometry allowed to obtain spectra representative of each isolated species of Peruvian patients also were recovered and characterized protein sequence of the most common species by MALDI TOF TOF

Conclusions: Our data show that microorganisms colonizing the lower airways of CF patients are part of a complex microbial ecosystem. The characterization of these microorganisms is an important step in understanding the progression of the disease. With the results obtained by analysis of 16S rRNA and MALDI TOF achieve, on one hand, to obtain specific spectra bacteria Peruvian patients used to build a database of native pathogenic strains for future studies and on the other side, identified by MALDI TOF technique / TOF a wide variety of proteins that allow us to establish the relationship between bacterial pathogenicity proteome. Finally know the bacterial diversity would lead to improvements in antibiotic treatment and increased life expectancy of CF patients Peruvians.

Key words: *Cystic fibrosis; bacterial 16S rRNA, Maldi tof, Maldi Tof / Tof, Peru*

ANEXO 3. Abstract del manuscrito obtenido de un estudio adicional en pacientes con fibrosis quística que será publicado en la revista indizada “Invest Clin”

Frequency of the most common mutations of the CFTR gene by the molecular ARMS-PCR technique (Amplification Refractory Mutation System) in Pediatric patients with cystic fibrosis in Peru.

Ruth Aquino-Ordinola^{1,2}, Ana Protzel³, J. Rivera⁴, H. Abarca⁴, M. Dueñas³, C. Nestarez⁵, N. Purizaga¹, B. Diringer²

- 1. Programa de Maestría de Biotecnología Molecular, Escuela de Post Grado, Universidad Nacional de Tumbes, Tumbes, Perú.**
- 2. Inca'Biotec S.A.C, Tumbes, Peru.**
- 3. Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins (ESSALUD) - ESSALUD, Lima, Perú.**
- 4. Instituto Nacional de Salud del Niño - INSN Lima, Perú.**
- 5. Asociación de padres de niños con fibrosis quística (FIQUI Peru), Lima, Perú.**

Corresponding author. Programa de postgrado-Maestría en Biotecnología molecular, National University of Tumbes Av. Universitaria S / N Pampa Grande, Tumbes-Peru. Tel. : + 51-73-948359340. Email: ruthaquinord@gmail.com.

ABSTRACT:

Cystic fibrosis (CF) is a genetic lethal disease, induced by mutations in the CFTR gene (Cystic fibrosis Transmembrane Conductance Regulator). In Peru, the disease is misdiagnosed, and the age of patients' death is much lower compared to Northern Hemisphere countries. In this study the frequency of the 10 most common mutations in Latin America of the gene CFTR in Peruvian patients attended at the Edgardo Rebagliati Martins National Hospital (ESSALUD) and the National Institute of Child Health (INSN) in Lima, Peru was evaluated. Blood samples of 36 patients with CF were collected, and the ARMS-PCR technique (Amplification Refractory Mutation System) was used to determine the presence of such mutations. The diagnosis of mutations of other Peruvian patients analyzed abroad was also recovered. The diagnosis by ARMS-PCR has permitted to detect the 40.5% alleles of the patients with CF, considering the 36 patients analyzed in this study more the 11 ones analyzed abroad, which represent the 85.71% of known patients in the country at the time we realized this study. The mutations found were DF508 (26.19%), G542X (5.95%), R1162X (2.38%) and G551D, Q220X, F57L, C.1116 + 2T> C, 2789 + 5G> A, (1, 19%). The results obtained are the first published for this population and they show that there is significant variability of mutations; however it is necessary to do studies with complete sequencing of the CFTR gen to identify the missing mutations. **Key words:** *Cystic Fibrosis, mutations, CFTR, diagnostic, Peru.*

ANEXO 4: Informe individual de los resultados microbiológicos obtenidos de la identificación a nivel molecular de los patógenos presentes en los pacientes estudiados en el presente trabajo de investigación.

A continuación se mostraran los resultados de bacterias identificadas por análisis de secuencias del gen 16S ARNr para cada paciente con Fibrosis quística, los cuales han sido enviados a los respectivos hospitales de Lima donde determinaran el tratamiento antibiótico adecuado para cada uno de los pacientes.



INCA'BIOTEC S.A.C
INVESTIGACIÓN Y CAPACITACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

TUMBES - Calle FILIPINAS N°212
Tel-Fax: (0051) 072522559 RPC: 972729366
E-mail: incabiotec@gmail.com

DATOS DEL PACIENTE

Tumbes 1 de marzo, 2016

Apellidos: Lares Matos

Nombres: Arian

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

**EXAMEN CITOBACTERIOLÓGICO DE UNA MUESTRA PULMONAR
(FIBROSIS QUÍSTICA)**

Fecha de muestreo: 11 de Julio de 2015

Tipo de muestra: esputo

Citología

Aspecto:

Mucopurulento Verdoso

Células epiteliales (CEs):

Menos de 10 células/campo

Leucocitos polimorfonucleares (PMNs):

Menos de 20 células/campo

CULTIVO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

Se identificaron los siguientes microorganismos en la muestra de esputo del paciente **Lares Matos Arian**, el cual fue realizado por microbiología clásica, por técnicas moleculares y por secuenciación.

Rec. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (fenotipo mucoide)	>10 ⁶ UFC/ml
Rec. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Negativo
Rec. <i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo
Rec. <i>Enterobacterias</i>	Negativo
Rec. <i>Burkholderia cepacia</i>	Negativo
Rec. <i>Bacillus cereus</i>	>10 ⁶ UFC/ml
Rec. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	3,1x10 ³ UFC/ml
Rec. <i>Stenotrophomonas sp.</i>	>10 ⁶ UFC/ml

Blga. Ruth E. Aquino Ordinola



INCA'BIOTEC S.A.C
INVESTIGACIÓN Y CAPACITACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

TUMBES - Calle FILIPINAS N°212
Tel-Fax: (0051) 072522559 RPC: 972729366
E-mail: incabiotec@gmail.com

DATOS DEL PACIENTE

Tumbes 1 de marzo, 2016

Apellidos: Allauca Eugendio

Nombres: Luis Hernan

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

EXAMEN CITOBACTERIOLÓGICO DE UNA MUESTRA PULMONAR (FIBROSIS QUÍSTICA)

Fecha de muestreo: 11 de Julio de 2015

Tipo de muestra: esputo

Citología

Aspecto:

Células epiteliales (CEs):

Leucocitos polimorfonucleares (PMNs):

Mucopurelento Espumoso

Menos de 10 células/campo

Menos de 20 células/campo

CULTIVO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

Se identificaron los siguientes microorganismos en la muestra de esputo del paciente **Allauca Eugenio Luis Hernán**, el cual fue realizado por microbiología clásica, por técnicas moleculares y por secuenciación.

Rec. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (fenotipo mucoide)	1,4x10 ³ UFC/ml
Rec. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Negativo
Rec. <i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo
Rec. <i>Enterobacterias</i>	Negativo
Rec. <i>Burkholderia cepacia</i>	Negativo
Rec. <i>Pseudomonas luteola</i>	1,1x10 ³ UFC/ml
Rec. <i>Enterococcus faecalis</i>	6,2x10 ³ UFC/ml
Rec. <i>Acinetobacter haemolyticus</i>	6,2x10 ³ UFC/ml

Blga. Ruth E. Aquino Ordinola



INCA'BIOTEC S.A.C
INVESTIGACIÓN Y CAPACITACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

TUMBES - Calle FILIPINAS N°212
Tel-Fax: (0051) 072522559 RPC: 972729366
E-mail: incabiotec@gmail.com

DATOS DEL PACIENTE

Tumbes 1 de marzo, 2016

Apellidos: Acosta Gibson

Nombres: Salvador

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

**EXAMEN CITOBACTERIOLÓGICO DE UNA MUESTRA PULMONAR
(FIBROSIS QUÍSTICA)**

Fecha de muestreo: 11 de Julio de 2015

Tipo de muestra: esputo

Citología

Aspecto:

Células epiteliales (CEs):
Leucocitos polimorfonucleares (PMNs):

Mucopurulento Verdoso

Menos de 10 células/campo
Menos de 20 células/campo

CULTIVO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

Se identificaron los siguientes microorganismos en la muestra de esputo del paciente **Acosta Gibson Salvador**, el cual fue realizado por microbiología clásica, por técnicas moleculares y por secuenciación.

Rec. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7,5x10 ⁴ UFC/ml
Rec. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Negativo
Rec. <i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo
Rec. <i>Enterobacterias</i>	Negativo
Rec. <i>Burkholderia cepacia</i>	Negativo
Rec. <i>Bacillus cereus</i>	>10 ⁶ UFC/ml
Rec. <i>Pseudomonas sp.</i>	7,5x10 ⁴ UFC/ml
Rec. <i>Bacillus pumilus</i>	>10 ⁶ UFC/ml
Rec. <i>Bacillus thuringiensis</i>	>10 ⁶ UFC/ml
Rec. <i>Serratia marcescens</i>	>10 ⁶ UFC/ml

Blga. Ruth E. Aquino Ordinola



INCA'BIOTEC S.A.C
INVESTIGACIÓN Y CAPACITACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

TUMBES - Calle FILIPINAS N°212
Tel-Fax: (0051) 072522559 RPC: 972729366
E-mail: incabiotec@gmail.com

DATOS DEL PACIENTE

Tumbes 1 de marzo, 2016

Apellidos: Gutierrez Ramos

Nombres: Joaquin

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

**EXAMEN CITOBACTERIOLÓGICO DE UNA MUESTRA PULMONAR
(FIBROSIS QUÍSTICA)**

Fecha de muestreo: 11 de Julio de 2015

Tipo de muestra: esputo

Citología

Aspecto:

Células epiteliales (CEs):
Leucocitos polimorfonucleares (PMNs):

Mucopurulento Verdoso

Menos de 10 células/campo
Menos de 20 células/campo

CULTIVO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

Se identificaron los siguientes microorganismos en la muestra de esputo del paciente **Gutierrez Ramos Joaquin**, el cual fue realizado por microbiología clásica, por técnicas moleculares y por secuenciación.

Rec. <i>Streptococcus sp.</i>	>10 ⁶ UFC/m
Rec. <i>Leclercia adecarboxylata</i>	3,5x10 ² UFC/ml
Rec. <i>Pseudomonas sp</i>	>10 ⁶ UFC/ml
Rec. <i>Enterococcus faecalis</i>	1,5x10 ³ UFC/ml
Rec. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	1,5x10 ³ UFC/ml
Rec. <i>Klebsiella variicola</i>	1,5x10 ³ UFC/ml
Rec. <i>Klebsiella oxytoca</i>	>10 ⁶ UFC/ml
Rec. <i>Streptococcus mitis</i>	1,5x10 ³ UFC/ml
Rec. <i>Serratia marcescens</i>	>10 ⁶ UFC/ml

Blga. Ruth E. Aquino Ordinola



INCA'BIOTEC S.A.C
INVESTIGACIÓN Y CAPACITACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

TUMBES - Calle FILIPINAS N°212
Tel-Fax: (0051) 072522559 RPC: 972729366
E-mail: incabiotec@gmail.com

DATOS DEL PACIENTE

Tumbes 1 de marzo, 2016

Apellidos: Pacheco Rodriguez

Nombres: Alejandra

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

**EXAMEN CITOBACTERIOLÓGICO DE UNA MUESTRA PULMONAR
(FIBROSIS QUÍSTICA)**

Fecha de muestreo: 11 de Julio de 2015

Tipo de muestra: esputo

Citología

Aspecto:

Células epiteliales (CEs):
Leucocitos polimorfonucleares (PMNs):

Espumoso Verdoso

Menos de 10 células/campo
Menos de 20 células/campo

CULTIVO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

Se identificaron los siguientes microorganismos en la muestra de esputo del paciente **Pacheco Rodriguez Alejandra**, el cual fue realizado por microbiología clásica, por técnicas moleculares y por secuenciación.

Rec. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (fenotipo mucoide)	>10 ⁶ UFC/ml
Rec. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Negativo
Rec. <i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo
Rec. <i>Burkholderia cepacia</i>	Negativo
Rec. <i>Enterobacter hormaechei</i>	>10 ⁶ UFC/ml
Rec. <i>Pseudomonas sp.</i>	>10 ⁶ UFC/ml
Rec. <i>Enterobacter cloacae</i>	9,5x10 ² UFC/ml
Rec. <i>Enterobacter sp.</i>	3,4x10 ³ UFC/ml

Blga. Ruth E. Aquino Ordinola



INCA'BIOTEC S.A.C
INVESTIGACIÓN Y CAPACITACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

TUMBES - Calle FILIPINAS N°212
Tel-Fax: (0051) 072522559 RPC: 972729366
E-mail: incabiotec@gmail.com

DATOS DEL PACIENTE

Tumbes 1 de marzo, 2016

Apellidos: Rojas Lastrea

Nombres: Chris Ángela

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

**EXAMEN CITOBACTERIOLÓGICO DE UNA MUESTRA PULMONAR
(FIBROSIS QUÍSTICA)**

Fecha de muestreo: 11 de Julio de 2015

Tipo de muestra: esputo

Citología

Aspecto:

Células epiteliales (CEs):
Leucocitos polimorfonucleares (PMNs):

Mucopurulento Verdoso

Menos de 10 células/campo
Menos de 20 células/campo

CULTIVO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

Se identificaron los siguientes microorganismos en la muestra de esputo del paciente Rojas Lastrea Chris Ángela, el cual fue realizado por microbiología clásica, por técnicas moleculares y por secuenciación.

Rec. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1x10 ² UFC/ml
Rec. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Negativo
Rec. <i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo
Rec. <i>Enterobacterias</i>	Negativo
Rec. <i>Burkholderia cepacia</i>	Negativo
Rec. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	>10 ⁶ UFC/ml
Rec. <i>Pseudomonas sp.</i>	>10 ⁶ UFC/ml
Rec. <i>Stenotrophomonas sp.</i>	>10 ⁶ UFC/ml

Blga. Ruth E. Aquino Ordinola



INCA'BIOTEC S.A.C
INVESTIGACIÓN Y CAPACITACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

TUMBES - Calle FILIPINAS N°212
Tel-Fax: (0051) 072522559 RPC: 972729366
E-mail: incabiotec@gmail.com

DATOS DEL PACIENTE

Tumbes 1 de marzo, 2016

Apellidos: Villegas Castillo

Nombres: Oriana

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

**EXAMEN CITOBACTERIOLÓGICO DE UNA MUESTRA PULMONAR
(FIBROSIS QUÍSTICA)**

Fecha de muestreo: 11 de Julio de 2015

Tipo de muestra: esputo

Citología

Aspecto:

Espumoso Blanquecino

Células epiteliales (CEs):

Menos de 10 células/campo

Leucocitos polimorfonucleares (PMNs):

Menos de 20 células/campo

CULTIVO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

Se identificaron los siguientes microorganismos en la muestra de esputo del paciente **Villegas Castillo Oriana**, el cual fue realizado por microbiología clásica, por técnicas moleculares y por secuenciación.

Rec. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negativo
Rec. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Negativo
Rec. <i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo
Rec. <i>Enterobacterias</i>	Negativo
Rec. <i>Burkholderia cepacia</i>	Negativo
Rec. <i>Staphylococcus sp.</i>	>10 ⁶ UFC/ml

Blga. Ruth E. Aquino Ordinola



INCA'BIOTEC S.A.C
INVESTIGACIÓN Y CAPACITACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

TUMBES - Calle FILIPINAS N°212
Tel-Fax: (0051) 072522559 RPC: 972729366
E-mail: incabiotec@gmail.com

DATOS DEL PACIENTE

Tumbes 1 de marzo, 2016

Apellidos: Quiroz Gambini

Nombres: Sebastián

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

**EXAMEN CITOBACTERIOLÓGICO DE UNA MUESTRA PULMONAR
(FIBROSIS QUÍSTICA)**

Fecha de muestreo: 11 de Julio de 2015

Tipo de muestra: esputo

Citología

Aspecto:

Espumoso Verdoso

Células epiteliales (CEs):

Menos de 10 células/campo

Leucocitos polimorfonucleares (PMNs):

Menos de 20 células/campo

CULTIVO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

Se identificaron los siguientes microorganismos en la muestra de esputo del paciente **Quiroz Gambini Sebastián**, el cual fue realizado por microbiología clásica, por técnicas moleculares y por secuenciación.

Rec. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,2x10 ³ UFC/ml
Rec. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Negativo
Rec. <i>Staphylococcus aureus</i>	>10 ⁶ UFC/ml
Rec. <i>Bacillus sp.</i>	3,9x10 ³ UFC/ml
Rec. <i>Burkholderia cepacia</i>	Negativo
Rec. <i>Serratia sp.</i>	>10 ⁶ UFC/ml
Rec. <i>Klebsiella varicola</i>	>10 ⁶ UFC/ml
Rec. <i>Pseudomonas sp.</i>	2,2x10 ³ UFC/ml
Rec. <i>Bacillus subtilis</i>	1,4x10 ³ UFC/ml
Rec. <i>Bacillus vallismortis</i>	1,4x10 ³ UFC/ml

Blga. Ruth E. Aquino Ordinola



INCA'BIOTEC S.A.C
INVESTIGACIÓN Y CAPACITACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

TUMBES - Calle FILIPINAS N°212
Tel-Fax: (0051) 072522559 RPC: 972729366
E-mail: incabiotec@gmail.com

DATOS DEL PACIENTE

Tumbes 1 de marzo, 2016

Apellidos: Olivares Ramírez

Nombres: Lady

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

**EXAMEN CITOBACTERIOLÓGICO DE UNA MUESTRA PULMONAR
(FIBROSIS QUÍSTICA)**

Fecha de muestreo: 11 de Julio de 2015

Tipo de muestra: esputo

Citología

Aspecto:

Células epiteliales (CEs):

Leucocitos polimorfonucleares (PMNs):

Espumoso Amarillento verdoso

Menos de 10 células/campo

Menos de 20 células/campo

CULTIVO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

Se identificaron los siguientes microorganismos en la muestra de esputo del paciente **Olivares Ramírez Lady**, el cual fue realizado por microbiología clásica, por técnicas moleculares y por secuenciación.

Rec. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>10 ⁶ UFC/ml
Rec. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Negativo
Rec. <i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo
Rec. <i>Enterobacter faecalis</i>	>10 ⁶ UFC/ml
Rec. <i>Burkholderia cepacia</i>	Negativo
Rec. <i>Pseudomonas sp.</i>	5x10 ¹ UFC/ml
Rec. <i>Enterobacter cloacae</i>	>10 ⁶ UFC/ml

Blga. Ruth E. Aquino Ordinola



INCA'BIOTEC S.A.C
INVESTIGACIÓN Y CAPACITACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

TUMBES - Calle FILIPINAS N°212
Tel-Fax: (0051) 072522559 RPC: 972729366
E-mail: incabiotec@gmail.com

DATOS DEL PACIENTE

Tumbes 1 de marzo, 2016

Apellidos: Johnston Samaniego

Nombres: Catalina

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

**EXAMEN CITOBACTERIOLÓGICO DE UNA MUESTRA PULMONAR
(FIBROSIS QUÍSTICA)**

Fecha de muestreo: 26 de setiembre de 2015

Tipo de muestra: esputo

Citología

Aspecto:

Células epiteliales (CEs):
Leucocitos polimorfonucleares (PMNs):

Verdoso Viscoso

Menos de 10 células/campo
Menos de 10 células/campo

CULTIVO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

Se identificaron los siguientes microorganismos en la muestra de esputo del paciente **Johnston Samaniego Catalina**, el cual fue realizado por microbiología clásica, por técnicas moleculares y por secuenciación.

Rec. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negativo
Rec. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Negativo
Rec. <i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo
Rec. <i>Enterobacterias</i>	Negativo
Rec. <i>Burkholderia cepacia</i>	Negativo
Rec. <i>Streptococcus pyogenes</i>	>10 ⁶ UFC/ml

Blga. Ruth E. Aquino Ordinola



INCA'BIOTEC S.A.C
INVESTIGACIÓN Y CAPACITACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

TUMBES - Calle FILIPINAS N°212
Tel-Fax: (0051) 072522559 RPC: 972729366
E-mail: incabiotec@gmail.com

DATOS DEL PACIENTE

Tumbes 1 de marzo, 2016

Apellidos: Alcca Valencia

Nombres: Simón

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

**EXAMEN CITOBACTERIOLÓGICO DE UNA MUESTRA PULMONAR
(FIBROSIS QUÍSTICA)**

Fecha de muestreo: 26 de setiembre de 2015

Tipo de muestra: esputo

Citología

Aspecto:

Células epiteliales (CEs):

Leucocitos polimorfonucleares (PMNs):

Verdoso Espumoso

Menos de 10 células/campo

Menos de 10 células/campo

CULTIVO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

Se identificaron los siguientes microorganismos en la muestra de esputo del paciente **Alcca Valencia Simón**, el cual fue realizado por microbiología clásica, por técnicas moleculares y por secuenciación.

Rec. *Pseudomonas aeruginosa* >10⁶ UFC/ml

Rec. *Bacillus thuringiensis* >10⁶ UFC/m

Rec. *Pseudomonas sp.* >10⁶ UFC/m

Rec. *Enterobacter hormaechei* 10² UFC/ml

Blga. Ruth E. Aquino Ordinola



INCA'BIOTEC S.A.C
INVESTIGACIÓN Y CAPACITACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

TUMBES - Calle FILIPINAS N°212
Tel-Fax: (0051) 072522559 RPC: 972729366
E-mail: incabiotec@gmail.com

DATOS DEL PACIENTE

Tumbes 1 de marzo, 2016

Apellidos: Sulca Barrios

Nombres: Josue

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

**EXAMEN CITOBACTERIOLÓGICO DE UNA MUESTRA PULMONAR
(FIBROSIS QUÍSTICA)**

Fecha de muestreo: 26 de setiembre de 2015

Tipo de muestra: esputo

Citología

Aspecto:

Células epiteliales (CEs):

Leucocitos polimorfonucleares (PMNs):

Verdoso Mucopurulento

Menos de 10 células/campo

Menos de 10 células/campo

CULTIVO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

Se identificaron los siguientes microorganismos en la muestra de esputo del paciente **Sulca Barrios Josue**, el cual fue realizado por microbiología clásica, por técnicas moleculares y por secuenciación.

Rec. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,1x10 ⁴ UFC/ml
Rec. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Negativo
Rec. <i>Staphylococcus aureus</i>	>10 ⁶ UFC/ml
Rec. <i>Enterobacter sp.</i>	>10 ⁶ UFC/ml
Rec. <i>Burkholderia cepacia</i>	Negativo
Rec. <i>Klebsiella sp.</i>	>10 ⁶ UFC/ml
Rec. <i>Pseudomonas sp.</i>	>10 ⁶ UFC/ml
Rec. <i>Achromobacter sp.</i>	

Blga. Ruth E. Aquino Ordinola



INCA'BIOTEC S.A.C
INVESTIGACIÓN Y CAPACITACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

TUMBES - Calle FILIPINAS N°212
Tel-Fax: (0051) 072522559 RPC: 972729366
E-mail: incabiotec@gmail.com

DATOS DEL PACIENTE

Tumbes 1 de marzo, 2016

Apellidos: Pereyra García

Nombres: Emilio

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

**EXAMEN CITOBACTERIOLÓGICO DE UNA MUESTRA PULMONAR
(FIBROSIS QUÍSTICA)**

Fecha de muestreo: 26 de setiembre de 2015

Tipo de muestra: esputo

Citología

Aspecto:

Células epiteliales (CEs):
Leucocitos polimorfonucleares (PMNs):

Espumoso Blanquecino

Más de 10 células/campo
Menos de 10 células/campo

CULTIVO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

Se identificaron los siguientes microorganismos en la muestra de esputo del paciente **Pereyra García Emilio**, el cual fue realizado por microbiología clásica, por técnicas moleculares y por secuenciación.

Rec. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negativo
Rec. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Negativo
Rec. <i>Staphylococcus aureus</i>	>10 ⁶ UFC/ml
Rec. <i>Enterobacterias</i>	Negativo
Rec. <i>Burkholderia cepacia</i>	Negativo
Rec. <i>Klebsiella oxytoca</i>	>10 ⁶ UFC/ml

Blga. Ruth E. Aquino Ordinola



INCA'BIOTEC S.A.C
INVESTIGACIÓN Y CAPACITACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

TUMBES - Calle FILIPINAS N°212
Tel-Fax: (0051) 072522559 RPC: 972729366
E-mail: incabiotec@gmail.com

DATOS DEL PACIENTE

Tumbes 1 de marzo, 2016

Apellidos: Nori Scardovi

Nombres: Francesco

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

**EXAMEN CITOBACTERIOLÓGICO DE UNA MUESTRA PULMONAR
(FIBROSIS QUÍSTICA)**

Fecha de muestreo: 26 de setiembre de 2015

Tipo de muestra: esputo

Citología

Aspecto:

Células epiteliales (CEs):
Leucocitos polimorfonucleares (PMNs):

Espumoso

Más de 10 células/campo
Menos de 10 células/campo

CULTIVO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

Se identificaron los siguientes microorganismos en la muestra de esputo del paciente **Nori Scardovi Francesco**, el cual fue realizado por microbiología clásica, por técnicas moleculares y por secuenciación.

Rec. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negativo
Rec. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Negativo
Rec. <i>Staphylococcus aureus</i>	>10 ⁶ UFC/ml
Rec. <i>Enterobacterias</i>	Negativo
Rec. <i>Burkholderia cepacia</i>	Negativo

Blga. Ruth E. Aquino Ordinola



INCA'BIOTEC S.A.C
INVESTIGACIÓN Y CAPACITACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

TUMBES - Calle FILIPINAS N°212

DATOS DEL PACIENTE

Tumbes 1 de marzo, 2016

Apellidos: Nori Scardovi

Nombres: Benedicta

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

**EXAMEN CITOBACTERIOLÓGICO DE UNA MUESTRA PULMONAR
(FIBROSIS QUÍSTICA)**

Fecha de muestreo: 26 de setiembre de 2015

Tipo de muestra: esputo

Citología

Aspecto:

Células epiteliales (CEs):
Leucocitos polimorfonucleares (PMNs):

Verdoso espumoso

Menos de 10 células/campo
Menos de 10 células/campo

CULTIVO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

Se identificaron los siguientes microorganismos en la muestra de esputo del paciente **Nori Scardovi Benedicta**, el cual fue realizado por microbiología clásica, por técnicas moleculares y por secuenciación.

Rec. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negativo
Rec. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Negativo
Rec. <i>Staphylococcus aureus</i>	>10 ⁶ UFC/ml
Rec. <i>Enterobacterias</i>	Negativo
Rec. <i>Burkholderia cepacia</i>	Negativo

Blga. Ruth E. Aquino Ordinola



INCA'BIOTEC S.A.C
INVESTIGACIÓN Y CAPACITACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

TUMBES - Calle FILIPINAS N°212
Tel-Fax: (0051) 072522559 RPC: 972729366
E-mail: incabiotec@gmail.com

DATOS DEL PACIENTE

Tumbes 1 de marzo, 2016

Apellidos: Nori Scardovi

Nombres: Maria Chiara

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

**EXAMEN CITOBACTERIOLÓGICO DE UNA MUESTRA PULMONAR
(FIBROSIS QUÍSTICA)**

Fecha de muestreo: 26 de setiembre de 2015

Tipo de muestra: esputo

Citología

Aspecto:

Células epiteliales (CEs):

Leucocitos polimorfonucleares (PMNs):

Verdoso espumoso

Menos de 10 células/campo

Menos de 10 células/campo

CULTIVO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

Se identificaron los siguientes microorganismos en la muestra de esputo del paciente **Nori Scardovi Maria Chiara**, el cual fue realizado por microbiología clásica, por técnicas moleculares y por secuenciación.

Rec. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>10 ⁶ UFC/ml
Rec. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Negativo
Rec. <i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo
Rec. <i>Enterobacterias</i>	Negativo
Rec. <i>Burkholderia cepacia</i>	Negativo
Rec. <i>Paenibacillus sp.</i>	>10 ⁶ UFC/ml

Blga. Ruth E. Aquino Ordinola



INCA'BIOTEC S.A.C
INVESTIGACIÓN Y CAPACITACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

TUMBES - Calle FILIPINAS N°212
Tel-Fax: (0051) 072522559 RPC: 972729366
E-mail: incabiotec@gmail.com

DATOS DEL PACIENTE

Tumbes 1 de marzo, 2016

Apellidos: Herrera

Nombres: Sergio

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

**EXAMEN CITOBACTERIOLÓGICO DE UNA MUESTRA PULMONAR
(FIBROSIS QUÍSTICA)**

Fecha de muestreo: 26 de setiembre de 2015

Tipo de muestra: esputo

Citología

Aspecto:

Células epiteliales (CEs):

Leucocitos polimorfonucleares (PMNs):

Verdoso Viscoso

Menos de 10 células/campo

Menos de 10 células/campo

CULTIVO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

Se identificaron los siguientes microorganismos en la muestra de esputo del paciente **Herrera Sergio**, el cual fue realizado por microbiología clásica, por técnicas moleculares y por secuenciación.

Rec. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,2x10 ⁴ UFC/ml
Rec. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Negativo
Rec. <i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo
Rec. <i>Enterobacterias</i>	Negativo
Rec. <i>Burkholderia cepacia</i>	Negativo
Rec. <i>Pseudomonas sp.</i>	7,6x10 ³ UFC/ml

Blga. Ruth E. Aquino Ordinola



INCA'BIOTEC S.A.C
INVESTIGACIÓN Y CAPACITACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

TUMBES - Calle FILIPINAS N°212
Tel-Fax: (0051) 072522559 RPC: 972729366
E-mail: incabiotec@gmail.com

DATOS DEL PACIENTE

Tumbes 1 de marzo, 2016

Apellidos: Vergara Cabrera

Nombres: Brian

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

**EXAMEN CITOBACTERIOLÓGICO DE UNA MUESTRA PULMONAR
(FIBROSIS QUÍSTICA)**

Fecha de muestreo: 7 de diciembre de 2015

Tipo de muestra: esputo

Citología

Aspecto:

Células epiteliales (CEs):
Leucocitos polimorfonucleares (PMNs):

Hemoptoico

Menos de 10 células/campo
Menos de 10 células/campo

CULTIVO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

Se identificaron los siguientes microorganismos en la muestra de esputo del paciente **Vergara Cabrera Brian**, el cual fue realizado por microbiología clásica, por técnicas moleculares y por secuenciación.

Rec. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,6x10 ⁴ UFC/ml
Rec. <i>Staphylococcus epidermis</i>	1,1x10 ⁴ UFC/ml
Rec. <i>Staphylococcus sp.</i>	1,1x10 ⁴ UFC/ml
Rec. <i>Neisseria flavescens</i>	1,5x10 ² UFC/ml
Rec. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Negativo
Rec. <i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo
Rec. <i>Enterobacterias</i>	Negativo
Rec. <i>Burkholderia cepacia</i>	Negativo

Blga. Ruth E. Aquino Ordinola



INCA'BIOTEC S.A.C
INVESTIGACIÓN Y CAPACITACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

TUMBES - Calle FILIPINAS N°212
Tel-Fax: (0051) 072522559 RPC: 972729366
E-mail: incabiotec@gmail.com

DATOS DEL PACIENTE

Tumbes 1 de marzo, 2016

Apellidos: Acosta Gibson

Nombres: Salvador

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

**EXAMEN CITOBACTERIOLÓGICO DE UNA MUESTRA PULMONAR
(FIBROSIS QUÍSTICA)**

Fecha de muestreo: 7 de diciembre de 2015

Tipo de muestra: esputo

Citología

Aspecto:

Células epiteliales (CEs):
Leucocitos polimorfonucleares (PMNs):

Mucopurulento color mostaza

Menos de 10 células/campo
Más de 10 células/campo

CULTIVO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

Se identificaron los siguientes microorganismos en la muestra de esputo del paciente **Acosta Gibson Salvador**, el cual fue realizado por microbiología clásica, por técnicas moleculares y por secuenciación.

Rec. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>10 ⁶ UFC/ml
Rec. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Negativo
Rec. <i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo
Rec. <i>Enterobacterias</i>	Negativo
Rec. <i>Burkholderia cepacia</i>	Negativo

Blsa. Ruth F. Auino Ordinola



INCA'BIOTEC S.A.C
INVESTIGACIÓN Y CAPACITACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

TUMBES - Calle FILIPINAS N°212
Tel-Fax: (0051) 072522559 RPC: 972729366
E-mail: incabiotec@gmail.com

DATOS DEL PACIENTE

Tumbes 1 de marzo, 2016

Apellidos: Mejía Villanueva

Nombres: Ariana

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

**EXAMEN CITOBACTERIOLÓGICO DE UNA MUESTRA PULMONAR
(FIBROSIS QUÍSTICA)**

Fecha de muestreo: 7 de diciembre de 2015

Tipo de muestra: esputo

Citología

Aspecto:

Células epiteliales (CEs):

Leucocitos polimorfonucleares (PMNs):

Espumoso

Más de 10 células/campo

Menos de 10 células/campo

CULTIVO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

*Se identificaron los siguientes microorganismos en la muestra de esputo del paciente **Mejía Villanueva Ariana**, el cual fue realizado por microbiología clásica, por técnicas moleculares y por secuenciación.*

Rec. <i>Staphylococcus salivarius</i>	>10 ⁶ UFC/ml
Rec. <i>Staphylococcus sp.</i>	>10 ⁶ UFC/ml
Rec. <i>Neisseria flavescens</i>	1x10 ³ UFC/ml
Rec. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negativo
Rec. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Negativo
Rec. <i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo
Rec. <i>Enterobacterias</i>	Negativo
Rec. <i>Burkholderia cepacia</i>	Negativo

Blga. Ruth E. Aquino Ordinola

DEDICATORIA

Esta investigación está dedicada a todas las personas que a lo largo de mi vida me enseñaron que siempre hay motivos importantes para cumplir ya sea, una meta, un sueño o esas pequeñas cosas que cuando las logramos nos hacen felices, dentro de ellos;

A mis padres José Aquino y Petronila Ordinola, y a mis hermanos Erika y Frank.

También a Javier Ayala por haber sido mi fortaleza, mi consejero y acompañarme todo este tiempo a lograr mis objetivos.

A mis estimados amigos Cinthya y Bernabé, por su amistad incondicional.

Por último a mis profesores de la maestría, Eric Mialhe, Virna Cedeño, Emmerik Motte, y a mi asesor Benoit Diringier, todos ellos parte fundamental en mi aprendizaje.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a las Instituciones como FIQUI PERU y al Instituto Nacional de Salud del Niño quienes nos apoyaron con el acercamiento a los pacientes con FQ.

También a CONCYTEC y a la Universidad Nacional de Tumbes por promover la investigación científica en nuestro país, apoyarnos con la difusión de nuestras investigaciones y colaborar en el financiamiento del presente estudio.

Finalmente a la empresa INCABIOTEC por comprometerse con la formación científica y humanística de cada investigador, y por la asesoría brindada.