

**DIVERSIDAD FILOGENÉTICA DE BACTERIAS
ASOCIADAS A FIBROSIS QUÍSTICA**

UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK

FACULTAD DE MEDICINA

MAESTRÍA EN BIOMEDICINA

PLAN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

**DIVERSIDAD FILOGENÉTICA DE BACTERIAS
ASOCIADAS A FIBROSIS QUÍSTICA**

REALIZADO POR:

BRYAN ALEJANDRO LOZADA CUEVA

Director del proyecto:

Dr. Juan Carlos Navarro, Ph.D

Como requisito para la obtención del título de:

MÁSTER EN BIOMEDICINA

Quito, 7 DE OCTUBRE DE 2021

**DIVERSIDAD FILOGENÉTICA DE BACTERIAS
ASOCIADAS A FIBROSIS QUÍSTICA**

**DIVERSIDAD FILOGENÉTICA DE BACTERIAS
ASOCIADAS A FIBROSIS QUÍSTICA**

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, BRYAN ALEJANDRO LOZADA CUEVA, con cédula de identidad # 1723604367, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado a calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.



FIRMA Y CÉDULA

1723604367

**DIVERSIDAD FILOGENÉTICA DE BACTERIAS
ASOCIADAS A FIBROSIS QUÍSTICA
DECLARATORIA**

El presente trabajo de investigación titulado:

**DIVERSIDAD FILOGENÉTICA DE BACTERIAS
ASOCIADAS A FIBROSIS QUÍSTICA**

Realizado por:

BRYAN ALEJANDRO LOZADA CUEVA

como Requisito para la Obtención del Título de:

MAGISTER EN BIOMEDICINA

ha sido dirigido por el profesor

JUAN CARLOS NAVARRO

quien considera que constituye un trabajo original de su autor

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Navarro', with a horizontal line underneath.

FIRMA

CI: 1757166614

**DIVERSIDAD FILOGENÉTICA DE BACTERIAS
ASOCIADAS A FIBROSIS QUÍSTICA**

LOS PROFESORES INFORMANTES

Los Profesores Informantes:

JOSÉ RUBÉN RAMÍREZ-IGLESIAS

LINO ARISQUETA

Después de revisar el trabajo presentado,

lo han calificado como apto para su defensa oral ante

el tribunal examinador



FIRMA



FIRMA

Quito, 7 DE OCTUBRE DE 2021

**DIVERSIDAD FILOGENÉTICA DE BACTERIAS
ASOCIADAS A FIBROSIS QUÍSTICA**

**DIVERSIDAD FILOGENÉTICA DE BACTERIAS
ASOCIADAS A FIBROSIS QUÍSTICA**

Este trabajo de tesis fue realizado bajo el Programa de Investigación:

SALUD GLOBAL

como parte del

Proyecto de Investigación de la Dirección de Investigación e Innovación

DII-UISEK-P011617_2

(Ecoepidemiología *in silico* de enfermedades emergentes)

**DIVERSIDAD FILOGENÉTICA DE BACTERIAS
ASOCIADAS A FIBROSIS QUÍSTICA**

Para someter a:

To be submitted:

Diversidad filogenética de bacterias asociadas a fibrosis quística.

Bryan Lozada^{1*}, Juan Carlos Navarro^{1,2*}

¹ Universidad Internacional SEK, Maestría en Biomedicina, Facultad de Ciencias de la Salud,
Quito, Ecuador.

² Universidad Internacional SEK, Grupo de Investigación en Enfermedades Emergentes,
Desatendidas, Eco-epidemiología y Biodiversidad, Facultad de Ciencias de la Salud, Quito,
Ecuador.

*AUTORES DE CORRESPONDENCIA: Bryan Lozada y Juan Carlos Navarro, Universidad
Internacional SEK, Facultad de Ciencias de la Salud, Quito, Ecuador. Teléfono: +593-; email:

juancarlos.navarro@uisek.edu.ec

Título corto o Running title: *Diversidad filogenética bacteriana, fibrosis quística*

DIVERSIDAD FILOGENÉTICA DE BACTERIAS ASOCIADAS A FIBROSIS QUÍSTICA

Resumen

La fibrosis quística es una enfermedad autosómica recesiva en la que una mutación en el cromosoma 7 que codifica a la Proteína Reguladora de Conductancia de Transmembrana (CFTR) (JS, 2016). El funcionamiento anormal de la proteína CFTR eleva concentraciones de bicarbonato modificando la concentración de aniones, desajustando la composición del moco y aumentando la viscosidad, ocasionando su principal afección que consiste en una infección crónica de las vías respiratorias a nivel endobronquial (D & CL, 2019).

El movimiento del moco proporciona un ambiente propicio para infecciones microbianas de importancia clínica originadas por bacterias y hongos (B. C & AM, 2019). Estas infecciones inician con el ingreso de bacterias en las vías respiratorias formando un biofilm en el parénquima pulmonar que facilita la adhesión de microorganismos patógenos que invaden el epitelio pulmonar, infectando y provocando daño tisular (AC & VJ, 2019).

Comprender las interacciones y la diversidad que se producen durante la infección es de relevancia para un tratamiento oportuno, ya que los microorganismos pueden generar nichos de dependencia nutricional u otras relaciones sinérgicas o antagónicas (C. S et al., 2018).

El estudio microbiológico de la fibrosis quística (FQ), actualmente se ha enfocado a que las vías respiratorias de la FQ habitualmente albergan comunidades microbianas complejas y que los cambios en la estructura y actividad de estas comunidades influyen en el estado clínico del paciente y la progresión de la enfermedad pulmonar (B & PA, 2019).

En este estudio, se evalúa la diversidad y estructuración filogenética microbiana mediante la elaboración de árboles de las genotecas de microorganismos halladas dentro de las muestras de esputo de pacientes con fibrosis quística. Los filotipos presentes en muestras de esputo se analizaron utilizando genotecas de clones de ARNribosomal 16S (Chmiel et al., 2014).

DIVERSIDAD FILOGENÉTICA DE BACTERIAS ASOCIADAS A FIBROSIS QUÍSTICA

Los resultados mostraron un espectro ampliado de filotipos bacterianos entre bacterias oportunistas y patógenas. Como una relación en cuanto a la progresión de la enfermedad en el árbol A y una interacción metabólica en el árbol B. Esto indica que la progresión del deterioro pulmonar está ligado a un conjunto de factores como interacciones metabólicas, modificaciones del parénquima pulmonar y coinfecciones.

Palabras clave: Bacterias, filogenética, fibrosis quística, ADN ribosomal 16S, bioinformática

DIVERSIDAD FILOGENÉTICA DE BACTERIAS ASOCIADAS A FIBROSIS QUÍSTICA

Abstract.

Cystic fibrosis is an autosomal recessive disease in which a mutation on chromosome 7 encoding the Transmembrane Conductance Regulatory Protein (CFTR) (JS, 2016). The abnormal functioning of the CFTR protein raises bicarbonate concentrations, modifying the concentration of anions, altering the composition of the mucus and increasing the viscosity, causing its main condition that consists of a chronic infection of the respiratory tract at the endobronchial level (D & CL, 2019).

Mucus movement provides an environment conducive to clinically important microbial infections caused by bacteria and fungi (B. C & AM, 2019). These infections begin with the entry of bacteria into the respiratory tract, forming a biofilm in the lung parenchyma that facilitates the adhesion of pathogenic microorganisms that invade the lung epithelium, infecting and causing tissue damage (AC & VJ, 2019).

Understanding the interactions and diversity that occur during infection is relevant for timely treatment, since microorganisms can generate niches of nutritional dependence or other synergistic or antagonistic relationships (C. S et al., 2018).

The microbiological study of cystic fibrosis (CF) has currently focused on the fact that the CF airways usually harbor complex microbial communities and that changes in the structure and activity of these communities influence the patient's clinical status and progression of lung disease (B & PA, 2019).

In this study, microbial phylogenetic diversity and structuring is evaluated by making trees of the libraries of microorganisms found within sputum samples from patients with cystic fibrosis. The phylotypes present in sputum samples were analyzed using 16S ribosomal RNA clone libraries (Chmiel et al., 2014).

The results showed an extended spectrum of bacterial phylotypes between opportunistic and pathogenic bacteria. As a relationship regarding the progression of the disease in tree A and a

DIVERSIDAD FILOGENÉTICA DE BACTERIAS ASOCIADAS A FIBROSIS QUÍSTICA

metabolic interaction in tree B. This indicates that the progression of lung deterioration is linked to a set of factors such as metabolic interactions, modifications of the lung parenchyma and co-infections.

Keywords: Bacteria, phylogenetics, cystic fibrosis, 16S ribosomal DNA, bioinformatics

DIVERSIDAD FILOGENÉTICA DE BACTERIAS ASOCIADAS A FIBROSIS QUÍSTICA

Introducción.

La fibrosis quística es una enfermedad multisistémica de carácter autosómico recesivo provocado por una mutación en el cromosoma 7, responsable de codificar la Proteína Reguladora de Conductancia Transmembrana (CFTR) (Gilligan, 2014), la cual incapacita a las células epiteliales a bombear suficiente agua en las secreciones dejando como resultado demasiada viscosidad debido al transporte defectuoso de sodio y cloro, lo que genera el fácil atrapamiento de microorganismos, específicamente en vías respiratorias inferiores (Chmiel et al., 2014).

El incremento de los iones y la pérdida de agua en las vías aéreas dificultan el deslizamiento del moco, produciendo un ambiente propicio para múltiples infecciones de importancia clínica como aquellas provocadas por bacterias y hongos filamentosos (Granchelli et al., 2018). Los macrófagos alveolares reconocen los antígenos activando la inmunidad celular y así poder combatir al patógeno, por esta razón los pacientes con una marcada inmunosupresión o fibrosis quística se vuelven más vulnerables a este tipo de afecciones (Renders et al., 2001).

Los microorganismos que suelen infectar a estos pacientes son hongos filamentosos y bacterias Gram negativas. Actualmente varios patógenos han ido incrementando su prevalencia y están asociados con la elevación de la tasa morbilidad y mortalidad (Psoter et al., 2017). Según datos registrados por la fundación de fibrosis quística en Estados Unidos, describen que *Pseudomonas aeruginosa* infectan al 20% de los jóvenes y cerca del 80% de adultos, mientras que *Stenotrophomonas maltophilia* y *Burkholderia cepacia complex* aumentan la prevalencia con la edad, además se ve aumentado el riesgo de colonización con hongos filamentosos (Govan et al., 2007).

Debido a este tipo de colonizaciones, la mayor parte de la morbilidad y la mortalidad se debe a ciclos de exacerbaciones pulmonares, es decir episodios de respuesta inflamatoria aguda al microbioma pulmonar, que son difíciles de prevenir y tratar, debido a que la causa no es

DIVERSIDAD FILOGENÉTICA DE BACTERIAS ASOCIADAS A FIBROSIS QUÍSTICA

comprendida, por lo que la aplicación de cuidados preventivos y tratamiento oportuno eleva la vida media de los pacientes (Foweraker, 2009).

Se cuenta con escasa información sobre la enfermedad en Ecuador, su etiología, epidemiología, cuadro clínico, diagnóstico e incluso el tratamiento por lo tanto es importante conocer los microorganismos prevalentes y su respectivo perfil de susceptibilidad, de esta manera se podrán evitar complicaciones graves que podrían reducir la calidad de vida de los pacientes (Martínez, 2001).

Etiología

El epitelio ciliado del aparato respiratorio transporta la secreción mucosa por el árbol traqueo bronquial, arrastrando cualquier partícula, con la finalidad de tener un buen aclaramiento mucociliar (Barto & Flume, 2010). Para que este proceso sea efectivo se necesita de un equilibrio entre mucopolisacáridos y componentes serosos; de tal manera que el moco puede deslizarse sin problema y ser eliminado a través de la superficie serosa del epitelio ciliado (Stenbit & Flume, 2008).

En los pacientes con fibrosis quística hay una alteración en la secreción mucosa debido a mutación del gen Phe508, convirtiéndola en una secreción más densa y viscosa (Turcios, 2020). Por lo tanto, hay un incremento en la reabsorción de sodio-cloro y un decrecimiento de reabsorción de agua; lo cual causa una deshidratación en la superficie de las células epiteliales, dificultando el adecuado deslizamiento del moco a través del árbol traqueo bronquial (Chapron et al., 2011).

Epidemiología

De acuerdo con el Ministerio de Salud Pública (2013) la fibrosis quística es una enfermedad frecuente en los grupos de origen caucásico con incidencias entre 1:2.500 a 1: 3.000 recién nacidos vivos (RN). En Latinoamérica la incidencia en Chile es 1:4000 RN, en Argentina es 1:4500, y en nuestro país, Ecuador, es 1:1252 RN (Ministerio de Salud Pública, 2013).

DIVERSIDAD FILOGENÉTICA DE BACTERIAS ASOCIADAS A FIBROSIS QUÍSTICA

En países desarrollados como en Norteamérica y Europa el tiempo de supervivencia actual puede superar los 40 años y estos pueden ser portadores de mutaciones consideradas leves o de bajo riesgo. En contraste, la media de sobrevivencia por fibrosis quística en Latinoamérica es variable y sus pacientes no alcanzan más allá de los 15 años de vida; en Ecuador esa media es de 9.5 años (Zurita et al., 2017).

Los pacientes inmunodeprimidos con patologías como neutropenia prolongada o fibrosis quística, que hayan tenido trasplantes de médula o que tenga una terapia con corticoides tienen alta probabilidad de invasión por hongos (Doğan et al., 2019). Para los pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica, *Aspergillus* spp. coloniza el epitelio ya que actividad ciliar es baja. Por otro lado, los linfocitos Th1 se ven suprimidos en pacientes que ingieren corticoides, de esta manera altera la producción de citoquinas de este linfocito, provocando un aumento de las células Th2 lo que contribuye con la invasión (Quinn et al., 2019).

La complicación más frecuente causada por este hongo en estos pacientes es el ABPA que se manifiesta del 6 al 25 % de niños mayores a 6 años con una función pulmonar disminuida y en pacientes menores de 6 años está asociado a la colonización de *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Candida albicans* (Green & Jones, 2015).

Con estos antecedentes se puede establecer que el pulmón de pacientes con fibrosis quística es un entorno estable y con compuestos orgánicos junto con un aclaramiento microbiano limitado, proporciona condiciones favorables para la proliferación de muchos organismos (Chapron et al., 2011). Una investigación reciente mostró que las comunidades microbianas presentes en el pulmón afectado pueden ser más complejas. Mediante el uso de medios de cultivo no selectivos para los patógenos tradicionales, se han aislado varios microorganismos atípicos, incluidas varias especies de *Bordetella*, *Ralstonia*, *Acinetobacter* y *Moraxella* (Zemanick et al., 2013).

Los estudios iniciales independientes de cultivos que utilizan polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción terminal (T-RFLP) sugirieron la presencia de una mayor diversidad

DIVERSIDAD FILOGENÉTICA DE BACTERIAS ASOCIADAS A FIBROSIS QUÍSTICA

bacteriana que la que se cultiva normalmente en pacientes. Aunque los perfiles de T-RFLP pueden dar una primera aproximación del nivel de diversidad, no permiten una clasificación inequívoca, dejando a los microorganismos presentes sin identificar (Vogelberg et al., 2003).

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR) ofrece un método independiente del cultivo para la cuantificación de bacterias que puede mejorar el diagnóstico de las infecciones de las vías respiratorias; sin embargo, se desconoce la fiabilidad de la qPCR aplicada a las muestras de las vías respiratorias con fibrosis quística (Hahn et al., 2016).

La amplificación de ácidos nucleicos de genes de ARNr 16S específicos para el dominio bacteria seguida de análisis posteriores a la amplificación utilizando perfiles de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción terminal (t-RFLP), secuenciación de Sanger o pirosecuenciación se han utilizado para caracterizar la comunidad bacteriana en muestras de vías respiratorias (Zemanick et al., 2010). Los resultados de estos estudios encuentran consistentemente una alta prevalencia de bacterias anaeróbicas dentro de una comunidad polimicrobiana complejas (Kolak et al., 2003). Las posibles aplicaciones de la qPCR en la FQ incluyen la detección y cuantificación rápidas de bacterias anaerobias potencialmente patógenas, la evaluación de la respuesta a la terapia antimicrobiana y el seguimiento de los cambios longitudinales en la microbiología de las vías respiratorias en la clínica y en ensayos clínicos (Bittar et al., 2008). Sin embargo, la confiabilidad de la qPCR aplicada a las muestras de las vías respiratorias, un paso importante en la validación del uso de la qPCR, ha recibido poca atención, particularmente con respecto a las bacterias anaerobias (Carmody et al., 2018a). Recientemente, los estudios de bibliotecas de clones de ARNr 16S de pulmones de pacientes con fibrosis describieron composiciones de comunidades variables, algunas dominadas por un solo patógeno conocido, mientras que otras contenían múltiples organismos u organismos no identificados de forma rutinaria como patógenos (Guss et al., 2011).

DIVERSIDAD FILOGENÉTICA DE BACTERIAS ASOCIADAS A FIBROSIS QUÍSTICA

Mediante la comparación de secuencias de ARNr se plantea deducir relaciones filogenéticas y evolutivas entre bacterias encontradas en estudios anteriores, identificadas y no identificadas. Estas secuencias se han derivado previamente mediante métodos que incluyen catalogación de oligonucleótidos, secuenciación de clones, secuenciación directa de ARN mediante transcriptasa inversa y secuenciación de material amplificado por PCR o qPCR (Rogers et al., 2004).

De acuerdo con lo antes señalado se plantea la siguiente pregunta de investigación:

¿Cómo es la diversidad y estructura filogenética existente en la microbiota pulmonar de pacientes con fibrosis quística? Con base en lo planteado, la hipótesis se centra en que el análisis filogenético de un grupo de bacterias seleccionadas permite generar una matriz de diagnóstico molecular con base en la variabilidad y diversidad genética.

Los datos sugieren que estos organismos encontrados dentro del sistema respiratorio son parte de un ecosistema microbiano mucho más complejo de lo que normalmente se supone. La caracterización de estas comunidades es el primer paso para dilucidar los roles potenciales de diversas bacterias en la progresión de la enfermedad y, en última instancia, facilitar los avances en la terapia de la fibrosis quística

DIVERSIDAD FILOGENÉTICA DE BACTERIAS ASOCIADAS A FIBROSIS QUÍSTICA

Materiales y Métodos

- *Selección y construcción de genotecas*

Se emplea secuencias del gen de ARNr 16S debido a que es un fragmento altamente conservado y útil para deducir relaciones filogenéticas y evolutivas entre bacterias, arqueobacterias y organismos eucarióticos (Armougom et al., 2009). Se seleccionó una base de datos a partir de un estudio previo en el que se trabajó con bacterias prevalentes identificadas en vías respiratorias de pacientes con fibrosis quística (Grahl et al., 2018).

Las secuencias se agruparon en unidades taxonómicas operativas (OTU) por $\geq 99\%$ de identidad de secuencia, y las secuencias con la suma mínima del cuadrado de las distancias entre secuencias dentro de cada grupo del 99% se utilizaron en los análisis taxonómicos y filogenéticos.

- *Recolección de secuencias de ARN 16S*

El panel de bacterias anaeróbicas se eligió en función de los datos preliminares de secuenciación del ARNr 16S de estudios que muestran que estas bacterias están presentes con frecuencia en las muestras de las vías respiratorias de la FQ durante las exacerbaciones pulmonares (Aquino et al., 2017). Se realizó la recolección las secuencias de ARN 16S utilizando la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>). Estas secuencias se editaron y recortaron manualmente a la misma longitud.

Se tomó como criterio de inclusión, secuencias de patógenos oportunistas detectados con mayor frecuencia en vías respiratorias de pacientes con fibrosis quística. Mientras que el criterio de exclusión fueron las secuencias altamente divergentes que impedían el alineamiento.

DIVERSIDAD FILOGENÉTICA DE BACTERIAS ASOCIADAS A FIBROSIS QUÍSTICA

- *Análisis y alineamiento de secuencias*

Para el análisis de las secuencias se clasificaron en 2 grupos, grupo A en el que se encontraban Proteobacterias con secuencias entre 728pb mientras que en el segundo grupo se lo nombro B y se encontraban Firmicutes y Fusobacterias con secuencias de 714pb.

Cada grupo fue analizado mediante un alineamiento múltiple con CLUSTAL W utilizando el software MEGA X con un *gap opening penalty* de 15.00 y un *gap extension penalty* de 15.00.

En el grupo A se realizó un alineamiento inicial de 1555 pb y con un corte posterior se llegó al total de 728 pb, mientras que el grupo B se obtuvo un alineamiento inicial de 1700 pb y después del corte se obtuvo un alineamiento de 714 pb.

- *Análisis filogenético*

Se seleccionó *Pseudomona fluorescens* perteneciente a la familia *Pseudomonas* como grupo externo por ser un miembro relacionado evolutivamente del grupo interno, sin embargo, conserva la suficiente cercanía para que se pueda establecer para el análisis filogenético.

Se utilizaron secuencias de ARN 16s de diferentes bacterias y se incluyeron secuencias de cultivos no identificados para establecer sus relaciones filogenéticas y su posible identificación molecular por su ubicación en los clados. Los árboles se construyeron con secuencias de referencia seleccionadas de la base de datos.

Se utilizó el programa MEGAX para la construcción de los árboles filogenéticos con los métodos de distancia como Neighbor-Joining, Maximum Parsimony e inductivo de probabilidad a priori por Maximum Likelihood. Se utilizó el remuestreo Bootstrap (1000 réplicas) para probar la robustez de las topologías inferidas.

Se aplicó Neighbor-Joining con el método de p-distance (probabilidad no corregida) mientras que en Maximum Parsimony se empleó el algoritmo de Wagner con barrido de ramas mediante Tree-Bisection and Reconnection (TBR).

DIVERSIDAD FILOGENÉTICA DE BACTERIAS ASOCIADAS A FIBROSIS QUÍSTICA

Resultados

Se muestrearon un total de 135 secuencias de la base de datos de ARN 16S con un tamaño de 718 a 1540 pb (Anexo A) (matrices de 37 secuencias x 721 pb y 970 secuencias x 714 pb correspondiente al Grupo A y Grupo B)

En el primer análisis una vez realizado el alineamiento arrojó una matriz de 37 x 741 pb, se obtuvo un árbol filogenético en el que se observan 4 grupos polifiléticos en los que principalmente se encuentran especies como *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Neisseria* y *Pasteurella*.

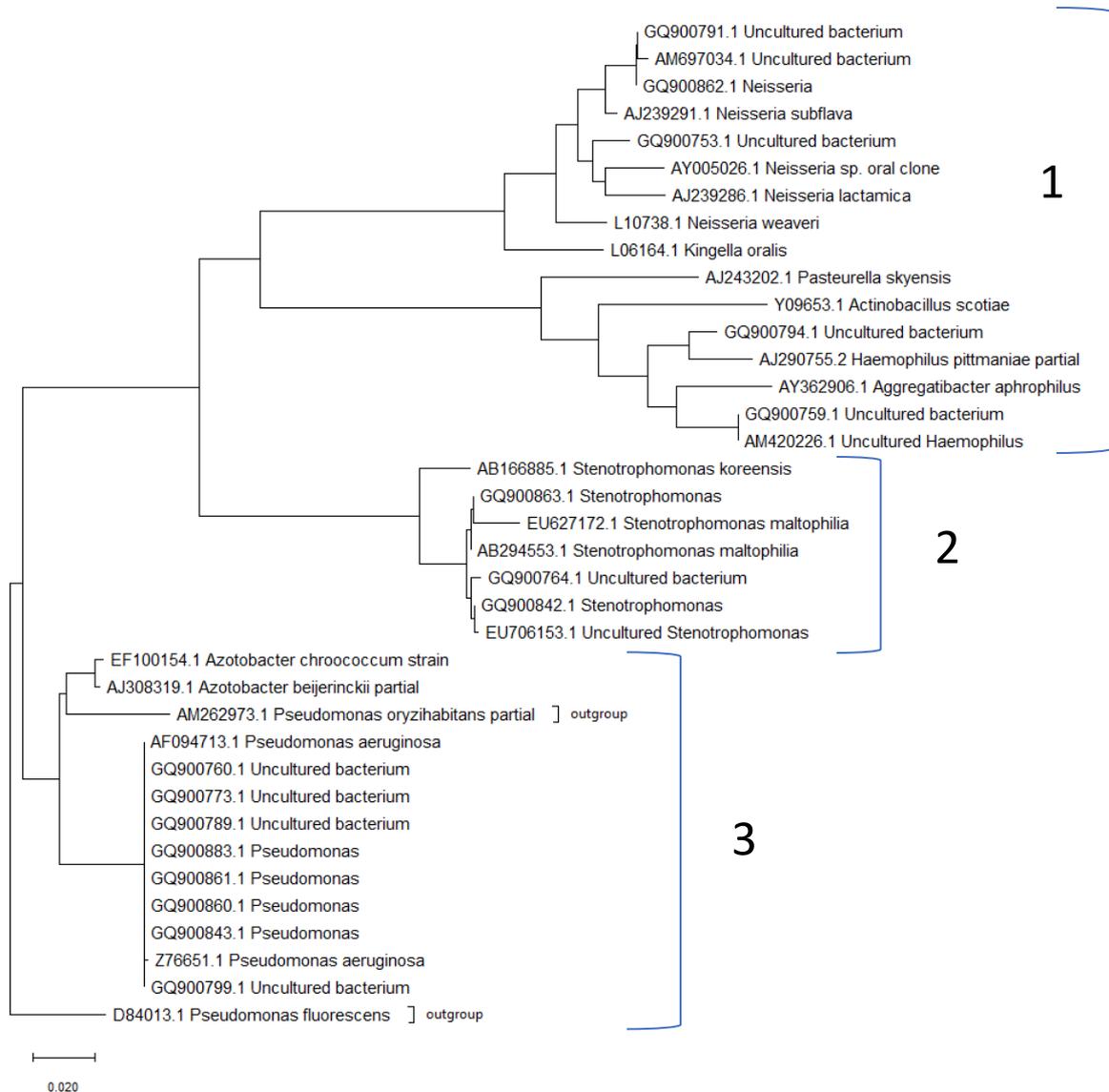
Los árboles de los tres métodos mostraron topologías similares, por lo que, los árboles finales se muestran con Maximum Parsimony (MP).

En el primer árbol (Fig. 1) se tomó como outgroup *Pseudomonas fluorescens* para enraizar el árbol, también ayudó a establecer la especie más lejanamente relacionada y verificar la monofilia de los grupos de interés o grupo interno.

La historia evolutiva se infirió utilizando el método de Maximum Parsimony con los 2 árboles más parsimoniosos (longitud = 674). El índice de consistencia (IC) fue de 0,60, el índice de retención (RI) fue 0,90 y el índice compuesto (RCI) fue 0,56 mostrando una matriz de alta homología y baja homoplasia (eventos paralelos o convergentes).

DIVERSIDAD FILOGENÉTICA DE BACTERIAS ASOCIADAS A FIBROSIS QUÍSTICA

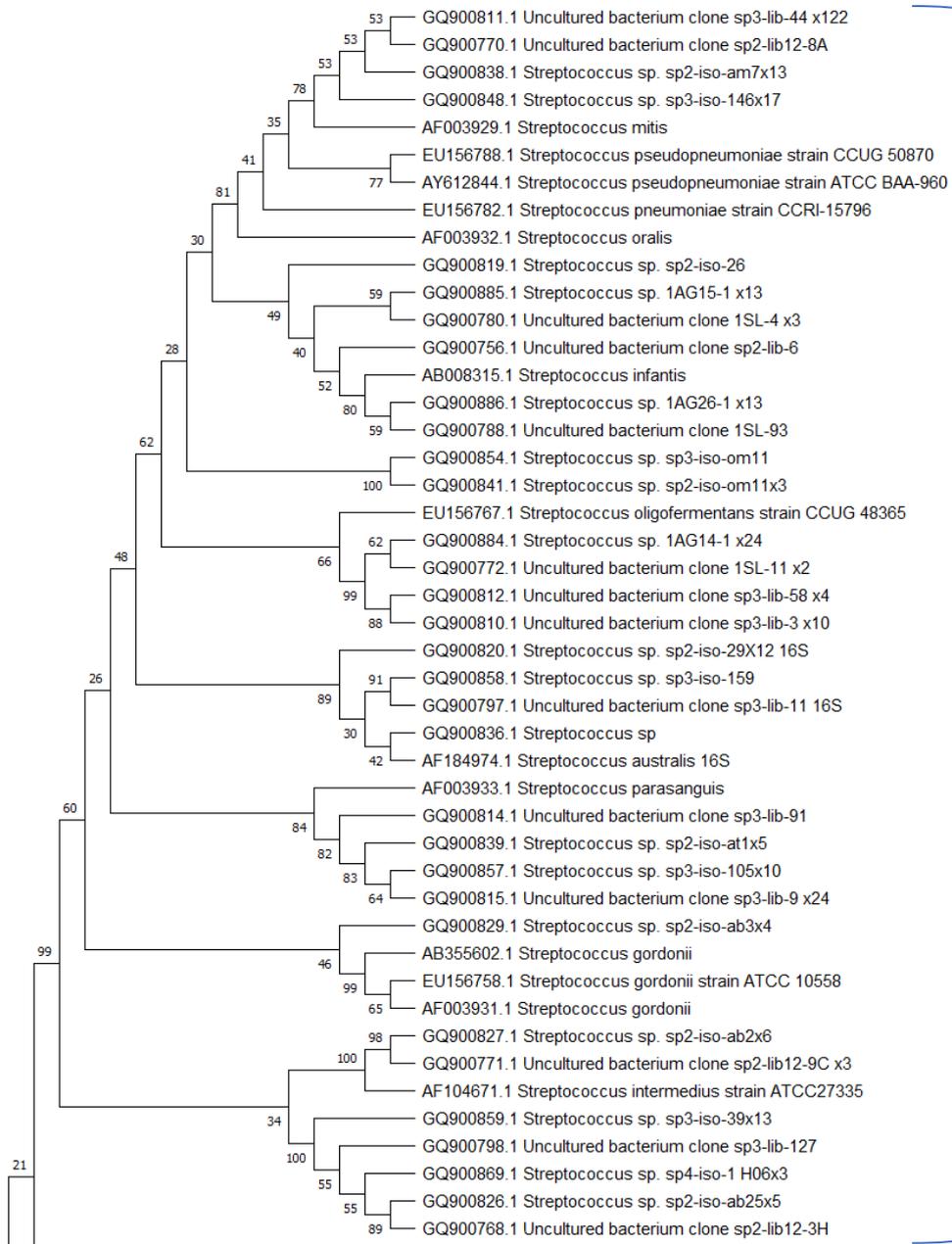
Figura 1. Árbol filogenético (Filograma) de Parsimonia Máxima, clasificado como *Proteobacterias*. Se muestra el outgroup, y los 3 clados monofiléticos de bacterias más frecuentes.



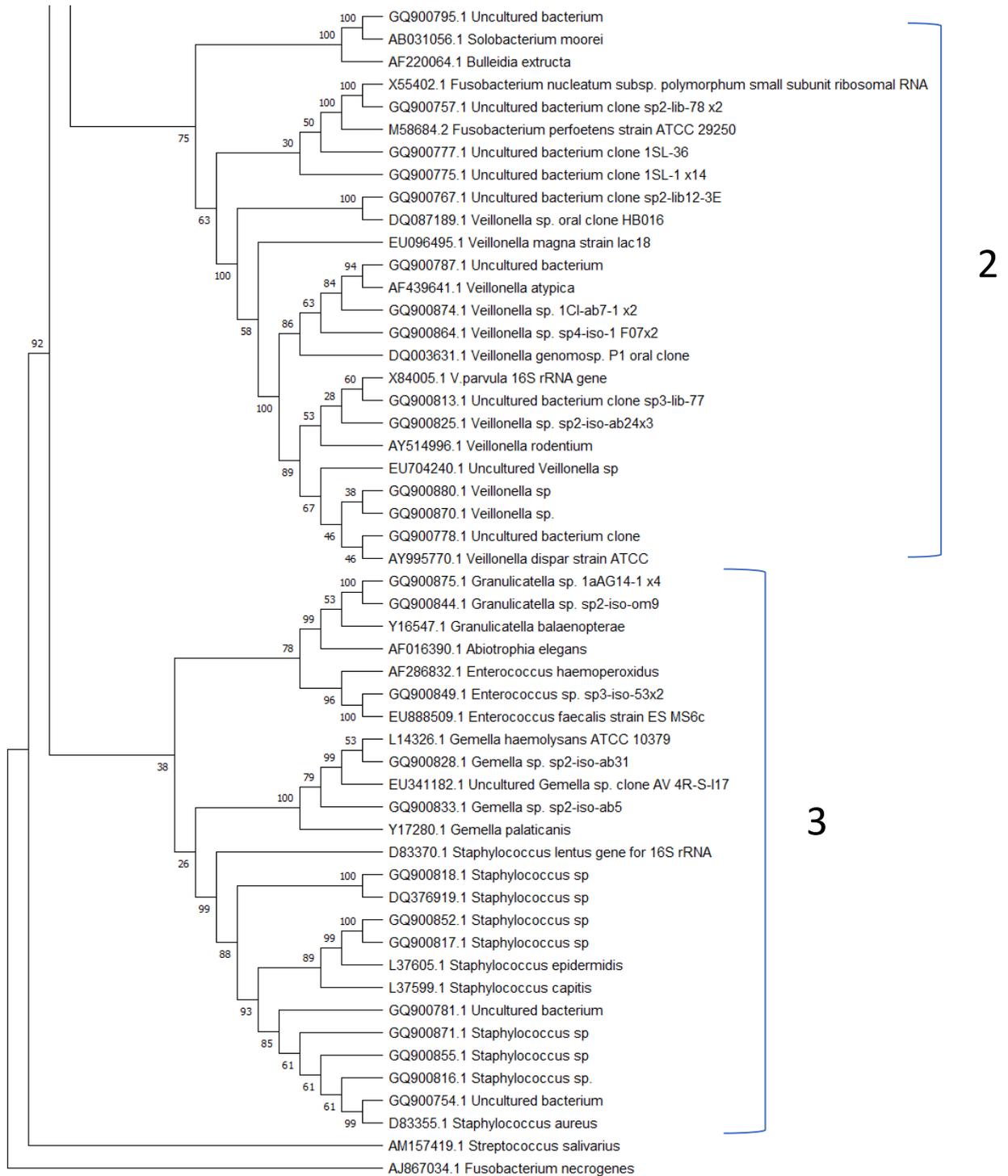
En la figura 1 del análisis filogenético de las secuencias de ARN16S permitió clasificar las diferentes bacterias obteniendo 3 clados o grupos definidos con valores de bootstrap (83%, 57%, 57%); el primer grupo corresponde a *Neisseria* spp. el segundo a *Haemophilus* spp., el tercero a *Stenotrophomonas* spp y el cuarto a *Pseudomonas* spp. En la parte inferior se colocó el grupo basal, y al grupo externo para enraizar todo el árbol.

DIVERSIDAD FILOGENÉTICA DE BACTERIAS ASOCIADAS A FIBROSIS QUÍSTICA

Figura 2. Árbol filogenético (Filograma) de Parsimonia Máxima, de Bacterias que tipo *Fusobacterium* y *Firmicutes*. Se muestra el outgroup, y 4 clados de bacterias más frecuentes.



DIVERSIDAD FILOGENÉTICA DE BACTERIAS ASOCIADAS A FIBROSIS QUÍSTICA



En la figura 2 del análisis filogenético de las secuencias de ARN16S permitió clasificar las diferentes bacterias obteniendo 3 clados o grupos definidos con valores de bootstrap (83%, 56%, 58%); el primer grupo corresponde a *Streptococcus* spp. el segundo a *Veillonella* spp., el tercero a *Staphylococcus* spp y el cuarto a *Fusobacterium* spp. En la parte inferior se ubicó el grupo basal, y al grupo externo que enraiza todo el árbol.

DIVERSIDAD FILOGENÉTICA DE BACTERIAS ASOCIADAS A FIBROSIS QUÍSTICA

Discusión

Los pulmones de pacientes con fibrosis quística albergan una población diversa de microorganismos en los que se han encontrado ocho filos bacterianos principales, que comprenden más de 60 géneros, incluidos anaerobios facultativos y obligados, bacterias de orales y patógenos oportunistas, muchos de los cuales nunca se han aislado (Layeghifard et al., 2019). Con el desarrollo de nuevas técnicas de secuenciación como la pirosecuenciación de amplicones con código de barras además de la secuenciación de la biblioteca de ARNr 16S, han demostrado que existe mayor diversidad bacteriana de la que se aísla de forma rutinaria (Graf et al., 2021).

Para el estudio de esta diversidad bacteriana se elaboró una matriz filogenética con el objetivo de analizar las secuencias del ARN16s, con los resultados de los árboles filogenéticos se puede evidenciar la variedad bacteriana como se describe a continuación.

En el clado 1 del árbol se puede observar cómo se encuentran agrupados *Neisseria* spp. y *Haemophilus* spp., este puede estar correlacionado a que las 2 bacterias durante la progresión de la enfermedad se aíslan por primera vez en años tempranos de vida o durante la primera exacerbación pulmonar. También puede estar relacionado a que, al ser parte de la microbiota oral y nasal pueden introducirse repetidamente en los pulmones de los pacientes por respiración normal o por aspiración de saliva durante la exacerbación. Con la disminución del aclaramiento del moco, estos microorganismos pueden colonizar y persistir (Parkins & Floto, 2015).

Se han reportado estos microorganismos en las cavidades oral y nasal humana, aunque no se puede excluir la posibilidad de que estos organismos se debieran a la contaminación oral (Chen et al., 2018). Dado que la expectoración del esputo del paciente con FQ ciertamente contamina la saliva de forma rutinaria, los organismos comunes a ambos entornos podrían explicarse por la contaminación del esputo por la saliva; contaminación de saliva por esputo u organismos

DIVERSIDAD FILOGENÉTICA DE BACTERIAS ASOCIADAS A FIBROSIS QUÍSTICA

similares presentes en ambos en el momento de la recolección de la muestra (Fischer et al., 2014).

Por el contrario, en el clado 2 y 3 se puede observar que corresponden a patógenos oportunistas que son asilados en infecciones crónicas y en los que ya se observa un claro deterioro pulmonar que facilita la infección (Palmer et al., 2007). Por este motivo *Stenotrophomonas* spp. y *Pseudomonas* spp. destacan como patógenos nosocomiales importantes, y particularmente notable causantes de neumonía asociada al respirador, se ha identificado fenotipos hipermutadores en cepas de colonización crónica que puede dar lugar a una heterogeneidad fenotípica significativa de la población (PG et al., 2014).

En el segundo árbol se observa como existe una gran variedad de *Streptococcus* spp. en el clado I, esto ocurre posiblemente al gran espectro de antibióticos administrados a los pacientes lo que provoca la generación de mutaciones para la resistencia a antibióticos y aumenta la diversidad bacteriana observada.

En el clado 2 se encuentra a *Veillonella* que tiene como característica principal ser una bacteria anaeróbica obligada. Aunque inicialmente puede resultar sorprendente pensar que el pulmón humano tiene nichos anaeróbicos, el moco suele ser principalmente anóxico. La difusión de O₂ a través del moco espeso es lenta y la respiración bacteriana es rápida (H et al., 2006). Por lo tanto, los sacos anaeróbicos en el pulmón con FQ sugieren que los anaerobios y microaerófilos podrían ser miembros importantes de las poblaciones microbianas pulmonares complementarias como se observa en el clado 2 (A.-O. C & CS, 2007).

Adicional a esto en el clado 3 destaca *Staphylococcus* spp. que con el tiempo se ha colocado como una de las bacterias prevalentes en los cultivos aislados con el peligro de formar resistencias y mutar en *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina el cual, su complicación no solo radica en la resistencia al grupo de antibióticos, también es más resistente a la desecación y puede persistir en objetos inanimados y fómites, lo que hace posible la

DIVERSIDAD FILOGENÉTICA DE BACTERIAS ASOCIADAS A FIBROSIS QUÍSTICA

transmisión paciente-intermediario-paciente, algo que no se observa comúnmente con los patógenos clásicos de la fibrosis quística (EA et al., 2014).

Se sabe que muchos de los géneros presentes en los árboles como *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Veillonella* producen lactato como producto final de fermentación. En particular, *Veillonella* se caracteriza por la capacidad de consumir lactato anaeróbicamente para el crecimiento (S. S et al., 2002), lo que sugiere que estos organismos podrían interactuar metabólicamente entre clados con bacterias productoras de lactato en la comunidad microbiana pulmonar de la FQ.

El deterioro del paciente con fibrosis quística es en gran parte un efecto indirecto de la infección; el daño pulmonar es predominantemente el resultado de una respuesta inflamatoria crónica (Jorth et al., 2019). Por tanto, las diversas bacterias detectadas, incluidos los organismos no cultivados, pueden contribuir a la respuesta inflamatoria. Aunque se ha interpretado que estos datos significan que la patología de la fibrosis contiene un componente inmunitario adicional, una explicación alternativa es que las bacterias no cultivadas infectan el pulmón en una etapa temprana de la vida (Zhao et al., 2021).

Conclusiones

El análisis filogenético del ARN16s de las bacterias prevalentes en pacientes con fibrosis quística generó una matriz que muestra una alta variabilidad de filotipos, desde microorganismos patógenos, oportunistas hasta bacterias del microbiota habitual que pueden ser causante de colonizaciones.

En el árbol A se observa una clara relación en cuanto a bacterias oportunistas que empieza como una colonización hasta llegar a una infección crónica que termina en un colapso total de la función pulmonar debido a las exacerbaciones.

DIVERSIDAD FILOGENÉTICA DE BACTERIAS ASOCIADAS A FIBROSIS QUÍSTICA

En el árbol B se observa como este grupo de bacterias pueden utilizar metabolitos de degradación entre sí, lo que provoca una interacción metabólica que promueve la infección crónica.

El uso de este tipo de herramienta filogenéticas es un complemento en la identificación molecular que puede ser usado para verificar la presencia de cultivos polimicrobianos que puedan estar causando las infecciones crónicas y de esta manera establecer un tratamiento oportuno.

La secuenciación y el énfasis de caracterización de bacterias y comunidades e interacciones microbianas complejas en lugar de un monocultivo, podría conducir a una mejor comprensión de las repercusiones clínicas que tienen varias bacterias en la progresión de la fibrosis quística y puede facilitar avances en el tratamiento.

Agradecimientos

Universidad Internacional SEK y a su cuerpo docente por la ayuda para el desarrollo de este trabajo de investigación.

Referencias

- AC, B., & VJ, W. (2019). Microbiology of Cystic Fibrosis Airway Disease. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 40(6), 727–736. <https://doi.org/10.1055/S-0039-1698464>
- Acosta, N., Heirali, A., Somayaji, R., Surette, M. G., Workentine, M. L., Sibley, C. D., Rabin, H. R., & Parkins, M. D. (2018). Sputum microbiota is predictive of long-term clinical outcomes in young adults with cystic fibrosis. *Thorax*, 73(11), 1016–1025. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2018-211510>
- Alfaresi, M., & Mahboub, B. (2018). Identification of Bacteria in the Sputum of a Cystic Fibrosis patient; A Comparison of Phenotypic and Molecular Methods. *The Open Microbiology Journal*, 11(1), 384–386. <https://doi.org/10.2174/1874285801711010384>
- Aquino, R., Gonzáles, E., Samaniego, S., Rivera, J., Cedeño, V., Urbina, Y., & Diringer, B. (2017). Molecular characterization of pathogenic bacteria of the respiratory tract in Peruvian patients with cystic fibrosis. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 34(3), 423–435. <https://doi.org/10.17843/RPMESP.2017.343.2529>

DIVERSIDAD FILOGENÉTICA DE BACTERIAS ASOCIADAS A FIBROSIS QUÍSTICA

- Armougom, F., Bittar, F., Stremmer, N., Rolain, J. M., Robert, C., Dubus, J. C., Sarles, J., Raoult, D., & la Scola, B. (2009). Microbial diversity in the sputum of a cystic fibrosis patient studied with 16S rDNA pyrosequencing. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 28(9), 1151–1154. <https://doi.org/10.1007/S10096-009-0749-X>
- B, G., & PA, F. (2019). Pulmonary Complications of Cystic Fibrosis. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 40(6), 804–809. <https://doi.org/10.1055/S-0039-1697639>
- Barrett, S. L. R., Holmes, E. A., Long, D. R., Shean, R. C., Bautista, G. E., Ravishankar, S., Peddu, V., Cookson, B. T., Singh, P. K., Greninger, A. L., & Salipante, S. J. (2020). Cell free DNA from respiratory pathogens is detectable in the blood plasma of Cystic Fibrosis patients. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-020-63970-0>
- Barto, T. L., & Flume, P. A. (2010). Treatment of pulmonary exacerbations in adult cystic fibrosis patients: a review. *Hospital Practice (1995)*, 38(1), 26–34. <https://doi.org/10.3810/HP.2010.02.287>
- Bhattacharyya, R. P., Walker, M., Boykin, R., Son, S. S., Liu, J., Hachey, A. C., Ma, P., Wu, L., Choi, K., Cummins, K. C., Benson, M., Skerry, J., Ryu, H., Wong, S. Y., Goldberg, M. B., Han, J., Pierce, V. M., Cosimi, L. A., Shores, N., ... Hung, D. T. (2019). Rapid identification and phylogenetic classification of diverse bacterial pathogens in a multiplexed hybridization assay targeting ribosomal RNA. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-019-40792-3>
- Bittar, F., Richet, H., Dubus, J. C., Reynaud-Gaubert, M., Stremmer, N., Sarles, J., Raoult, D., & Rolain, J. M. (2008). Molecular detection of multiple emerging pathogens in sputa from cystic fibrosis patients. *PLoS ONE*, 3(8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0002908>
- C, A.-O., & CS, H. (2007). Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to low oxygen indicate that growth in the cystic fibrosis lung is by aerobic respiration. *Molecular Microbiology*, 65(1), 153–165. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2007.05772.X>
- C, B., & AM, C. (2019). Cystic Fibrosis: Pathophysiology of Lung Disease. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 40(6), 715–726. <https://doi.org/10.1055/S-0039-1694021>
- Carmody, L. A., Caverly, L. J., Foster, B. K., Rogers, M. A. M., Kalikin, L. M., Simon, R. H., VanDevanter, D. R., & LiPuma, J. J. (2018a). Fluctuations in airway bacterial communities associated with clinical states and disease stages in cystic fibrosis. *PLoS ONE*, 13(3). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0194060>
- Carmody, L. A., Caverly, L. J., Foster, B. K., Rogers, M. A. M., Kalikin, L. M., Simon, R. H., VanDevanter, D. R., & LiPuma, J. J. (2018b). Fluctuations in airway bacterial communities associated with clinical states and disease stages in cystic fibrosis. *PLoS ONE*, 13(3).
- Chapron, J., Zuber, B., Kanaan, R., Hubert, D., Desmazes-Dufeu, N., Mira, J. P., Dusser, D., & Burgel, P. R. (2011). Management of acute and severe complications in adults with cystic fibrosis. *Revue Des Maladies Respiratoires*, 28(4), 503–516. <https://doi.org/10.1016/J.RMR.2010.11.002>
- Chen, S. C. A., Meyer, W., & Pashley, C. H. (2018). Challenges in Laboratory Detection of Fungal Pathogens in the Airways of Cystic Fibrosis Patients. *Mycopathologia*, 183(1), 89–100. <https://doi.org/10.1007/s11046-017-0150-8>

DIVERSIDAD FILOGENÉTICA DE BACTERIAS ASOCIADAS A FIBROSIS QUÍSTICA

- Chmiel, J. F., Aksamit, T. R., Chotirmall, S. H., Dasenbrook, E. C., Elborn, J. S., LiPuma, J. J., Ranganathan, S. C., Waters, V. J., & Ratjen, F. A. (2014). Antibiotic management of lung infections in cystic fibrosis: I. The microbiome, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, gram-negative bacteria, and multiple infections. *Annals of the American Thoracic Society*, *11*(7), 1120–1129. <https://doi.org/10.1513/ANNALSATS.201402-050AS>
- D, G., & CL, R. (2019). Review of Cystic Fibrosis. *Pediatric Annals*, *48*(4), e154–e161. <https://doi.org/10.3928/19382359-20190327-01>
- Doğan, Ö., Tunçkanat, F., Cinel, G., Şener, B., Özçelik, H. U., Yalçın, E. E., Doğru Ersöz, D., & Nural Kiper, E. (2019). Investigation of role of anaerobic bacteria in cystic fibrosis patients. *Tuberkuloz ve Toraks*, *67*(3), 151–161. <https://doi.org/10.5578/TT.68358>
- Felton, I. C., & Simmonds, N. J. (2014). Aspergillus and cystic fibrosis: old disease - new classifications. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, *20*(6), 632–638. <https://doi.org/10.1097/MCP.000000000000106> [doi]
- Fischer, J., van Koningsbruggen-Rietschel, S., Rietschel, E., Vehreschild, M. J. G. T., Wisplinghoff, H., Krönke, M., & Hamprecht, A. (2014). Prevalence and molecular characterization of azole resistance in *Aspergillus* spp. isolates from German cystic fibrosis patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *69*(6), 1533–1536. <https://doi.org/10.1093/jac/dku009>
- Foweraker, J. (2009). Recent advances in the microbiology of respiratory tract infection in cystic fibrosis. *British Medical Bulletin*, *89*(1), 93–110. <https://doi.org/10.1093/BMB/LDN050>
- Gilligan, P. H. (2014). Infections in patients with cystic fibrosis: Diagnostic microbiology update. *Clinics in Laboratory Medicine*, *34*(2), 197–217. <https://doi.org/10.1016/J.CLL.2014.02.001>
- Govan, J. R. W., Brown, A. R., & Jones, A. M. (2007). Evolving epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* and the *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis lung infection. *Future Microbiology*, *2*(2), 153–164. <https://doi.org/10.2217/17460913.2.2.153>
- Graf, A. C., Striesow, J., Pané-Farré, J., Sura, T., Wurster, M., Lalk, M., Pieper, D. H., Becher, D., Kahl, B. C., & Riedel, K. (2021). An Innovative Protocol for Metaproteomic Analyses of Microbial Pathogens in Cystic Fibrosis Sputum. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2021.724569>
- Grahl, N., Dolben, E. L., Filkins, L. M., Crocker, A. W., Willger, S. D., Morrison, H. G., Sogin, M. L., Ashare, A., Gifford, A. H., Jacobs, N. J., Schwartzman, J. D., & Hogan, D. A. (2018). Profiling of Bacterial and Fungal Microbial Communities in Cystic Fibrosis Sputum Using RNA. *MSphere*, *3*(4). <https://doi.org/10.1128/MSPHERE.00292-18>
- Granchelli, A. M., Adler, F. R., Keogh, R. H., Kartsonaki, C., Cox, D. R., & Liou, T. G. (2018). Microbial interactions in the cystic fibrosis airway. *Journal of Clinical Microbiology*, *56*(8).
- Green, H., & Jones, A. M. (2015). The microbiome and emerging pathogens in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis bronchiectasis. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, *36*(2), 225–235. <https://doi.org/10.1055/S-0035-1546752>
- Guss, A. M., Roeselers, G., Newton, I. L. G., Young, C. R., Klepac-Ceraj, V., Lory, S., & Cavanaugh, C. M. (2011). Phylogenetic and metabolic diversity of bacteria associated with cystic fibrosis. *ISME Journal*, *5*(1), 20–29. <https://doi.org/10.1038/ISMEJ.2010.88>

DIVERSIDAD FILOGENÉTICA DE BACTERIAS ASOCIADAS A FIBROSIS QUÍSTICA

- H, M., VE, W., DB, H., UE, S., TD, R., B, B., RM, T., R, S., M, R., BH, I., & RC, B. (2006). A physical linkage between cystic fibrosis airway surface dehydration and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(48), 18131–18136. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0606428103>
- Hahn, A., Sanyal, A., Perez, G. F., Colberg-Poley, A. M., Campos, J., Rose, M. C., & Pérez-Losada, M. (2016). Different next generation sequencing platforms produce different microbial profiles and diversity in cystic fibrosis sputum. *Journal of Microbiological Methods*, 130, 95–99. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2016.09.002>
- Jorth, P., Ehsan, Z., Rezayat, A., Caldwell, E., Pope, C., Brewington, J. J., Goss, C. H., Benschoter, D., Clancy, J. P., & Singh, P. K. (2019). Direct Lung Sampling Indicates That Established Pathogens Dominate Early Infections in Children with Cystic Fibrosis. *Cell Reports*, 27(4), 1190-1204.e3. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2019.03.086>
- JS, E. (2016). Cystic fibrosis. *Lancet (London, England)*, 388(10059), 2519–2531. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00576-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00576-6)
- Kolak, M., Karpati, F., Monstein, H. J., & Jonasson, J. (2003). Molecular typing of the bacterial flora in sputum of cystic fibrosis patients. *International Journal of Medical Microbiology*, 293(4), 309–317. <https://doi.org/10.1078/1438-4221-00265>
- Layeghifard, M., Li, H., Wang, P. W., Donaldson, S. L., Coburn, B., Clark, S. T., Caballero, J. D., Zhang, Y., Tullis, D. E., Yau, Y. C. W., Waters, V., Hwang, D. M., & Guttman, D. S. (2019). Microbiome networks and change-point analysis reveal key community changes associated with cystic fibrosis pulmonary exacerbations. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/S41522-018-0077-Y>
- Martínez, D. M. (2001). *Fibrosis quística en Ecuador*. 3321.
- Ministerio de Salud Pública. (2013). *Fibrosis quística*. www.salud.gob.ec
- Palmer, K. L., Aye, L. M., & Whiteley, M. (2007). Nutritional Cues Control *Pseudomonas aeruginosa* Multicellular Behavior in Cystic Fibrosis Sputum. *Journal of Bacteriology*, 189(22), 8079. <https://doi.org/10.1128/JB.01138-07>
- Parkins, M. D., & Floto, R. A. (2015). Emerging bacterial pathogens and changing concepts of bacterial pathogenesis in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, 14(3), 293–304. <https://doi.org/10.1016/J.JCF.2015.03.012>
- Psoter, K. J., de Roos, A. J., Wakefield, J., Mayer, J. D., & Rosenfeld, M. (2017). Seasonality of acquisition of respiratory bacterial pathogens in young children with cystic fibrosis. *BMC Infectious Diseases*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/S12879-017-2511-9>
- Quinn, R. A., Adem, S., Mills, R. H., Comstock, W., Deright Goldasich, L., Humphrey, G., Aksenov, A. A., Melnik, A. v., da Silva, R., Ackermann, G., Bandeira, N., Gonzalez, D. J., Conrad, D., O'Donoghue, A. J., Knight, R., & Dorrestein, P. C. (2019). Neutrophilic proteolysis in the cystic fibrosis lung correlates with a pathogenic microbiome. *Microbiome*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/S40168-019-0636-3>

DIVERSIDAD FILOGENÉTICA DE BACTERIAS ASOCIADAS A FIBROSIS QUÍSTICA

- Renders, N., Verbrugh, H., & van Belkum, A. (2001). Dynamics of bacterial colonisation in the respiratory tract of patients with cystic fibrosis. *Infection, Genetics and Evolution*, 1(1), 29–39. [https://doi.org/10.1016/S1567-1348\(01\)00004-1](https://doi.org/10.1016/S1567-1348(01)00004-1)
- Rogers, G. B., Carroll, M. P., Serisier, D. J., Hockey, P. M., Jones, G., & Bruce, K. D. (2004). Characterization of bacterial community diversity in cystic fibrosis lung infections by use of 16S ribosomal DNA terminal restriction fragment length polymorphism profiling. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(11), 5176–5183. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.11.5176-5183.2004>
- S, C., J, S., & AL, S. (2018). Cystic fibrosis survival: the changing epidemiology. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 24(6), 574–578. <https://doi.org/10.1097/MCP.0000000000000520>
- S, S., PH, J., & B, S. (2002). Energetics and kinetics of lactate fermentation to acetate and propionate via methylmalonyl-CoA or acrylyl-CoA. *FEMS Microbiology Letters*, 211(1), 65–70. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2002.TB11204.X>
- Stenbit, A., & Flume, P. A. (2008). Pulmonary complications in adult patients with cystic fibrosis. *American Journal of the Medical Sciences*, 335(1), 55–59. <https://doi.org/10.1097/MAJ.0B013E31815D2611>
- Turcios, N. L. (2020). Cystic fibrosis lung disease: An overview. *Respiratory Care*, 65(2), 233–251. <https://doi.org/10.4187/RESPCARE.06697>
- Vogelberg, C., Hirsch, T., Rösen-Wolff, A., Kerkmann, M. L., & Leupold, W. (2003). Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia cepacia cannot be detected by PCR in the breath condensate of patients with cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonology*, 36(4), 348–352. <https://doi.org/10.1002/PPUL.10352>
- Zemanick, E. T., Harris, J. K., Wagner, B. D., Robertson, C. E., Sagel, S. D., Stevens, M. J., Accurso, F. J., & Laguna, T. A. (2013). Inflammation and Airway Microbiota during Cystic Fibrosis Pulmonary Exacerbations. *PLoS ONE*, 8(4).
- Zemanick, E. T., Wagner, B. D., Sagel, S. D., Stevens, M. J., Accurso, F. J., & Kirk Harris, J. (2010). Reliability of quantitative real-time PCR for bacterial detection in cystic fibrosis airway specimens. *PLoS ONE*, 5(11). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0015101>
- Zhao, C. Y., Hao, Y., Wang, Y., Varga, J. J., Stecenko, A. A., Goldberg, J. B., & Brown, S. P. (2021). Microbiome Data Enhances Predictive Models of Lung Function in People With Cystic Fibrosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 223(3), S246–S256. <https://doi.org/10.1093/INFDIS/JIAA655>
- Zurita, J., Denning, D. W., Paz-y-Miño, A., Solís, M. B., & Arias, L. M. (2017). Serious fungal infections in Ecuador. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 36(6), 975–981. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-2928-5>