

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**ESCUELA DE CIENCIAS DE LA SALUD**  
**CARRERA DE LABORATORIO CLINICO**



**APLICACIÓN DE LA SECUENCIACIÓN MASIVA PARA DETECCIÓN DE MECANISMOS  
DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS BACTERIANOS DE LA FAMILIA  
ENTEROBACTERIACEAE EN EL MES DE JULIO 2023.**

Presentado por:

**ERICK ALEXANDER MEDINA VÁSQUEZ**

Para optar el grado de:

**LICENCIADO EN LABORATORIO CLINICO**

Asesor:

**LICDA. DELMY PATRICIA PINEDA DE SORIANO**

Ciudad universitaria “Dr Fabio Castillo Figueroa”, El Salvador, agosto, 2023.

**AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**Rector**

*Msc. Roger Armando Arias*

**Vicerrector Académico**

*PhD. Raúl Ernesto Azcúnaga López*

**Vicerrector Administrativo**

*Ing. Juan Rosa Quintanilla*

**Secretario General**

*Ing. Francisco Antonio Alarcón*

## **AUTORIDADES DE LA FACULTAD DE MEDICINA**

### **Decana**

*MsC. Josefina Sibrian de Rodríguez*

### **Vicedecanato**

*Dr. Saúl Díaz Peña*

### **Secretaria**

*MsC. Aura Marina Miranda de Arce*

### **Director de Escuela**

*MsC. José Eduardo Zepeda Avelino*

### **Directora de Carrera**

*Msp. Miriam Cecilia Recinos de Barrera*

## RESUMEN

Las Enterobacteriaceae son un grupo heterogéneo y extenso de bacilos gramnegativos cuyo hábitat natural es el intestino del ser humano y de los animales. Los mecanismos de resistencia más comunes son a los  $\beta$ -lactámicos que involucran la hidrólisis mediada por las enzimas  $\beta$ -lactamasas, lo que resulta en la inactivación del antibiótico. El grupo ESBL, que puede hidrolizar todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos excepto los carbapenémicos, comprende el grupo más grande y predominante.

La secuenciación masiva, engloba toda una generación de secuenciadores que utilizan diferentes tecnologías, estrategias y aproximaciones, cuya característica común es su habilidad para llevar a cabo de forma simultánea millones de reacciones de secuenciación en paralelo en un tiempo relativamente corto.

En las últimas décadas, se ha constatado un notable aumento de la resistencia a muchos de los antibióticos disponibles. De forma natural, los microorganismos presentan resistencia a algunos antibióticos, pudiendo incrementar su perfil de resistencia mediante la adquisición y selección de mutaciones puntuales, deleciones o inserciones en su cromosoma y/o mediante la adquisición horizontal de determinantes de resistencia a los antibióticos. La resistencia a los antibióticos está, en general, codificada en el genoma bacteriano, por lo que la aplicación de la secuenciación masiva tiene el potencial teórico de predecir el fenotipo de resistencia en un microorganismo dado, donde se han explorado diferentes estrategias para predecir la resistencia en base al genotipo.

Existe una serie de recursos para la detección y caracterización de genes y mecanismos relacionados con la resistencia antibiótica. Estos recursos están enfocados a la detección de determinantes de resistencia adquiridos por vía horizontal, aunque algunos de ellos también incluyen discretas colecciones de mutaciones cromosómicas relacionadas con la resistencia a los

antibióticos. Estos recursos utilizan distintas herramientas de análisis, y su elección se da por el tipo de análisis y de la disponibilidad de recursos computacionales.

Palabras claves:  $\beta$ -lactamasas, Secuenciación masiva, Resistencia, Genoma.

## **ABSTRACT**

Enterobacteriaceae are a heterogeneous and extensive group of gram-negative bacilli whose natural habitat is the gut of humans and animals. The most common resistance mechanisms are to  $\beta$ -lactams involving hydrolysis mediated by  $\beta$ -lactamase enzymes, resulting in inactivation of the antibiotic. The ESBL group, which can hydrolyse all  $\beta$ -lactam antibiotics except carbapenems, comprises the largest and most predominant group.

Mass sequencing, which encompasses a whole generation of sequencers using different technologies, strategies and approaches, whose common feature is their ability to simultaneously carry out millions of sequencing reactions in parallel in a relatively short time.

In recent decades, there has been a marked increase in resistance to many of the available antibiotics. Microorganisms are naturally resistant to some antibiotics and can increase their resistance profile through the acquisition and selection of point mutations, deletions or insertions in their chromosome and/or through the horizontal acquisition of antibiotic resistance determinants. Antibiotic resistance is, in general, encoded in the bacterial genome, so the application of mass sequencing has the theoretical potential to predict the resistance phenotype in a given microorganism, where different strategies have been explored to predict resistance based on genotype.

A number of resources exist for the detection and characterisation of genes and mechanisms related to antibiotic resistance. These resources are focused on the detection of horizontally acquired resistance determinants, although some of them also include discrete collections of chromosomal

mutations related to antibiotic resistance. These resources use different analysis tools, and their choice is determined by the type of analysis and the availability of computational resources.

Keywords:  $\beta$ -lactamases, Massive sequencing, Resistance, Genome.

## I. INTRODUCCIÓN

La familia Enterobacteriaceae, son bacilos Gram negativos y se caracterizan por ser fermentadores de azúcares, este grupo de microorganismos han generado un gran problema en cuanto a la resistencia a los antimicrobianos es especies que son de importancia clínica y dicha problemática es a nivel global. Donde el consumo masivo de antibióticos en los últimos años ha generado un ambiente favorable al desarrollo de la resistencia. Tales desarrollos de resistencia se han generado por ciertos mecanismos principalmente los betalactámicos, y los fluorocinolonas, los cuales se han generado debido a la existencia de elementos móviles transmisibles los cuales son plásmidos, transposones e integrones, lo que nos genera una resistencia antimicrobiana adquirida, a su vez existen especies que presentan resistencia de una manera natural.

El objetivo en este ensayo es dar a conocer el funcionamiento de la secuenciación masiva para la detección de bacterias resistentes, especialmente en aquellas que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, esto, mediante diferentes estrategias de amplificación y secuenciación el cual conlleva el codificar el genoma de la bacteria y de esta forma encontrar la resistencia en base al genotipo la cual se logra mediante ayuda de recursos bioinformáticos.

La secuenciación masiva es una generación de secuenciadores que utilizan diferentes tecnologías y estrategias, contienen como característica común la habilidad para llevar a cabo de forma simultánea millones de reacciones de secuenciación en paralelo, en un tiempo relativamente corto.

Actualmente, se da el uso de la secuenciación del genoma completo como herramienta de diagnóstico microbiológico y se ha enfocado mayoritariamente en el estudio de especies bacterianas, donde en las últimas décadas, se ha constatado un notable aumento de la resistencia a muchos de los antibióticos, así como un incremento en el número de microorganismos

multirresistentes, el cual representa uno de los grandes desafíos de la salud pública. La resistencia a los antibióticos está, en general, codificada en el genoma, por lo que la aplicación de la secuenciación masiva tiene el potencial de predecir el fenotipo de resistencia en un microorganismo dado.

Los recursos bioinformáticos son herramientas de análisis que ayudan a la detección del mecanismo de resistencia en el cual se emplea en base a la metodología a utilizar y disponibilidad de recursos computacionales.



## CONTENIDOS

AUTORIDADES DE UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR.....	ii
AUTORIDADES DE FACULTAD DE MEDICINA.....	iii
RESUMEN .....	iv
INTRODUCCIÓN.....	vii
DESARROLLO.....	1
CONCLUSIONES.....	10
FUENTES DE INFORMACIÓN .....	11

## II. DESARROLLO

La resistencia bacteriana a los antibióticos es un problema de salud mundial que se encuentra en constante evolución. De manera frecuente se reportan nuevos mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos, frecuentemente en las bacterias Gram negativas correspondientes al tipo de enterobacterias. La presencia de resistencia antimicrobiana en una bacteria causante de infección disminuye las posibilidades de obtener la curación clínica y la erradicación bacteriológica, esto conlleva al incremento de los costos del tratamiento, la morbilidad y la mortalidad; por lo que es importante seleccionar el tratamiento adecuado, minimizando los costos a las instituciones de salud.

Las enterobacterias producen una gran variedad de enfermedades en los humanos, estas pueden clasificarse en dos grupos, primeramente los patógenos primarios los cuales están implicados en procesos gastrointestinales, entre ellas podemos mencionar a *Salmonella*, *Shigella*, y algunas cepas de *Escherichia coli*, y luego están las enterobacterias oportunistas las cuales a menudo son intrahospitalaria, y se producen principalmente en pacientes con alteraciones de las defensas orgánicas, y estas pueden ocasionar infecciones, entre ellas bacteriemias, infecciones de las heridas quirúrgicas, infecciones de los catéteres vasculares e infecciones respiratorias o urinarias las cuales llegan a manifestarse en forma de neumonía, cistitis o pielonefritis y que pueden progresar a abscesos pulmonares, empiema, bacteriemia y sepsis, entre estas están *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Serratia*, el aumento de estos casos que se ven implicadas a esta familia de bacterias, se ha vuelto difícil de tratar debido a la multirresistencia que estos han adquirido, principalmente por el abuso de antibióticos (Bush, LM, 2022).

Por lo tanto este ensayo tiene como finalidad el describir los mecanismos principales que conllevan a las bacterias pertenecientes de la familia Enterobacteriaceae a adquirir resistencia a los principales antibióticos con los que suelen tratarse, y como una nueva tecnología llamada secuenciación masiva puede llegar a detectar el fenotipo de resistencia de un microorganismo mediante distintas plataformas o estrategias de secuenciación en donde previamente se realiza la amplificación que consiste en la fragmentación del ADN luego de eso, la secuenciación se ayuda de diferentes recursos informáticos que están enfocados a la detección de determinantes de resistencia adquiridos, y que para ello, utilizan distintas herramientas de análisis. Esta es una tecnología reciente que poco a poco se ha extendido su uso, debido a la universalidad que presenta por lo cual, se posiciona como herramienta de diagnóstico en el futuro.

### **¿QUE SON LAS ENTEROBACTERIACEAE?**

Las Enterobacteriaceae son un grupo heterogéneo y extenso de bacilos gramnegativos cuyo hábitat natural es el intestino del ser humano y de los animales. La familia comprende muchos géneros (*Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus* y otros más). Las Enterobacteriaceae son anaerobios o aerobios facultativos, fermentan una amplia gama de hidratos de carbono, poseen una estructura antigénica compleja y producen diversas toxinas y diversos factores de virulencia (Jawetz, 2010).

### **MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIOTICOS EN ENTEROBACTERIAS**

En los últimos años, se ha dado los aislamientos clínicos de enterobacterias resistentes a múltiples antibióticos, la cual está definido por distintos mecanismos entre ellos el más frecuente son los  $\beta$ -lactámicos el cual contiene cuatro grupos principales y que se diferencian por un sustrato específico, seguido de las fluroquinolonas y que en el transcurso de los años esta problemática ha

ido en incremento debido a al uso descontrolado de antibióticos por parte de las personas, quienes lo usan sin consulta médica previa, es decir, sin receta médica, se adquiere en cualquier farmacia, y sin la dosificación adecuada contribuyen a la resistencia bacteriana, por lo que debería ser algo controlado de parte de las autoridades sanitarias.

Las infecciones por Enterobacteriaceae generalmente se tratan con antibióticos  $\beta$ -lactámicos, y la resistencia antimicrobiana a estas moléculas se han convertido en un gran problema. Por lo tanto, los mecanismos de resistencia más comunes son a los  $\beta$ -lactámicos que involucran la hidrólisis mediada por las enzimas  $\beta$ -lactamasas, lo que resulta en la inactivación del antibiótico.

Con base en las especificidades del sustrato, se pueden identificar cuatro grupos principales de  $\beta$ -lactamasas: penicilinasas, cefalosporinasas tipo AmpC,  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (ESBL) y carbapenemasas. El grupo ESBL, que puede hidrolizar todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos excepto los carbapenémicos, comprende el grupo más grande y predominante. No obstante, esto ha llevado a un aumento en el uso de carbapenémicos y posteriormente a un aumento de la resistencia antimicrobiana a este grupo de antibióticos. Esto es un problema ya que los carbapenémicos normalmente se usan como una opción de último recurso para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias con resistencia (Rood, IGH, 2017).

Otro mecanismo de resistencia que presentan las enterobacterias son las fluoroquinolonas se basa en la inhibición de las topoisomerasas, la topoisomerasa II o ADN girasa y la topoisomerasa IV, las cuales son mutaciones que afectan las porinas o el lipopolisacárido, impidiendo la penetración del antimicrobiano al interior de la bacteria; y/o la presencia de bombas de expulsión que expulsan el antimicrobiano hacia su exterior (Jiménez. A, 2011).

Los mecanismos antes mencionados son los que conllevan a una resistencia adquirida las cuales se generan por genes que codifican la resistencia a los antimicrobianos y se pueden encontrar en el cromosoma, pero se encuentran principalmente en una variedad de elementos genéticos móviles transmisibles, como son los plásmidos, transposones e integrones. Lo cual han generado gran preocupación debido a que han llevado a la aparición de bacterias que muestran resistencia a gran parte de los antibióticos.

Ahora bien, las enterobacterias aparte de contener resistencia adquirida, poseen resistencia natural, en el siguiente cuadro se mencionan las de importancia médica.

Especies	AMP	AMC	TIC	CIG	FOX	CXM	GEN	TET	COL	NIT
<i>Citrobacter freundii</i>	R	R		R	R					
<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R		R	R					
<i>Hafnia alvei</i>	R	R		R	R					
<i>Serratia marcescens</i>	R	R		R		R				
<i>Proteus mirabilis</i>								R	R	R
<i>Proteus vulgaris</i>	R			R		R			R	R
<i>Morganella morganii</i>	R	R		R		R			R	R
<i>Yersinia enterocolitica</i>	R	R	R	R	R	R				
<i>Providencia spp</i>	R	R		R			R		R	R

*Nota: AMC: amoxicilina-ác. clavulánico; AMP: ampicilina; COL: colistina; CXM: cefuroxima; CIG: cefalosporinas de primera generación; FOX: cefoxitina; GEN: gentamicina; TET: tetraciclina; TIC: ticarcilina; NIT: nitrofurantoína; R: resistente.*

El siguiente cuadro se muestran las principales especies bacterianas de interés clínico y los antibióticos a los cuales muestran resistencia de manera adquirida (Navarro. F 2010).

Bacterias	Antibióticos a los que muestra resistencia
<i>Klebsiella spp</i> , <i>Citrobacter koseri</i> , <i>Citrobacter amalonaticus</i>	AMP y TIC
<i>Citrobacter freundii</i>	AMP, FOX y C1G
<i>Morganella morganii</i> , <i>Serratia spp</i>	AMP, CXM, FOX y C1G
<i>Providencia</i>	CXM, FOX
<i>Hafnia alvei</i>	AMP y C1G
<i>Yersinia enterocolitica</i>	AMP, Carboxipenicilinas, AMC, C1G y C2G
<i>Escherichia coli</i>	Cefalixina, gentamicina, kanamicina, ciprofloxacina, nitrofurantoina, AMP, AMC, Cotrimoxazol, tetraciclina y ácido nalidixico.

### SECUENCIACIÓN MASIVA

La secuenciación masiva es una herramienta que ya ha sido utilizado en apoyo al diagnóstico de pacientes con ciertas enfermedades. En la práctica clínica, su implementación genera retos que deben considerarse para que el impacto positivo de esta tecnología sea aún mayor. Esto incluye el reducir tiempo en la entrega de resultados, estandarizar las prácticas de laboratorio y de análisis de datos, mejora de la interpretación de datos y clasificación de variantes. Debido a estas ventajas esta tecnología se fue introduciendo a la microbiología clínica hasta tal punto de predecirnos bacterias resistentes a los antibióticos y del porque esa resistencia. A continuación ¿qué es la secuenciación masiva? ¿Y en que consiste esta gran tecnología?

La secuenciación masiva, también conocida como secuenciación de nueva generación (NGS) o segunda generación, engloba toda una generación de secuenciadores que utilizan diferentes tecnologías, estrategias y aproximaciones, cuya característica común es su habilidad para llevar a cabo de forma simultánea millones de reacciones de secuenciación en paralelo en un tiempo relativamente corto. Los secuenciadores masivos o de segunda generación difieren en muchos aspectos con los secuenciadores tipo Sanger la cual se basa en la síntesis secuencial de una hebra

de ADN complementaria a la hebra de cadena simple cuya secuencia quiere determinarse. Entre las principales diferencias que se dan con la secuenciación masiva es que esta realiza de forma simultánea millones de reacciones de secuenciación de fragmentos muy cortos que pueden asignarse a cada una de las muestras que se analizan simultáneamente gracias a la preparación previa de unas librerías etiquetadas (multiplexado) que se inmovilizan sobre una matriz bidimensional.

De forma general, el proceso de secuenciación masiva puede dividirse en tres pasos: primero preparación de librerías, segundo inmovilización sobre una superficie bidimensional y amplificación *in vitro* de la librería y tercero secuenciación y captación de señal.

La preparación de librerías consiste básicamente en fragmentar y marcar de forma inequívoca las diferentes muestras de ADN cuya secuencia quiere conocerse. Actualmente, existen diferentes estrategias de fragmentación del ADN (física, enzimática o química) cuyo objetivo final es la obtención de una mezcla de fragmentos de un tamaño homogéneo, estando el tamaño deseado determinado por la tecnología de secuenciación empleada. Una vez fragmentado el ADN genómico se procede al marcaje para lo cual se añaden unos identificadores únicos que no sólo permiten identificar la muestra a la que pertenecen, sino que además permiten la posterior fijación de los mismos a la superficie bidimensional donde tendrá lugar la reacción de secuenciación.

Una vez preparadas las librerías, éstas se fijan a una superficie bidimensional donde son amplificadas *in vitro* existiendo también en este punto diferentes estrategias. De todas ellas, la más sencilla es la utilizada por los secuenciadores de Illumina y denominada amplificación puente (*bridge amplification*). En esta estrategia los cebadores necesarios para el inicio de la reacción de amplificación se encuentran inmovilizados sobre una superficie bidimensional; al ser estos

cebadores complementarios a una parte de los identificadores incorporados en la preparación de librerías, las muestras quedan inmovilizadas y en disposición de iniciarse la amplificación clonal en paralelo de todas las muestras. Otras estrategias alternativas incluyen la amplificación en emulsión o la amplificación en nanobolas (*rolling-circle amplification*).

Finalmente, una vez amplificados los fragmentos de ADN, se produce la reacción de secuenciación para la cual también se han desarrollado diferentes estrategias. Una de estas estrategias es la pirosecuenciación, cuya base es la utilización de nucleótidos cuya incorporación a la hebra complementaria en síntesis conlleva la liberación de pirofosfatos que, en última instancia, generan luz que puede detectarse permitiendo así elucidar la secuencia de nucleótidos. Otra estrategia ampliamente utilizada es la denominada secuenciación por síntesis (SBS, *sequencing by synthesis*). En esta aproximación la reacción de síntesis consiste en la incorporación secuencial y reversible de nucleótidos marcados con fluoróforos distintos que impiden además la adición posterior de más nucleótidos; de esta forma, en cada paso se produce la adición de un único nucleótido a cada uno de los fragmentos en síntesis cuya señal fluorescente es captada y traducida a nucleótidos. Finalmente, otra aproximación ampliamente utilizada es la denominada secuenciación mediante ligación (SBL; *sequencing by ligation*) que no utiliza ADN polimerasas y cuya base reside en la utilización de una mezcla de sondas marcadas con fluoróforos que se unen mediante ligasas específicas. Por tanto, es importante conocer la estrategia química de secuenciación en que se basa el secuenciador ya que determina en gran medida sus características y prestaciones.

De entre las diferentes tecnologías de secuenciación masiva actualmente disponibles, la tecnología Illumina es la que se encuentra más extendida en el ámbito clínico dado que su alto rendimiento y la precisión de las lecturas generadas la hacen idónea para la mayoría de las aplicaciones de la secuenciación masiva en Microbiología Clínica (Lopez Causape. C, 2021).



En el siguiente cuadro se muestran las características de las distintas plataformas de secuenciación:

Plataforma	Secuenciador	Amplificación de la librería	Tecnologías de secuenciación	Tiempo de carrera	Tipos de errores más frecuentes
Illumina	MiSeq	Puente (bridge-PCR)	Secuenciación por síntesis	4-56 hr	Sustituciones de nucleótidos
	NextSeq	Puente (bridge-PCR)	Secuenciación por síntesis	11-29 hr	Sustituciones de nucleótidos
	HiSeq	Puente (bridge-PCR)	Secuenciación por síntesis	1-3 días	Sustituciones de nucleótidos

### DETECCIÓN DE MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS

Los tratamientos con antibióticos suponen una herramienta fundamental en el manejo de las enfermedades infecciosas. En las últimas décadas, se ha constatado un notable aumento de la resistencia a muchos de los antibióticos disponibles, así como un incremento en el número de microorganismos multirresistentes. De forma natural, los microorganismos presentan resistencia a algunos antibióticos, pudiendo incrementar su perfil de resistencia mediante la adquisición y selección de mutaciones puntuales, deleciones o inserciones en su cromosoma y/o mediante la adquisición horizontal de determinantes de resistencia a los antibióticos.

La resistencia a los antibióticos está, en general, codificada en el genoma bacteriano, por lo que la aplicación de la secuenciación masiva tiene el potencial teórico de predecir el fenotipo de resistencia en un microorganismo dado, donde se han explorado diferentes estrategias para predecir la resistencia en base al genotipo. La más sencilla es la basada en reglas, en las que la predicción se basa en la detección de genes y de ciertas mutaciones cromosómicas bien caracterizadas. Estrategias más complejas son las que incorporan modelos estadísticos o el conocido *machine-*

*learning*, estrategias que no precisan de una caracterización y conocimiento previo de los mecanismos que participan en la resistencia antibiótica.

## **RECURSOS BIOINFORMATICOS PARA LA DETECCION DE MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIOTICOS**

La correcta aplicación de la secuenciación masiva al diagnóstico genético depende en gran medida de la selección y combinación de las herramientas bioinformáticas y los parámetros de ejecución adecuados.

En el siguiente cuadro, se mencionan una serie de recursos para la detección y caracterización de genes y mecanismos relacionados con la resistencia antibiótica. Mayoritariamente, estos recursos están enfocados a la detección de determinantes de resistencia adquiridos por vía horizontal, aunque algunos de ellos también incluyen discretas colecciones de mutaciones cromosómicas relacionadas con la resistencia a los antibióticos. Estos recursos utilizan distintas herramientas de análisis (*read-based*, *assembly-based* o *k-mers-based*), no existiendo un consenso en cuanto a qué metodología es mejor y dependiendo su elección mayoritariamente del tipo de análisis (genómico) y de la disponibilidad de recursos computacionales. En general, en análisis de genoma completo suelen preferirse los métodos basados en ensamblaje (*assembly-based*) ya que éstos proporcionan información adicional sobre el entorno en el que se encuentran los genes de resistencia (López Causape. C, 2021).

Recurso	Microorganismo diana	Aplicación	Herramienta de análisis	Detección de mutaciones cromosómicas	Input
ResFinder	General	Genomas	BLAST	Si	FASTA FASTQ
CARD	General	Genomas	BLAST, RGI	Si	FASTA
NCBI AMRFinderPlus	General	Genomas	BLAST, HMMER	Si	FASTA

### III. CONCLUSIONES

La resistencia bacteriana a los antibióticos es un problema sanitario muy importante que supone un incremento de la morbilidad y mortalidad de los pacientes, alargando los tratamientos y estancias hospitalarias, por esta razón debería de desarrollarse nuevos antibióticos y modificación de los ya conocidos, intentando mejorar su actividad.

El desarrollo de campañas de educación que prevengan a la población sobre la importancia de abstenerse de practicar la automedicación en el uso de fármacos, principalmente de antibióticos ya que el uso inadecuado de estos puede llevar a cepas bacterianas a desarrollar resistencia antimicrobiana.

Establecer una farmacovigilancia que consista en que los pacientes reciban los antibióticos apropiadas a sus necesidades clínicas, en dosis adecuadas, por un periodo de tiempo adecuado y que sobre todo sea recetado por un médico, minimizando la resistencia a los fármacos antimicrobianos.

La tecnología de secuenciación masiva está permitiendo facilitar el diagnóstico molecular, al ser una herramienta más eficiente y veloz en la secuenciación de genes, facilitando la identificación y la clasificación de múltiples variantes genéticas de las enterobacterias, y demás microorganismos que generan patologías de gran importancia médica.

Las pruebas basadas en secuenciación masiva aun representan retos y desafíos, como lo es la comprensión de su adecuada utilización, su validación a partir de estándares de calidad y la interpretación correcta de variantes reportadas, con el fin de lograr que el diagnóstico de base genética sea cada vez más oportuno y adecuado.

#### IV. FUENTES DE INFORMACIÓN

1. Bush, LM (2022). Infecciones por *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Serratia*. Manual MSD versión para profesionales. Recuperado el 16 de agosto de 2023, de <https://www.msdmanuals.com/es/professional/enfermedades-infecciosas/bacilos-gramnegativos/infecciones-por-y>
2. Pérez Guerrero (2014). Infecciones por enterobacterias. Recuperado el 16 de agosto de 2023, de [https://doi.org/10.1016/s0304-5412\(14\)70768-1](https://doi.org/10.1016/s0304-5412(14)70768-1)
3. Jawetz (2010). Bacilos gramnegativos entéricos. Jawetz. *En Microbiología médica*. (25ta Ed, 213). Editorial Mexicana
4. Rood, IGH (2017) Detección molecular de enterobacterias productoras de carbapenemasas y  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en un entorno clínico. *Microbiología diagnóstica y enfermedades infecciosas*. Recuperado el 15 de agosto de 2023, de <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.07.013>
5. Bush, K (2007). Carbapenemasas: las versátiles betalactamasas. *Clinical Microbiology Reviews*. Recuperado el 15 de agosto de 2023, de <https://doi.org/10.1128/CMR.00001-07>
6. Livermore, DM (2009). beta-lactamasas en laboratorio y resistencia clínica. *Revisiones de microbiología clínica*. Recuperado 16 de agosto de 2023, de <https://doi.org/10.1128/CMR.8.4.557>
7. Bush K (2018). Alarmante resistencia mediada por  $\beta$ -lactamasa en enterobacterias resistentes a múltiples fármacos. Recuperado 16 de agosto de 2023, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527410001335>
8. Martínez. L (2020). Resistencia a las quinolonas a partir de un plásmido transferible. Recuperado el 28 de agosto de 2023, de [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(97\)07322-4/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(97)07322-4/fulltext)

9. E, Navarro (2011). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos. Seimc. Recuperado el 28 de agosto de 2023, de <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia38.pdf>
10. Jiménez. A (2011). Mecanismos de resistencia a los antibióticos de importancia clínica en las enterobacterias. *INCIENSA*, 13-14.
11. Hooper. CC (2009). Topoisomerasas bacterianas, antitopoisomerasas y resistencia a las antitopoisomerasas. *Enfermedades infecciosas clínicas: una publicación oficial de la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América*. Recuperado 16 de agosto de 2023, de <https://doi.org/10.1086/514923>
12. Navarro. F (2010). Lectura interpretativa de antibiogramas de enterobacterias. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. Recuperado 15 de agosto de 2023, de <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.05.002>
13. Lopez Causape (2021). Secuenciación de segunda generación (masiva). C. Causape. *Aplicación de las técnicas de la secuenciación masiva en la microbiología clínica (7a Ed,7-8)*. SEIMC.
14. Lopez Causape (2021). Detección de mecanismos de resistencia a los antibióticos. C. Causape. *Aplicación de las técnicas de la secuenciación masiva en la microbiología clínica*. (a Ed,16-18) SEIMC.
15. Lezana Rosales (2021). La bioinformática en la interpretación de la secuenciación masiva. ISSUU. Recuperado el 28 de agosto de 2023, de [https://issuu.com/bioquimica.analisis.12.octubre/docs/clin12lab\\_2021\\_isbn/s/1229317](https://issuu.com/bioquimica.analisis.12.octubre/docs/clin12lab_2021_isbn/s/1229317)

16. Rubio. S (2021). Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN. Universidad Javeriana. Recuperado el 28 de agosto de 2023, de [https://revistas.javeriana.edu.co/files-articulos/UMED/61-2%20\(2020\)/231062391008/](https://revistas.javeriana.edu.co/files-articulos/UMED/61-2%20(2020)/231062391008/)
17. Hernández. M (2020). Aplicación de la secuenciación masiva y la bioinformática al diagnóstico microbiológico clínico. *Revista Argentina de microbiología*, 52 (2), 150–161. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.06.00>
18. Gamboa, Y (2014). Guía para la escritura del ensayo. Universidad Piloto de Colombia. Recuperado el 17 de agosto de 2023, de [https://www.unipiloto.edu.co/descargas/archivo\\_administracion\\_de\\_empresas/guia\\_ensayos.pdf](https://www.unipiloto.edu.co/descargas/archivo_administracion_de_empresas/guia_ensayos.pdf)