PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE INGENIERÍA

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA COMPUTACIONAL

Caracterización génica de *mcr* en *Escherichia coli* intrahospitalarias con resistencia a polimixina E (colistina)

Trabajo previo a la obtención del título de

Magíster en Biología Computacional

WLADIMIR JAVIER ENRÍQUEZ VILLACRESES

QUITO, 2024.

DERECHOS DE AUTOR

Expreso que soy el autor del presente trabajo de titulación y consulté las referencias indicadas en el mismo. Este trabajo no fue presentado de forma previa para la obtención de ningún grado académico.

La Pontificia Universidad Católica del Ecuador puede utilizar los derechos del trabajo de titulación de acuerdo con la Ley de Propiedad Intelectual y su normativa institucional.



Ing. Wladimir Javier Enríquez Villacreses, Mg.

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Certifico que el trabajo del Ing. Wladimir Javier Enríquez Villacreses, Mg. para la obtención del título de Magíster en Biología Computacional se llevó a cabo bajo la normativa y reglamentación institucional y puede ser presentada para su calificación.



Ing. Francisco Flores, PhD

HOJA DE EVIDENCIA ANTIPLAGIO

DEDICATORIA

Dedico mi trabajo a los 5 pilares más importantes de mi vida: Dios como el pilar fundamental de mi vida quien ha estado en mi pasado, en mi presente y sin duda en mi futuro. A mi familia que siempre me dan las fuerzas para conseguir mis objetivos y siguen mi trayectoria con mucha alegría.

A mis amistades que me han dado la oportunidad de tener distintos puntos de vista y tomarme las cosas con calma. A la comunidad científica que forman parte de mis anhelos por hacer de este mundo un lugar mejor, siempre con la intensión de acortar la brecha creciente entre los que tienen y los que no.

Por último, pero no menos importante, al amor que es el medio en nuestras vidas que nos permite trascender en el tiempo, otras dimensiones en el espacio y grandes distancias.

INDICE GENERAL

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES 8
ÍNDICE DE TABLAS **9**
1. **DATOS GENERALES** 10
1.1 Título del proyecto: 10
1.2 Autor: 10
1.3 Director: 10
1.4 Fecha: 10
2. **RESUMEN EJECUTIVO** 11
3. **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAPROPUESTA** 12
3.1 Justificación 12
3.2 Planteamiento del problema 13
3.3 Contextualización del tema u objeto 15
4. Objetivos 15
Objetivo General 15
Objetivos Específicos 15
5. Marco teórico y conceptual 16
6. **METODOLOGÍA Y TÉCNICAS** 20
6.1 Métodos del objetivo 1: 20
6.1.1 Técnicas de instrumentación de datos 20
6.1.2 Secuenciación 21
6.2 Métodos del objetivo 2: 22
6.2.1 Técnica de procesamiento y análisis de datos 22
6.2.2 Análisis Bioinformático 23
6.3 Métodos del objetivo 3: 27
6.3.1 Análisis Plasmídicos. 28
7. **RESULTADOS** 29
7.1 Control de calidad de secuencias 29
7.2 Ensamble de Secuencias 32
7.3 Anotación de Genomas 34
7.4 Clasificación taxonómica 35
7.5 Análisis de genes de resistencia 36

7.6 Determinación de plásmidos 39
7.8 Ensamblaje de plásmido portador del gen mcr 42
8. **CONCLUSIONES** 47
9. **RECOMENDACIONES** 48
10. **BIBLIOGRAFÍA** 49
11. **ANEXOS** 54
ANEXO 1. CÓDIGO EJECUTADO EN EL BASH DE LINUX, A TRAVÉS DEL CLÚSTER DE CEDIA 54

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1.Flujo de trabajo con sus respectivos Software y algoritmos utilizados para el proceso de secuenciación que se divide en categorías y describe el proceso de análisis de secuencias de lectura corta. _____25

Ilustración 2. Limpieza de secuencias, evaluación y control de la calidad de las secuencias forward y reverse por base de aislamiento bacteriano intrahospitalario 499, empleando las herramientas bioinformáticas Trimmomatic y fastQC._____30

Ilustración 3. Limpieza de las secuencias, evaluación de control de la calidad de las secuencias forward y reverse por base de aislamiento bacteriano intrahospitalario 1430, empleando las herramientas bioinformáticas Trimmomatic y fastQC. _____31

Ilustración 4. Análisis de calidad de ensamblaje obtenido mediante SPAdes y analizados en la herramienta de evaluación de la calidad de los ensamblajes del genoma QUAST que basa sus en contigs de tamaño >= 500 pb de secuencia de aislamiento genoma 1430. _____32

Ilustración 5. Análisis de calidad de ensamblaje obtenido mediante SPAdes y analizados en la herramienta de evaluación de la calidad de los ensamblajes del genoma QUAST que basa sus en contigs de tamaño >= 500 pb de secuencia de aislamiento genoma 449. _____33

Ilustración 6. Representación perfil metagenómico en forma de una gráfica circular ampliable KRONA, genoma 449 con una identidad 96% para Escherichia coli._____35

Ilustración 7. Representación perfil metagenómico en forma de una gráfica circular ampliable KRONA, genoma 1430 con una identidad 96% para Escherichia coli._____35

Ilustración 8. Análisis de secuencia modelo blanqueante interrumpida que toma en cuenta los fragmentos (ISApl1-mcr1.1, PAP2- ISApl1) referencias publicadas en GenBank accession NZ_CP029493. Se observa flanqueo de la secuencia de inserción ISApl1 está ubicada inmediatamente aguas arriba del gen mcr-1.1 seguido de un locus putativo pap2 que codifica la proteína de la familia PAPA2 que esta aledaño aguas abajo del gen mcr -1.1_____42

Ilustración 9. Circularización del NODE-22 muestra intrahospitalaria 449 con marcos de lectura con flechas de color verde; marcos de lectura secuencia NZ_CP029493 se representan con flechas de color amarillo que describen: genes relacionados con transposones, secuencias de inserción, regiones de repetición, genes de replicación, sistemas de estabilización del plásmido, genes que regulan la antirestricción, genes de integrasa y resolvasa . El gen de resistencia mcr 1.1 se describe de color lila._____44

Ilustración 10. Circularización del NODE_31 muestra intrahospitalaria 1430 con marcos de lectura flechas de color verde; marcos de lectura secuencia NZ_CP029493 se representan con flechas de color amarillo que describen: genes relacionados con transposones, secuencias de inserción, regiones de repetición, genes de replicación, sistemas de estabilización del plásmido, genes que regulan la antirestricción, genes de integrasa y resolvasa . El gen de resistencia mcr 1.1 se describe de color lila. _____45

Ilustración 11. Alineamiento de secuencias del entorno genético del gen mcr1.1 en aislados de E.coli intrahospitalaria. Dentro del las dos secuencias no se encuentra presente el transposón medido por SpApl1; E. coli 499 NODE_22 y E coli 1430 NODE_31 presentan el factor gen accesorio de la relaxasa nikB aguas arriba. Además se destaca la presencia de un locus putativo anotado como un gen que codifica PAP2 en E coli 1430 NODE_31 ._____46

Ilustración 12. Representación parcial esquemático de las secuencias codificantes del entorno genético del gen mcr1.1 en aislados intrahospitalarios positivos para mcr. Los marcos de lectura (ORF) se ilustran con flechas que apuntan hacia su orientación respectiva permitiendo una comparación entre las relaciones genéticas de E. coli 499 NODE_22, E coli 1430 NODE_31 y E. coli NZ_cp029493. _____46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Herramientas bioinformáticas disponibles. 23
Tabla 2 Predicción de Anotaciones obtenidas mediante la herramienta de predicción Prokka, en la aplicación bioinformática BV-BRC 3.33.16 a) Escherichia coli Anotación449 Longitud: 5034534bp, Longitud: 567 ; b) Escherichia coli Anotación1430 Longitud: 5399487b 34
Tabla 3 Identificación de genes de resistencia a antibióticos adquiridos en aislado intrahospitalario 449, detección de gen mcr-1.1 que confiere resistencia a colistin datos obtenidos de análisis Resfinder. 37
Tabla 4 Identificación de plásmidos que confieren resistencia a antibióticos adquiridos en aislado intrahospitalario 449, detección de plásmido Incl2 con detección de contigs NODE_22 codificante para el gen mcr-1.1 que confiere resistencia a colistin datos obtenidos de Plasmidfinder. 37
Tabla 5 Identificación de región del gen mcr 1.1 que confieren resistencia a antibióticos adquiridos en aislado intrahospitalario 449, detección de contigs NODE_22 codificante gen mcr-1.1 longitud 1626 pb obtenidos de análisis Pointfinder. 38
Tabla 6 Identificación de genes de resistencia a antibióticos adquiridos en aislado intrahospitalario 1430, detección de gen mcr-1.1 que confiere resistencia a colistin datos obtenidos de análisis Resfinder. 40
Tabla 7 Identificación de plásmidos que confieren resistencia a antibióticos adquiridos en aislado intrahospitalario 1430, detección de plásmido IncX4 con detección de contigs NODE_31 codificante para el gen mcr-1.1 que confiere resistencia a colistin datos obtenidos de Plasmidfinder 41

1. DATOS GENERALES

1.1 Título del proyecto:

Caracterización génica de *mcr* en *Escherichia coli* intrahospitalarias con resistencia a polimixina E (colistina)

1.2 Autor:

Wladimir Javier Enríquez Villacreses

1.3 Director:

PhD. FRANCISCO JAVIER FLORES FLOR

1.4 Fecha:

11/06/2024

2. RESUMEN EJECUTIVO

El uso indiscriminado de antibióticos puede conducir directamente a la transmisión de microorganismos resistentes a múltiples fármacos a los seres humanos. Esto nos dejaría sin una opción terapéutica esencial cuando más la necesitemos (Falagas & Bliziotis, 2007).

Las bacterias tienen la capacidad de desarrollar resistencia a los antimicrobianos por diversas razones, siendo especialmente preocupantes aquellos mecanismos de resistencia generados por elementos genéticos móviles, como plásmidos, transposones e integrones (H. Liu et al., 2018). Estos elementos son considerados más peligrosos debido a su capacidad de transferirse entre células bacterianas que habitan en el mismo entorno ecológico; al hacerlo, pueden transportar consigo uno o más genes de resistencia, complicando significativamente el tratamiento de las infecciones bacterianas; la capacidad de transferencia y acumulación de genes de resistencia subraya la importancia de monitorear y controlar la diseminación de la resistencia antimicrobiana (OMS, 2017; Q. Wang et al., 2017).

La resistencia a la colistina es emblemática, la presencia del gen mcr en las bacterias limita considerablemente las opciones terapéuticas disponibles para tratar dichas infecciones, lo que complica aún más la situación y resalta la urgencia de encontrar soluciones efectivas (Osei Sekyere, 2019).

El presente estudio pretende comprender la movilización del gen mcr y la posible diversidad genética existente en islas genómicas de multirresistencia de *E. coli* de dos aislados de muestras intrahospitalarias.

Palabras clave: Colistina, islas genómicas, *E. coli*, Resistencia antimicrobiana

3. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA PROPUESTA

3.1 Justificación

La alta diseminación de genes de resistencia a múltiples antibióticos es considerada prioritaria por las agencias de control sanitario alrededor del mundo, en especial en Enterobacterias y no fermentadores, tanto a nivel comunitario y hospitalario, por lo cual se crea la necesidad de encontrar alternativas sustentables para hacer frente a esta problemática (Aminov, 2010).

Dentro del campo de la salud humana, el incremento en las tasas de resistencia se atribuye al uso indiscriminado de antibióticos, alta movilidad poblacional, estancias hospitalarias extensas, pero principalmente la diseminación horizontal de genes de resistencia (Partridge et al., 2018), los cuales se acoplan al ADN bacteriano, provocando la expresión de resistencia, haciendo poco útiles los esquemas terapéuticos hasta ahora establecidos. Sin embargo, en otros ámbitos como la salud animal y ambiente, contribuyen de manera directa al incremento de esta problemática, ya que se sabe del uso de antibióticos como promotores de crecimiento, induciendo a la resistencia y la diseminación en el ambiente debido a las precarias condiciones de higiene en las prácticas de manejo (Bruno, 2015).

La colistina se abandonó en gran medida como un tratamiento de infecciones bacterianas en la década de 1970 debido a su toxicidad y su perjuicio renal, pero se ha introducido en los últimos años como un antibiótico de "último recurso" contra las infecciones multirresistentes. Por lo tanto, es alarmante que la prevalencia de la resistencia a la colistina se haya convertido en una preocupación significativa, tras la identificación de la resistencia medida por plásmidos conferido por el gen *mcr* a finales del 2015 (R. Wang et al., 2018a).

El gen movilizado de la colistina *mcr* supone un riesgo importante para la salud pública, ya que puede propagarse rápidamente por transferencia horizontal (Ling et al., 2020). No obstante, se ha caracterizado en una gran variedad entornos genómicos, lo que concuerda con la movilización del gen por un transposón. La distribución mundial al menos en cinco continentes está bien documentada, pero se sabe poco de su origen, adquisición y propagación.

3.2 Planteamiento del problema

Las enfermedades infecciosas representan en la actualidad, la segunda causa de muerte alrededor del mundo. Anualmente, un estimado de 17 millones de personas mueren debido a microorganismos resistentes (Shen et al., 2016).

El problema de la resistencia a los antibióticos se originó debido al uso y sobreuso de estos compuestos a nivel mundial, tanto en salud humana, sanidad animal y ambiente. Estas prácticas modificaron el ritmo evolutivo de los microorganismos, creando ambientes de presión selectiva he intercambio genético de donde se generan y se diseminan nuevos determinantes de resistencia (Aminov, 2010).

En la actualidad los niveles de bacterias resistentes están alcanzando peligrosamente niveles altos y crecientes alrededor del mundo, limitando de manera considerable la capacidad clínica de tratamiento (Alanis, 2005).

La colistina a lo largo del tiempo se ha usado con fines terapéuticos y profilácticos en producción animal a nivel mundial, principalmente como promotor del crecimiento (Martino et al., 2024). El uso indiscriminado del antibiótico involucrado directamente a la transmisión de microorganismos resistentes a múltiples fármacos a los seres humanos, bajo este contexto nos

dejaría sin una opción terapéutica esencial cuando más la necesitemos (Fernandes et al., 2016).

La colistina ha tomado protagonismo en los últimos años debido al aparecimiento de una cepa de *Escherichia coli* aislada de un cerdo, la cual contiene un plásmido que portaba el gen denominado *mcr-1*, que confiere resistencia siendo este el primer hallazgo de una bacteria que contiene un elemento genético móvil de posible transmisión interespecífica y con resistencia a la última línea antibiótica creada por el humano(Q. Wang et al., 2017).

Desde el primer hallazgo de resistencia a colistina mediada por un elemento móvil en 2015 se tiene el precedente de que pasaron más de tres décadas sin detectarlo como lo describe Shen et al., 2016. Al momento se han descrito 9 variantes del gen mcr-1 identificándolo con más frecuencia en aislados de origen animal que en casos clínicos. Esto sugiere que su aplicación en las cadenas productivas puede convertirse en un potencial reservorio de resistencia (Liu et al., 2016; Nordmann & Poirel, 2016; Shen et al., 2016).

A nivel mundial se han identificado variantes del gen mcr en bacterias como como *Salmonella enterica, Escherichia coli, Moraxella y Klebsiella pneumoniae,* infectando pacientes hospitalizados. Se han descrito 9 variantes *mcr1*, *mcr-2, mcr-3, mcr-4, mcr-5, mcr-6, mcr-7 mcr-8 y mcr-9* (Carroll et al., 2019; Ling et al., 2020; Y. Y. Liu et al., 2016).

Las investigaciones han revelado asociaciones significativas de cierto gen con secuencias de incompatibilidad como X3, X4, bridX4, H1, HI1, HI2, P, I2, F, FII y FIB (A. Li et al., 2016a; Q. Wang et al., 2017a; R. Wang et al., 2018b; Zhang et al., 2017). Además, se ha identificado una relación ancestral con el transposón ISApl1. Se plantea que, durante el proceso de transposición en plásmidos, podría haber pérdidas de bases genéticas que resultan en la eliminación de secuencias del transposón. Este fenómeno podría facilitar la transferencia conjugativa de material genético entre diferentes fenotipos bacterianos (He et al., 2019).

Este estudio surge del interés de comparar la diversidad genética existente en islas genómicas de multirresistencia de *E. coli* aislados de muestras intrahospitalarias, para ver posibles relaciones entre los aislados, sus mecanismos de transferencia de resistencia (islas genómicas) y los propios determinantes de resistencia, teniendo como objetivo el caracterizar el gen *mcr* en *Escherichia coli* intrahospitalarias con resistencia a polimixina E (colistina).

3.3 Contextualización del tema u objeto

Con base en lo antes mencionado se plantea la siguiente interrogante: ¿El gen mcr y sus variantes génicas asociadas a *Escherichia coli* se encuentra en una única clase de isla genómica de determinante de resistencia a polimixina E?

4. Objetivos

Objetivo General

1. Caracterizar el gen mcr en *Escherichia coli* intrahospitalarias con resistencia a polimixina E (colistina).

Objetivos Específicos

1. **Objetivo 1.** Analizar las variantes del gen mcr en *E. coli* intrahospitalario existentes
2. **Objetivo 2.** Identificar los grupos de incompatibilidad de plásmidos asociados con los genes mcr encontrados.
3. **Objetivo 3.** Analizar las islas genómicas asociada al gen mcr que proporcionan transferencia de resistencia.

5. Marco teórico y conceptual

Junto con la introducción de los antibióticos que ha sido una herramienta indispensable de la humanidad para para afrontar infecciones bacterianas en distintos campos de acción se ha observado la diseminación de bacterias multirresistentes por el desarrollo de resistencia antimicrobiana (RAM) disminuyendo las opciones terapéuticas y aumentando las estancias hospitalarias (Falagas & Bliziotis, 2007; J. Wang et al., 2019).

La resistencia a los antimicrobianos es un proceso natural, evolutivo y de adaptación mediante el cual un microorganismo adquiere la capacidad de neutralizar el efecto del antimicrobiano, debido a la mutación del microorganismo o al acoplamiento de genes de resistencia circulantes. Varios factores contribuyen a la selección y diseminación de genes de resistencia, pero dentro de los principales se encuentra el uso inapropiado e indiscriminado de los antimicrobianos (Alanis, 2005).

Los elementos genéticos móviles juegan un papel crucial en la adquisición y difusión de la resistencia a los antibióticos en bacterias tanto gramnegativas como grampositivas, particularmente en el grupo de organismos ESKAPEE (*Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter spp., y Escherichia coli*).

El desafío evolutivo para combatir la quimioterapia antimicrobiana a menudo implica la adquisición de determinantes de resistencia ya existentes en el acervo genético bacteriano, logrado mediante la acción coordinada de elementos genéticos móviles (MGE) que se trasladan dentro o entre moléculas de ADN. Este proceso incluye el intercambio genético horizontal a través de secuencias de inserción (IS), transposones (Tn), casetes de genes/integrones (In), y elementos que

pueden transferirse entre células bacterianas, como los plásmidos y los elementos conjugativos integradores.

Los análisis moleculares han demostrado que la multirresistencia se adquiere comúnmente a través de la captura de determinantes preexistentes, seguida por su amplificación en respuesta a la presión selectiva, facilitada en gran medida por los elementos genéticos móviles.

Los transposones y las secuencias de inserción son segmentos de ADN capaces de movilizarse, junto con genes de resistencia asociados, a nuevas ubicaciones dentro de la misma célula o entre diferentes moléculas de ADN. Los integrones utilizan la recombinación específica de sitio para intercambiar genes de resistencia, y al estar presentes en múltiples copias en distintos lugares de un genoma, facilitan la recombinación homóloga. Un casete de genes es un elemento móvil que consta de uno o dos genes, generalmente insertados en un integrón, que carece de un promotor propio, pero incluye un sitio de recombinación. Las islas genómicas, adquiridas por transferencia horizontal, varían en tamaño y pueden clasificarse por el fenotipo que codifican, como islas de resistencia o de patogenicidad, y abarcan elementos con funciones de movilidad que pueden transferirse horizontalmente (Partridge et al., 2018).

Este entendimiento detallado de los elementos genéticos móviles subraya su papel central en la evolución de la resistencia a los antibióticos, resaltando la necesidad de estrategias innovadoras en la lucha contra la resistencia antimicrobiana (A. Li et al., 2016).

Para el caso particular de las polimixinas que son antibióticos que consisten en decapéptidos básicos cíclicos, existen 5 clases de polimixinas de las cuales se usan únicamente la B y E que derivan distintos antibióticos usados comúnmente en bacilos Gram negativos actuando en la membrana plasmática alterando su polaridad (Liu et al., 2016).

La resistencia a colistina puede presentarse en varias rutas metabólicas, dentro de las que se involucra la mutación del sistema PmrAB lo que conlleva a la disminución de la carga del lípido A, los hopanoides que confieren rigidez a la membrana plasmática, las distintas bombas de flujo, el aparecimiento de proteasas en el espacio periplásmico y la que tiene una mayor importancia por la capacidad de ser transmitida la mediada por plásmidos que ha llevado a la medicina crítico por la dificultad del control y manejo de infecciones causadas por bacterias portadoras del gen mcr, debido a que las opciones terapéuticas se ven disminuidas para combatirlas (Osei Sekyere, 2019).

La antibiótico colistina a lo largo del tiempo se ha usado con fines terapéuticos y profilácticos en producción animal a nivel mundial, y considerando como mayor importancia el uso como promotor del crecimiento (Q. Li et al., 2022). Existen posibilidades que este uso indiscriminado tenga afección directa o contagio de microorganismos multirresistentes hacia humanos dejando sin una de las opciones terapéuticas en caso de necesitarla (Fernández et al., 2018).

La colistina ha tomado protagonismo en los últimos años debido al aparecimiento de una cepa de *Escherichia coli* aislada de un cerdo, la cual contiene un plásmido que portaba el gen denominado mcr-1, que confiere resistencia al colistin, siendo este el primer hallazgo de una bacteria que contiene un elemento genético móvil (MGE) de posible transmisión inter-especies y con resistencia a la última línea antibiótica creada por el humano (Liu et al., 2016c; Nordmann & Poirel, 2016).

El sitio diana de acción de la colistina es el lípido A del lipopolisacárido de las bacterias que generan un efecto bactericida. Se ha descrito que los genes de resistencia a la colistina se expresan en plásmidos; el gen *mcr* es el encargado de codificar un lípido A transferasa de

fosfoetanolamina (PEA) que cataliza adición de PEA al 4 r-fosfato de glucosamina del lípido A, esta modificación confiere la resistencia bacteriana a la polimixina (A. Li et al., 2016).

Desde el primer hallazgo de resistencia a colistina mediada por un elemento móvil en 2015 y pasando más de tres décadas sin detectarlo como lo describe Shen et al., 2016 al momento se han descrito 9 variantes del gen mcr-1 identificándolo en aislados de origen animal con mucha más frecuencia dado el uso en las cadenas productivas convirtiéndose en un posible reservorio (Nordmann & Poirel, 2016b; Shen et al., 2016).

La resistencia a la colistina se ha descrito en variedades de Enterobacterales, *Escherichia coli* es la bacteria que más reporta mcr-1 a nivel mundial y el cual se clasifica en cinco acervos filogenéticos denominados A, B1, B2, D y E, donde B2 y en menor proporción el D son los causantes en gran medida de infección intestinales en humanos, mientras los grupos A y B1 pertenecían principalmente a comensales. La mayoría de las cepas patógenas intestinales pertenecen a los grupos A, B1 y D, mientras que las cepas extraintestinales pertenecen principalmente a los grupos B2 y D (Calero-Cáceres et al., 2022)

Para Enero 31 de 2024 según la National Database Antimicrobial Resistant Organismos (NDARO) se han reportado 37 variantes genéticas del gen mcr-1 en diferentes países (mcr-1.1, mcr-1.2 hasta mcr-1.37) tanto en humanos como en animales como se describe en referencia al Gene-Catalogo-PathogenDetection-NCBI como se describe en el enlace (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#mcr-1), los estudios epidemiológicos han sugerido que mcr-1 se restringe principalmente a no menos de diez especies de Enterobacterales (Ling et al., 2020).

El estudio de la región mcr-1 ha descrito más de 10 tipos de plásmidos que portan dicho gen(H. Liu et al., 2018). *Partridge et al.,* encontraron variantes plasmídicas implicados en la

diseminación de genes mcr-1: IncX4, Incl2, IncP, IncX1-IncX2, IncX3-IncX4, IncFII, Incl2-IncFIB, IncFI, IncHI1 e IncHI2(39), siendo los más predominaste IncHI2 e Incl2, seguidos de IncX4. Estos plásmidos portan mcr-1, así como otros genes de resistencia, lo que lleva a la transmisión de múltiples determinantes de resistencia a diversos antibióticos (Partridge et al., 2018).

6. METODOLOGÍA Y TÉCNICAS

6.1 **Métodos del objetivo 1:** Analizar las variantes del gen mcr en *E. coli* intrahospitalario existentes

6.1.1 *Técnicas de instrumentación de datos*

Este proyecto de investigación se dio gracias a una colaboración del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI). Se analizará los datos obtenidos de la colección de cepas del Centro Nacional de Referencia de Resistencia a los Antimicrobianos coordinación zonal 9, de la información se tabulará usando el sistema WHONET (Software for the Surveillance of Antimicrobial Susceptibility) evaluando los perfiles de susceptibilidad bacteriana analizando la presencia del gen mcr que confiere resistencia al colistin en dos aislados intrahospitalarios que se describen a continuación.

- **Muestra Código 1430 intrahospitalaria:**

Esta muestra, de origen rectal, ha resultado positiva para la presencia de *Escherichia coli.* Además, se ha identificado a través de técnicas de microbiología convencional como perfil de susceptibilidad, junto con las pruebas fenotípicas que el microorganismo presenta resistencia tanto a las carbapenemasas como a la colistina, en ambas pruebas de resistencia. Este hallazgo es de particular interés ya que señala la presencia de una cepa de *Escherichia coli.* con un perfil de resistencia a múltiples antibióticos, lo que plantea desafíos en la selección de tratamientos efectivos.

- **Muestra Código 0449 intrahospitalaria:**

Correspondiente a una muestra de sangre, también ha sido positiva para *Escherichia coli.* Similarmente a la muestra anterior, se ha confirmado la resistencia al grupo de antibióticos carbapenemasas y a la colistina en las pruebas correspondientes. La detección de *Escherichia coli.* resistente en una muestra sanguínea subraya la importancia crítica de la vigilancia microbiológica, especialmente en contextos de infecciones sistémicas que pueden comprometer seriamente la salud del paciente.

En resumen, ambos análisis destacan la emergencia de cepas de *Escherichia coli* con resistencia a los antibióticos carbapenemasas y colistina, subrayando la necesidad de estrategias de manejo y tratamiento adaptadas a este perfil de resistencia.

6.1.2 Secuenciación

Se realizó una extracción de ADN de dos cultivos puro con un kit comercial QIAamp DNA Min (QIAGEN, Hilden, Alemania), siguiendo las directrices del fabricante posterior a ello se llevó a cabo la preparación de las bibliotecas, se utilizaron 400 ng de ADN genómico

siguiendo el protocolo DNAPrep (Ilumina, CA, EE.UU.), de acuerdo con las directrices del fabricante. La secuenciación se dio por pares (2 ×300 pb) en una plataforma MiSeq de Illumina (Illumina, CA, EE.UU.) utilizando una célula de flujo Micro V294.

6.2 Métodos del objetivo 2: Identificar los grupos de incompatibilidad de plásmidos asociados con los genes mcr encontrados

6.2.1 Técnica de procesamiento y análisis de datos

El material genético de *Escherichia coli* se envió a secuenciar centro de referencia nacional de genómica, secuenciación y bioinformática del del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI).

El proceso inició con la extracción y purificación de DNA, utilizando el kit QIAamp DNA Mini, posteriormente se procedió a cuantificar el material genético extraído de cada una de las muestras, se garantizó que el proceso de secuenciación sea normalizado iniciando con la cantidad de DNA adecuada. Las librerías fueron preparadas siguiendo el protocolo de Illumina DNAPrep que permite la secuenciación del genoma completo en fragmentos de 600 pb paired-end, amplificados por PCR.

Las muestras fueron secuenciadas en el equipo de secuenciación MiSeq de Illumina, en donde se obtuvieron los archivos de lectura primaria en formato fastq para su posterior análisis bioinformático.

6.2.2 Análisis Bioinformático

Los datos de secuenciación obtenidos en archivos FASTQ fueron cargados al servidor de CEDIA. Accediendo a infraestructura de alto rendimiento que incluye servidores y almacenamiento escalable, esencial para manejar grandes volúmenes de datos generados a través de línea de comandos ver Anexo 1.

Una vez culminado el procesamiento, se realizó un análisis bioinformático de las muestras empleando distintas aplicaciones como se describen en la Tabla1.

Tabla 1. Herramientas bioinformáticas disponibles.

Herramienta	***Versión***	***Aplicación***	***Links***	***Referencia***
Galaxy	*21.05.1*	*Análisis computacionales bioinformáticos a través de la web.*	*https://galaxyproject.org*	(Afgan et al., 2018)
Trimmomatic	*0.39.0*	*Recorte para datos pareados en un extremo y de emparejado simple provenientes de trabajo con ilumina.*	*http://www.usadellab.org/cms/index.php?page=trimmomatic*	(Bolger et al., 2014)
FastQC	*0.12.1*	FastQC proporciona una forma sencilla de realizar algunas comprobaciones de control de calidad.	*http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc*	(Andrews, 2010)
Multi QC	*1.11*	Toma los resultados de múltiples análisis y crea un informe que se puede ver como una sola.	*https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354*	(Ewels et al., 2016)
SPAdes	*3.15.4*	Ensamblador de genomas de alta calidad.	*http://cab.spbu.ru/software/spades/*	(Bankevich et al., 2012)
Quast	*5.2.0*	Herramienta de evaluación de calidad. La herramienta evalúa los ensamblajes del genoma mediante el cálculo de varias métricas.	*http://quast.sourceforge.net/quast*	(Gurevich et al., 2013)
Prokka	*1.14.6*	Prokka es una herramienta de software para anotar rápidamente genomas bacterianos, arqueales y virales, y producir archivos de salida que solo requieren pequeños ajustes para enviarlos a GenBank / ENA / DDBJ.	*http://www.vicbioinformatics.com/software.prokka.shtml*	(Seemann, 2014)

Herramienta	*Versión*	*Aplicación*	*Links*	*Referencia*
Kraken	*1.1.1*	Clasificador taxonómico rápido usando k-mer en memoria búsqueda de lecturas metagenómicas contra una base de datos construido a partir de múltiples genomas.	*https://ccb.jhu.edu/software/kraken/*	(Wood & Salzberg, 2014)
Krona	*2.7.1*	Esta herramienta representa los resultados de un perfil metagenómico como un gráfico circular ampliable utilizando Krona.	*https://galaxy.pasteur.fr/tool_runner?tool_id=toolshed.pasteur.fr/repos/odoppelt/kronatools/taxonomy_krona_chart/2.0.0*	(Ondov et al., 2011)
StarAMR	*2.23.0*	StarAMR escanea los contigs del genoma bacteriano en las bases de datos ResFinder, PlasmidFinder y PointFinder (utilizadas por sus respectivos servicios web) y compila un informe resumido de los genes de resistencia a los antimicrobianos detectados.	*https://openebench.bsc.es/tool/staramr*	(Bharat et al., 2022)
PlasmidFinder	*2.1*	Identifica plásmidos en aislados secuenciados totales o parciales de bacterias.	*https://cge.food.dtu.dk/services/PlasmidFinder/*	(Carattoli et al., 2014)
ResFinder	*4.0*	Identificación de genes de resistencia a antibióticos adquiridos.	*https://cge.cbs.dtu.dk//services/ResFinder/*	(Bortolaia et al., 2020)
Geneious	*9.05*	Geneious tiene todas las herramientas de biología molecular y análisis de secuencias, circularización de plásmidos.	*www.geneious.com*	(Biomatters development team, 2005)
PlasmidSPAdes	*3.15.4*	PlasmidSPAdes toma como entrada lecturas de extremo emparejado, pares de relación de posición y lecturas simples (no emparejadas) en FASTA y FASTQ para identificar plasmidos.	*http://cab.spbu.ru/software/spades/*	(Antipov et al., 2016)
BV-BRC bacterial and viral bioinformatics resource center	*3.32.13 a*	Centro de recursos de análisis y base de datos bioinformáticos viral y bacteriana.	*https://www.bv-brc.org/*	(Davis et al., 2020)

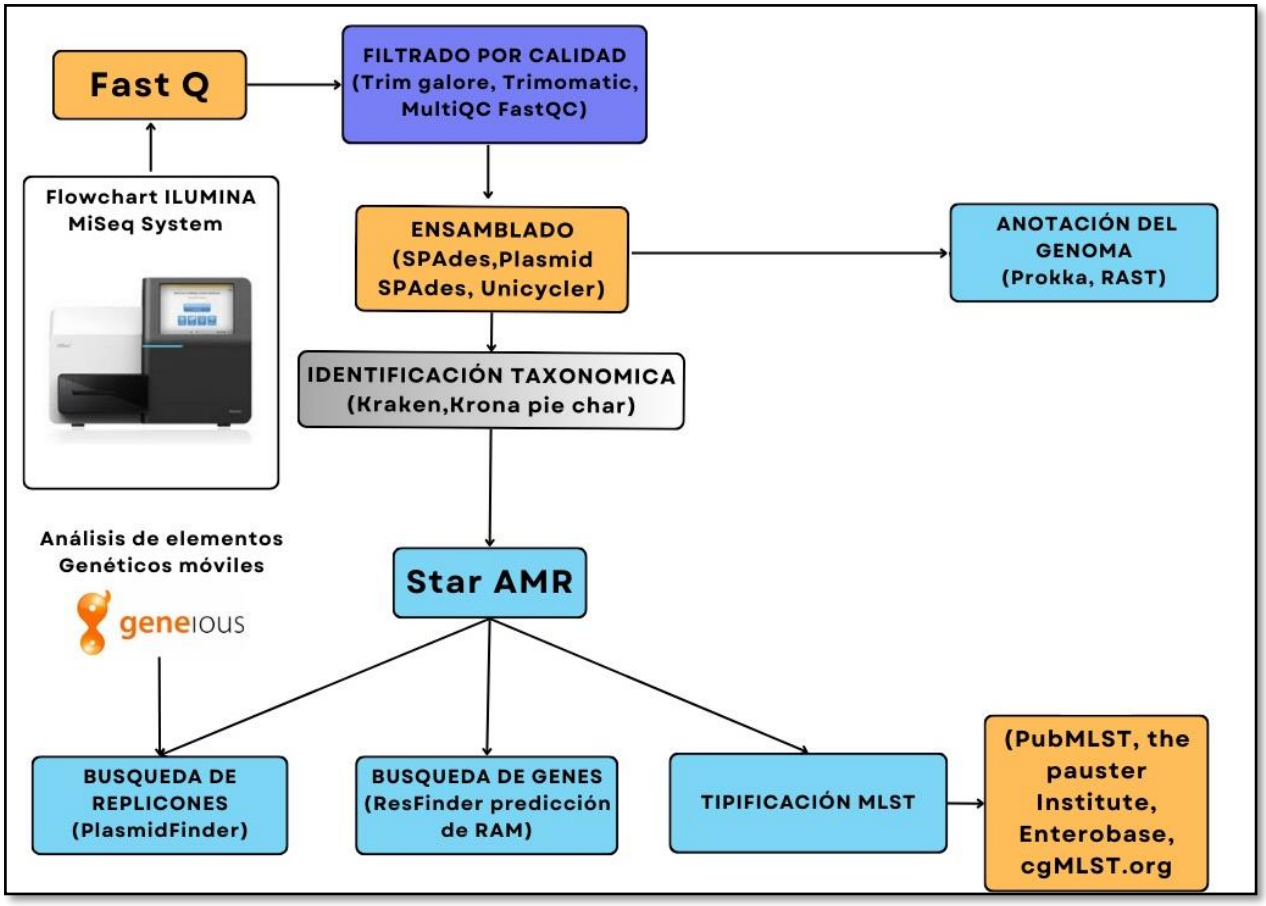


Ilustración 1.Flujo de trabajo con sus respectivos Software y algoritmos utilizados para el proceso de secuenciación que se divide en categorías y describe el proceso de análisis de secuencias de lectura corta.

a) Control de calidad de secuencias intrahospitalarias

El control de calidad de datos de las secuencias obtenidas del equipo MiSeq de Illumina, se realizaron con la herramienta *FastQC v0.12.1.* La herramienta permite analizar la distribución de score y read de las muestras proporcionando un informe rápido de los datos en conjunto dándonos a conocer si existe inconvenientes de calidad de secuencias (Andrews, 2010).

b) Recorte, limpieza y reevaluación de la calidad de secuencias intrahospitalarias.

Para el recorte de secuencias, la eliminación de adaptadores y el recorte de bases de baja calidad de Illumina paired-end, se utilizó un script con la herramienta Trimmomatic v0.39.0 (Bolger et al., 2014). Posteriormente se procedió a la reevaluación de la calidad de las secuencias, tal como se muestra en la sección de resultados de la Ilustración 2 y 3.

c) Ensamblaje análisis de calidad y Anotación de genomas de secuencias intrahospitalarias

Una vez realizada la correcta eliminación de adaptadores con su respectivo recorte de bases de baja calidad. Se realizó el ensamblaje con la herramienta SPAdes v3.15.4 que toma como entrada lecturas emparejadas (pareadas) y lecturas individuales (no emparejadas) en formato FASTAQ para ejecutar la corrección de errores de lecturas al ensamblarlas (Bankevich et al., 2012). Posteriormente evaluamos la calidad del ensamblaje del genoma mediante la herramienta QUAST.

Los parámetros de anotación de las secuencias de interés ensambladas se los comparo con el genoma de referencia *Escherichia coli O157:H7* str. Sakai (Cho et al., 2014). El código Genoma ID 386585.154 fue comparado bajo los recursos y análisis de bases de datos de BV-BRC 3.33.16 bacterial and viral bioinformatics resource center PARTIC (Davis et al., 2020). Predicción rápida de genomas procarióticos obtenidas mediante la herramienta de software Prokka (Seemann, 2014).

d) Identificación Taxonómica

Una vez comprobada la calidad de ensamblaje *de novo* con el uso de SPAdes se obtuvieron fragmentos *(contigs)* en archivo tipo FASTA, posteriormente se realizó un análisis para la asignación de etiquetas taxonómicas a las secuencias cortas de ADN usando la herramienta bioinformática Kraken (Wood & Salzberg, 2014).

La interpretación de los análisis obtenidos con la herramienta Kraken fueron representados en un perfil metagenómico, se utilizó la base de datos SILVA databases for ARB for small (16S/18S) (Quast et al., 2013). La interpretación se obtuvo en forma de una gráfica circular ampliable utilizando Krona (Ondov et al., 2011).

c) Análisis de genes de resistencia

Con el uso de la herramienta StarAMR (Bharat et al., 2022) se realizó el escaneo de contigs de genomas bacterianos contra las bases de datos ResFinder, PointFinder, y PlasmidFinder 2.0 (usadas por el servicio web ResFinder y otros servicios web ofrecidos por el Center for Genomic Epidemiology) y compilar un informe resumido de genes de resistencia antimicrobiana detectados al analiza los datos de ensamblaje *de novo* obtenidos en la herramienta SPAdes para las dos cepas intrahospitalarias.

6.3 Métodos del objetivo 3: Analizar las islas genómicas asociada al gen mcr que proporcionan transferencia de resistencia

6.3.1 Análisis Plasmídicos.

Para la correcta identificación de plásmidos, fue imprescindible seleccionar una herramienta adecuada que facilitara la detección de estos elementos genéticos. En este contexto, se optó por utilizar PLASMIDSPADES, una herramienta que implementa un algoritmo de cobertura de lectura de contigs. Este algoritmo es fundamental para diferenciar entre plásmidos y cromosomas, dado que la plataforma de secuenciación de ADN Illumina, comúnmente utilizada, produce lecturas con una cobertura altamente uniforme de los cromosomas bacterianos. Sin embargo, la cobertura de los plásmidos puede variar, siendo mayor o menor que la de los cromosomas, en función del número de copias del plásmido presente. Por lo tanto, un componente se clasifica como plasmídico si forma parte de un único bucle en el grafo de ensamblaje con una longitud mínima de minCirc (por defecto, 1 kb) o si su tamaño excede minCompSize (establecido por defecto en 10 kb), transformando así el grafo de ensamblaje en un grafo plasmídico.

La identificación de un plásmido, o de un componente plasmídico, se considerará precisa si sus contigs han sido previamente anotados como plasmídicos y, además, si coinciden en al menos el 90% con la fracción plasmídica esperada. Para validar esta coincidencia, se realiza un análisis comparativo con plásmidos ya anotados, empleando la base de datos de nucleótidos NCBI y el servicio web BLAST. En este análisis, se considera una coincidencia exitosa si la secuencia presenta al menos un 80% de identidad o contiene genes que son característicos de plásmidos.

Para análisis plasmídicos se procedió a el análisis de contigs en formato FASTA. Los archivos fueron cargados al programa Geneious 9.0.5 (Biomatters development team, 2005), en el

cual se hizo el uso de la herramienta "Ensamblado de *novo*" sin un genoma de referencia, con la finalidad de cerrar brechas entre los contigs obtenidos y conseguir una secuencia consenso.

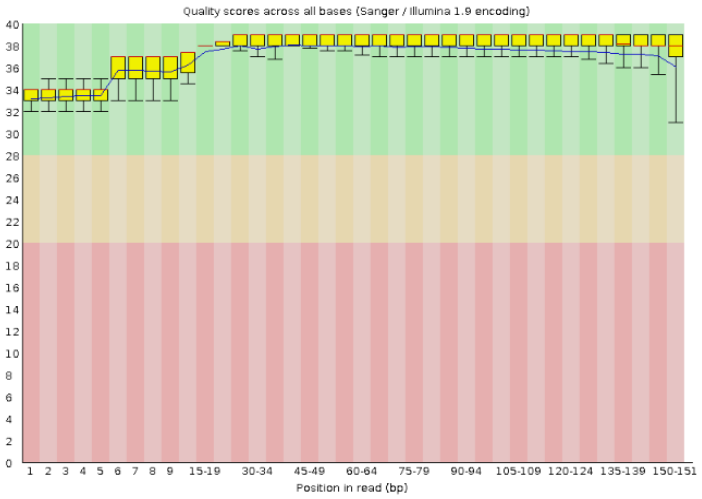
Finalmente, es importante resaltar que para este estudio se trabajó únicamente con los contigs en los cuales se identificó el gen de interés que es mcr, los cuales fueron circularizados y anotados en su totalidad.

Se realizará el análisis de las secuencias tomando en cuenta los fragmentos (ISApl1-mcr, -pap2- ISApl1) analizados de secuencias de referencia publicadas en GenBank.

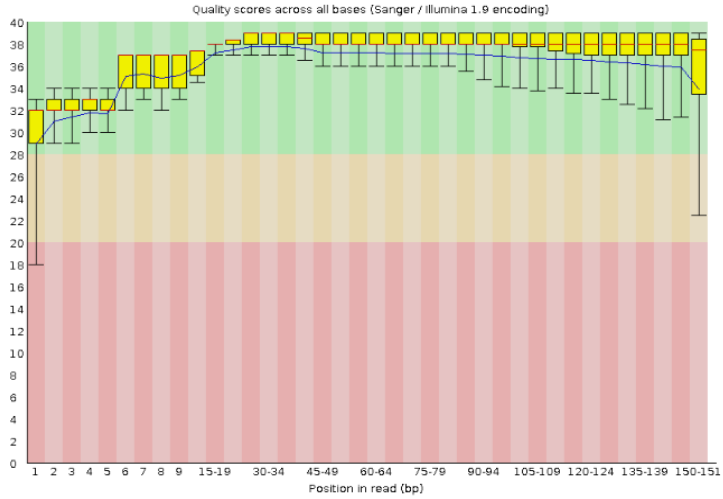
7. RESULTADOS

7.1 Control de calidad de secuencias

Mediante la herramienta FastQC se detectaron 616.889 secuencias con una longitud de 35-155 pares de bases para la secuencia 449 no obstante, para la secuencia 1430 se detectaron 603.747 secuencias con una longitud de 30-131 pares de base, el análisis arrojó una calidad media mayor 30 como se muestran en la Ilustración 2 y 3. Los dos genomas secuenciados arrojan rangos de calidad óptimos.

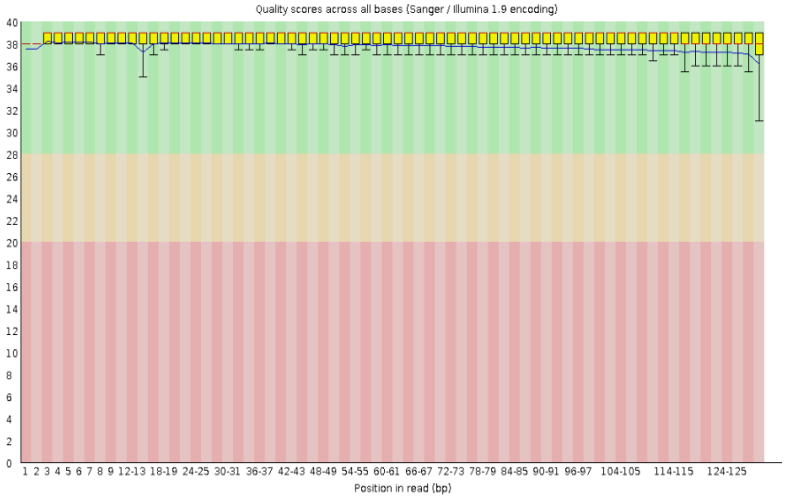


Measure	Value
Filename	499_S1_L001_R1_001.fastq
File type	Conventional base calls
Encoding	Sanger / Illumina 1.9
Total Sequences	616889
Total Bases	89.9 Mbp
Sequences flagged as poor quality	0
Sequence length	35-151
%GC	50

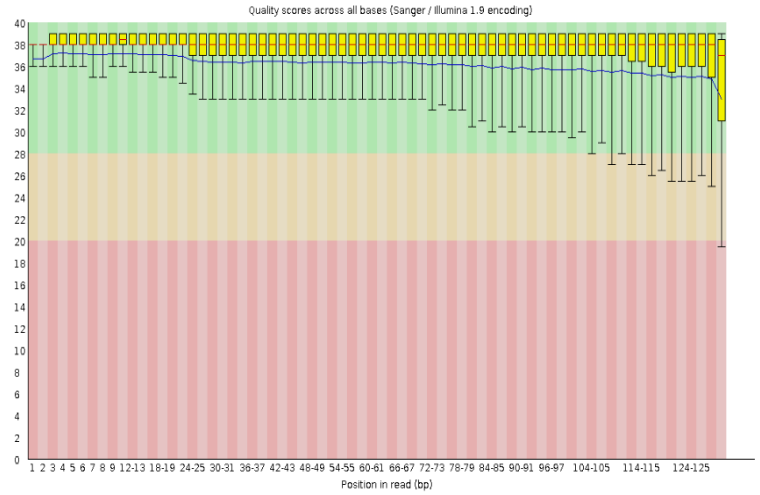


Measure	Value
Filename	499_S1_L001_R2_001.fastq
File type	Conventional base calls
Encoding	Sanger / Illumina 1.9
Total Sequences	616889
Total Bases	89.9 Mbp
Sequences flagged as poor quality	0
Sequence length	35-151
%GC	50

Ilustración 2. Limpieza de secuencias, evaluación y control de la calidad de las secuencias forward y reverse por base de aislamiento bacteriano intrahospitalario 499, empleando las herramientas bioinformáticas Trimmomatic y fastQC.



Measure	Value
Filename	1430_R1_paired_fq_gz.gz
File type	Conventional base calls
Encoding	Sanger / Illumina 1.9
Total Sequences	603747
Total Bases	77.2 Mbp
Sequences flagged as poor quality	0
Sequence length	30-131
%GC	50



Measure	Value
Filename	1430_R2_paired_fq_gz.gz
File type	Conventional base calls
Encoding	Sanger / Illumina 1.9
Total Sequences	603747
Total Bases	77.2 Mbp
Sequences flagged as poor quality	0
Sequence length	30-131
%GC	50

Ilustración 3. Limpieza de las secuencias, evaluación de control de la calidad de las secuencias forward y reverse por base de aislamiento bacteriano intrahospitalario 1430, empleando las herramientas bioinformáticas Trimmomatic y fastQC.

7.2 Ensamble de Secuencias

Como resultado del ensamblaje *de novo* (Bankevich et al., 2012) se obtuvieron dos archivos en formato FASTA que corresponden a Contigs y Scaffolds. Posteriormente se evaluó la calidad del ensamblaje del genoma mediante la herramienta QUAST.

El análisis dio como resultado métricas generales para la muestra 499 al realizar el *Compare Assembled* y *Contig distribution* que determino la cantidad de 94 contigs mayores o iguales a 1000 pares de base, 49 contigs mayor a 10 000 pb y 31 contigs mayor a 50 000 pb. El contig con mayor dimensión obtenido fue de 449 767 pb y un N50 de 180 659 pb, tal como se muestra en la sección de resultados de la Ilustración 4.

Statistics without reference	contigs
# contigs	111
# contigs (>= 0 bp)	219
# contigs (>= 1000 bp)	94
# contigs (>= 5000 bp)	62
# contigs (>= 10000 bp)	49
# contigs (>= 25000 bp)	43
# contigs (>= 50000 bp)	31
Largest contig	449 767
Total length	5 375 860
Total length (>= 0 bp)	5 399 487
Total length (>= 1000 bp)	5 364 216
Total length (>= 5000 bp)	5 303 027
Total length (>= 10000 bp)	5 212 772
Total length (>= 25000 bp)	5 129 759
Total length (>= 50000 bp)	4 707 383
N50	180 659
N90	38 875
auN	191 751
L50	11
L90	35
GC (%)	50.38
Mismatches	
# N's per 100 kbp	0
# N's	0

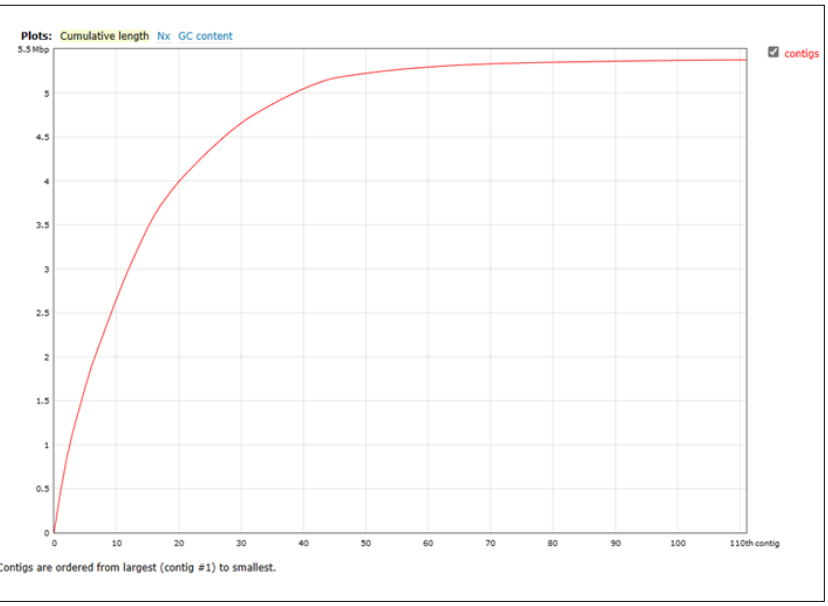
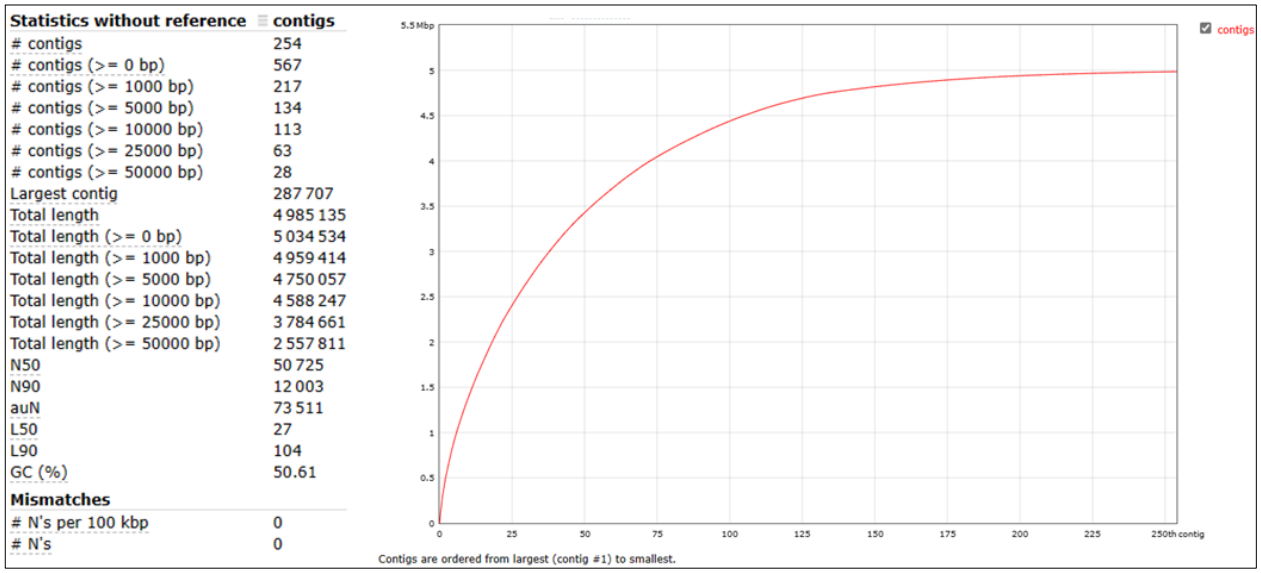


Ilustración 4. Análisis de calidad de ensamblaje obtenido mediante SPAdes y analizados en la herramienta de evaluación de la calidad de los ensamblajes del genoma QUAST que basa sus en contigs de tamaño >= 500 pb de secuencia de aislamiento genoma 1430.

Los resultados de métricas generales para la muestra 1430 al realizar un *Compare Assembled* y *Contig distribution* determinaron la cantidad de 217 contigs mayores o iguales a 1000 pares de base, 113 contigs mayor a 10 000 pb y 28 contigs mayor a 50 000 pb. El contig con mayor dimensión obtenido fue de 287 707 pb y un N50 de 50 725 pb, tal como se muestra en la sección de resultados de la Ilustración 5.



Statistics without reference	contigs
# contigs	254
# contigs (>= 0 bp)	567
# contigs (>= 1000 bp)	217
# contigs (>= 5000 bp)	134
# contigs (>= 10000 bp)	113
# contigs (>= 25000 bp)	63
# contigs (>= 50000 bp)	28
Largest contig	287 707
Total length	4 985 135
Total length (>= 0 bp)	5 034 534
Total length (>= 1000 bp)	4 959 414
Total length (>= 5000 bp)	4 750 057
Total length (>= 10000 bp)	4 588 247
Total length (>= 25000 bp)	3 784 661
Total length (>= 50000 bp)	2 557 811
N50	50 725
N90	12 003
auN	73 511
L50	27
L90	104
GC (%)	50.61
Mismatches	
# N's per 100 kbp	0
# N's	0

Ilustración 5. Análisis de calidad de ensamblaje obtenido mediante SPAdes y analizados en la herramienta de evaluación de la calidad de los ensamblajes del genoma QUAST que basa sus en contigs de tamaño >= 500 pb de secuencia de aislamiento genoma 449.

7.3 Anotación de Genomas

Las anotaciones del genoma y los parámetros de anotación de las secuencias de interés ensambladas se los compararon con el genoma de referencia *Escherichia coli O157:H7* str. Sakai (Cho et al., 2014). El código Genoma ID 386585.154 fue comparado bajo los recursos y análisis de bases de datos de BV-BRC 3.33.16 bacterial and viral bioinformatics resource center PARTIC (Davis et al., 2020), la cual transfiere anotaciones previas realizadas en el genoma seleccionado por el porcentaje de identidad y cobertura que comparten con las secuencias consenso obtenidas de las muestras 499 y 1430, tal como se muestra en Tabla 2.

Tabla 2 Predicción de Anotaciones obtenidas mediante la herramienta de predicción Prokka, en la aplicación bioinformática BV-BRC 3.33.16 a) Escherichia coli Anotación449 Longitud: 5034534bp, Longitud: 567 ; b) Escherichia coli Anotación1430 Longitud: 5399487b

a) Escherichia coli. Anotación449 Longitud: 5034534bp, Longitud: 567

INFORMACIÓN GENERAL	DESCRIPCIÓN
Identificación del genoma	562.137.178
Nombre del genoma	Escherichia coli Anotación449
Información de taxonomía	**Descripción**
Identificación taxón	562
Super reino	Gérmenes
Filo	Proteobacterias
Clase	Gammaproteobacterias
Orden	Enterobacterales
Familia	Enterobacteriaceae
Género	Escherichia
Especie	*Escherichia coli*
Estado	**Descripción**
Estado del genoma	WGS
Información de tipo	**Descripción**
MLST (en inglés)	MLST. Escherichia_coli_1.2172
Estadística del genoma	**Descripción**
Contigs	567
Longitud del genoma	5034534
Contenido de GC	50.631.638
Contig L50	28
Contig N50	50566
Estadísticas de anotación	**Descripción**
ARNt	56
ARNr	3
CDS	5238
CDS Ratio	10.404.141
CDS hipotético	677
Ratio hipotética de CDS	0.28331423
PLFAM CDS	4980
PLFAM CDS Ratio	0.95074457
Calidad del genoma	**Descripción**
Consistencia gruesa	99.6
Consistencia fina	98.5
Integridad de CheckM	100
Contaminación CheckM	0.2
Calidad del genoma	Bien

b) Escherichia coli. Anotación1430 Longitud: 5399487bp, Longitud: 219

INFORMACIÓN GENERAL	DESCRIPCIÓN
Identificación del genoma	562.137.179
Nombre del genoma	Escherichia coli Anotación1430
Información de taxonomía	**Descripción**
Identificación taxón	562
Super reino	Gérmenes
Filo	Proteobacterias
Clase	Gammaproteobacterias
Orden	Enterobacterales
Familia	Enterobacteriaceae
Género	Escherichia
Especie	*Escherichia coli*
Estado	**Descripción**
Estado del genoma	WGS
Información de tipo	**Descripción**
MLST (en inglés)	MLST. Escherichia_coli_2.632
Estadística del genoma	**Descripción**
Contigs	219
Longitud del genoma	5399487
Contenido de GC	5.039.099
Contig L50	11
Contig N50	180659
Estadísticas de anotación	**Descripción**
ARNt	64
ARNr	4
CDS	5502
CDS Ratio	10.189.857
CDS hipotético	769
Ratio hipotética de CDS	0.29661942
PLFAM CDS	5265
PLFAM CDS Ratio	0.95692474
Calidad del genoma	**Descripción**
Consistencia gruesa	99.6
Consistencia fina	98.2
Integridad de CheckM	100
Contaminación CheckM	0.2
Calidad del genoma	Bien

7.4 Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica La interpretación de los análisis obtenidos con la herramienta Kraken fueron representados en un perfil metagenómico, se utilizó la base de datos SILVA databases for ARB for small (16S/18S)(Quast et al., 2013). La interpretación se obtuvo en forma de una gráfica circular ampliable utilizando Krona (Ondov et al., 2011) con una similitud del 96% de identidad para *Escherichia coli* en las muestras 499 y 1430, tal como se muestran en las Ilustraciones 6 y 7.

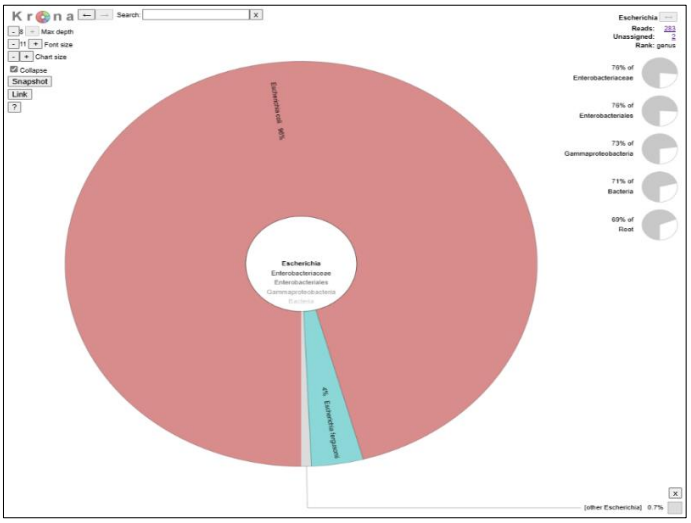


Ilustración 6. Representación perfil metagenómico en forma de una gráfica circular ampliable KRONA, genoma 449 con una identidad 96% para Escherichia coli.

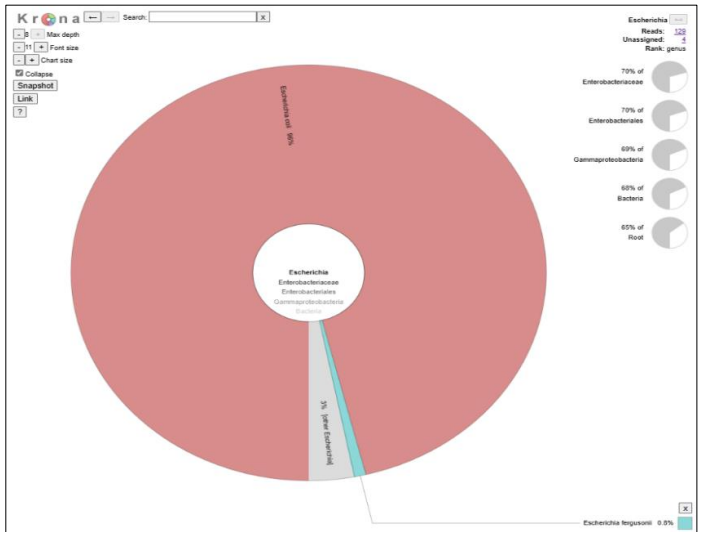


Ilustración 7. Representación perfil metagenómico en forma de una gráfica circular ampliable KRONA, genoma 1430 con una identidad 96% para Escherichia coli.

7.5 Análisis de genes de resistencia

Para los análisis de genes de resistencia a los antimicrobianos y mutaciones asociadas se usó la herramienta StarAMR (Bharat et al., 2022), el análisis determinó perfiles de resistencia, la identificación del tipo de plásmidos presentes, y la detección de mutaciones puntuales específicas que contribuyen a la resistencia.

Las bases de datos de referenciase permitió la búsqueda de contigs de genomas bacterianos se compararon contra las bases de datos ResFinder, PointFinder, y PlasmidFinder 2.0. Se identificaron varios genes de resistencia en los genomas de *Escharichia coli* 449 y 1430, esta información permitió comprender el espectro de resistencia del organismo.

Dentro de los principales genes asociados a la resistencia para la muestra 499 se encuentra la predicción fenotípica que detecta resistencia a: espectinomicina, kanamicina, ampicilina, ceftriaxona, amoxicilina/ ácido clavulánico, cefoxitina, meropenem, trimetoprima, cloranfenicol, fosfomicina, sulfisoxazol, tetraciclina y la presencia de fenotipo principal de nuestro estudio la resistencia a la colistina tal como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3 Identificación de genes de resistencia a antibióticos adquiridos en aislado intrahospitalario 449, detección de gen mcr-1.1 que confiere resistencia a colistin datos obtenidos de análisis Resfinder.

Isolate ID	Genotype	Predicted Phenotype	CGE Predicted Phenotype	Plasmid	Scheme	Sequence Type	Genome Length	N50 value	Number of Contigs
contigs449.fasta	ant(3'')-Ia, aph(3')-IIa, blaCTX-M-55, blaKPC-2, blaTEM-214, dfrA1, floR, fosA3, **mcr-1.1**, sitABCD, sul3, tet(A)	spectinomycin, kanamycin, ampicillin, ceftriaxone, amoxicillin/clavulanic acid, cefoxitin, meropenem, trimethoprim, chloramphenicol, fosfomycin, **colistin**, unknown[sitABCD_1_AY598030], sulfisoxazole, tetracycline	Streptomycin, Kanamycin, Neomycin, Amoxicillin, Ampicillin, Aztreonam, Cefepime, Cefotaxime, Ceftazidime, Ceftriaxone, Piperacillin, Ticarcillin, Amoxicillin+Clavulanic acid, Ampicillin+Clavulanic acid, Cefoxitin, Ertapenem, Imipenem, Meropenem, Piperacillin+Tazobactam, Ticarcillin+Clavulanic acid, Unknown Beta-lactam, Trimethoprim, Chloramphenicol, Florfenicol, Fosfomycin, **Colistin**, Hydrogen peroxide, Sulfamethoxazole, Doxycycline, Tetracycline	IncFIA, IncFIB(AP001918), IncFII(pHN7A8), IncI1-I(Alpha), **IncI2**, IncM1, IncN, IncX1	ecoli_achtman_4	2172	5034534	50566	286

Tabla 4 Identificación de plásmidos que confieren resistencia a antibióticos adquiridos en aislado intrahospitalario 449, detección de plásmido IncI2 con detección de contigs NODE_22 codificante para el gen mcr-1.1 que confiere resistencia a colistin datos obtenidos de Plasmidfinder.

Isolate ID	Plasmid	%Identity	%Overlap	HSP Length/Total Length	Contig	Start	End	Accession
contigs449.fasta	IncFIA	99,74	100	388/388	NODE_91_length_15125_cov_23.758129	4129	3742	AP001918
contigs449.fasta	IncFIB (AP001918)	98,39	100	682/682	NODE_68_length_22747_cov_23.151507	1211	1892	AP001918
contigs449.fasta	IncFII(pHN7A8)	100	86,15	224/260	NODE_241_length_607_cov_19.967391	607	384	JN232517
contigs449.fasta	IncI1-I(Alpha)	99,3	100	142/142	NODE_78_length_17856_cov_22.383742	15900	16041	AP005147
contigs449.fasta	**IncI2**	**100**	**100**	**324/324**	**NODE_22_length_60557_cov_15.021437**	**2953**	**2630**	**KP347127**
contigs449.fasta	IncM1	99,46	100	739/739	NODE_60_length_26087_cov_7.454210	10009	9271	U27345
contigs449.fasta	IncN	100	84,24	433/514	NODE_236_length_643_cov_43.146259	643	211	AY046276
contigs449.fasta	IncX1	98,4	100	374/374	NODE_156_length_3391_cov_23.397782	1301	928	EU370913

La Genotípificación de la muestra 499 arroja como resultado la presencia de genes: ant(3'')-Ia, aph(3')-IIa, blaCTX-M-55, blaKPC-2,blaTEM-214,dfrA1, floR, fosA3, sitABCD, sul3, tet(A) y el gen con variante mcr-1.1, tal como se muestra en la Tabla 4 y 5.

Tabla 5 Identificación de región del gen mcr 1.1 que confieren resistencia a antibióticos adquiridos en aislado intrahospitalario 449, detección de contigs NODE_22 codificante gen mcr-1.1 longitud 1626 pb obtenidos de análisis Pointfinder.

Isolate ID	Gene	Predicted Phenotype	CGE Predicted Phenotype	%Identity	%Overlap	HSP Length/Total Length	Contig	Start	End	Accession	CGE Notes
contigs449.fasta	ant (3'')-Ia	spectinomycin	Streptomycin	99,88	82,51	802/972	NODE_130_length_6553_cov_22.374731	1206	2007	X02340	Alternative name aadA, aad(3')(9), aadA1, aadA1a
contigs449.fasta	aph (3')-IIa	kanamycin	Kanamycin, Neomycin	100	100	795/795	NODE_170_length_2606_cov_19.647981	1092	298	V00618	
contigs449.fasta	blaCTX-M-55	ampicillin, ceftriaxone	Amoxicillin, Ampicillin, Aztreonam, Cefepime, Cefotaxime, Ceftazidime, Ceftriaxone, Piperacillin, Ticarcillin	100	100	876/876	NODE_181_length_2111_cov_22.089008	423	1298	DQ810789	Class A;Alternative name blaCTX-M-57
contigs449.fasta	**blaKPC-2**	**ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, cefoxitin, ceftriaxone, meropenem**	**Amoxicillin, Amoxicillin+Clavulanic acid, Ampicillin, Ampicillin+Clavulanic acid, Aztreonam, Cefepime, Cefotaxime, Cefoxitin, Ceftazidime, Ertapenem, Imipenem, Meropenem, Piperacillin, Piperacillin+Tazobactam, Ticarcillin, Ticarcillin+Clavulanic acid**	**100**	**100**	**882/882**	**NODE_67_length_23072_cov_7.180171**	**7597**	**8478**	**AY034847**	**Class A;Group 2f;Alternative name blaKPC-1**
contigs449.fasta	blaTEM-214	ampicillin	Unknown Beta-lactam	100	86,06	741/861	NODE_229_length_764_cov_165.827927	764	24	KP050491	Class A
contigs449.fasta	dfrA1	trimethoprim	Trimethoprim	99,79	100	474/474	NODE_176_length_2388_cov_19.069867	1782	2255	AJ238350	
contigs449.fasta	floR	chloramphenicol	Chloramphenicol, Florfenicol	98,19	99,92	1214/1215	NODE_167_length_2848_cov_19.974221	952	2165	AF118107	MFS transporter
contigs449.fasta	fosA3	fosfomycin	Fosfomycin	100	100	417/417	NODE_169_length_2606_cov_20.103881	2230	1814	AB522970	
contigs449.fasta	***mcr-1.1***	**colistin**	**Colistin**	**100**	**100**	**1626/1626**	**NODE_22_length_60557_cov_15.021437**	44938	43313	**KP347127**	
contigs449.fasta	sitABCD	unknown[sitABCD_1_AY598030]	Hydrogen peroxide	99,62	100	3459/3459	NODE_89_length_15483_cov_21.823697	15130	11681	AY598030	
contigs449.fasta	sul3	sulfisoxazole	Sulfamethoxazole	100	100	792/792	NODE_130_length_6553_cov_22.374731	4480	3689	AJ459418	
contigs449.fasta	tet(A)	tetracycline	Doxycycline, Tetracycline	99,92	97,8	1247/1275	NODE_187_length_1959_cov_122.035714	713	1959	AF534183	

Dentro de los principales genes asociados a la resistencia para la muestra 1430 se encuentra la predicción fenotípica que detecta resistencia a: estreptomicina, ampicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, cefoxitina, ceftriaxona, meropenem, cloranfenicol, trimetoprim, ciprofloxacino I/R, sulfisoxazol, tetraciclina y colistina como fenotipo principal de estudio.

La genotipificación de la muestra 1430 arroja como resultado la presencia de genes: aadA1, aadA2, blaKPC-2, blaOXA-9, blaTEM-79, cmlA1, dfrA12, floR, qnrB19, sitABCD, sul3, tet(A) y la variante del gen mcr-1.1, tal como se muestra en la Tabla 6.

7.6 Determinación de plásmidos

Utilizando PlasmidFinder 2.0. se detectó, en el NODE-22 de la muestra 499, al plásmido Incl2 asociado al gen mcr 1.1 con una identidad del 100%, tal como se muestra en la Tabla 4 y 5.

Para la muestra 1430 asociado al gen mcr 1.1 se describe la presencia del plásmido IncX4 con una identidad del 99.02% asociado al contig del NODE-31, Ver Tabla 6 y 7.

Tabla 6 Identificación de genes de resistencia a antibióticos adquiridos en aislado intrahospitalario 1430, detección de gen mcr-1.1 que confiere resistencia a colistin datos obtenidos de análisis Resfinder.

Isolate ID	Data	Data Type	Predicted Phenotype	CGE Predicted Phenotype	%Identity	%Overlap	HSP Length/Total Length	Contig	Start	End	Accession
contigs1430.fasta	IncFIB(AP001918)	Plasmid			98,39	100	682/682	NODE_49_length_10091_cov_14.007672	1889	2570	AP001918
contigs1430.fasta	IncFIB(pQil)	Plasmid			100	100	740/740	NODE_38_length_34295_cov_15.557155	10054	10793	JN233705
contigs1430.fasta	IncHI2	Plasmid			100	100	327/327	NODE_9_length_190096_cov_22.360075	157758	158084	BX664015
contigs1430.fasta	IncHI2A	Plasmid			99,52	100	630/630	NODE_9_length_190096_cov_22.360075	140331	139702	BX664015
contigs1430.fasta	IncI2(Delta)	Plasmid			98,42	100	316/316	NODE_36_length_38699_cov_10.806154	5056	4741	AP002527
contigs1430.fasta	**IncX4**	**Plasmid**			**99,02**	**100**	**712/712**	**NODE_31_length_52139_cov_12.973888**	**23602**	**24313**	**FN543504**
contigs1430.fasta	p0111	Plasmid			98,53	100	885/885	NODE_19_length_93643_cov_11.384547	67956	68840	AP010962
contigs1430.fasta	aadA1	Resistance	streptomycin	Spectinomycin, Streptomycin	100	100	792/792	NODE_55_length_7682_cov_35.586600	5285	4494	JQ414041
contigs1430.fasta	aadA2	Resistance	streptomycin	Spectinomycin, Streptomycin	100	95,73	784/819	NODE_55_length_7682_cov_35.586600	7682	6899	NC_010870
contigs1430.fasta	**blaKPC-2**	**Resistance**	**ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, cefoxitin, ceftriaxone, meropenem**	**Amoxicillin, Amoxicillin+Clavulanic acid, Ampicillin, Ampicillin+Clavulanic acid, Aztreonam, Cefepime, Cefotaxime, Cefoxitin, Ceftazidime, Ertapenem, Imipenem, Meropenem, Piperacillin, Piperacillin+Tazobactam, Ticarcillin, Ticarcillin+Clavulanic acid**	**100**	**100**	**882/882**	**NODE_28_length_62630_cov_15.520671**	**9611**	**8730**	**AY034847**
contigs1430.fasta	blaOXA-9	Resistance	ampicillin	Amoxicillin, Ampicillin	99,88	100	825/825	NODE_84_length_1228_cov_20.378517	108	932	KQ089875
contigs1430.fasta	blaTEM-79	Resistance	ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid	Amoxicillin, Amoxicillin+Clavulanic acid, Ampicillin, Ampicillin+Clavulanic acid, Piperacillin, Piperacillin+Tazobactam, Ticarcillin, Ticarcillin+Clavulanic acid	99,88	100	861/861	NODE_62_length_5005_cov_17.746465	1008	148	AF190692
contigs1430.fasta	cmlA1	Resistance	chloramphenicol	Chloramphenicol	99,84	100	1260/1260	NODE_55_length_7682_cov_35.586600	6637	5378	M64556
contigs1430.fasta	dfrA12	Resistance	trimethoprim	Trimethoprim	100	100	498/498	NODE_93_length_1047_cov_14.855847	968	471	AM040708

Isolate ID	Data	Data Type	Predicted Phenotype	CGE Predicted Phenotype	%Identity	%Overlap	HSP Length/Total Length	Contig	Start	End	Accession
contigs1430.fasta	floR	Resistance	chloramphenicol	Chloramphenicol, Florfenicol	98,19	99,92	1214/1215	NODE_52_length_8551_cov_22.678202	4123	2910	AF118107
contigs1430.fasta	**mcr-1.1**	**Resistance**	**colistin**	**Colistin**	**100**	**100**	**1626/1626**	**NODE_31_length_52139_cov_12.973888**	**8339**	**6714**	**KP347127**
contigs1430.fasta	qnrB19	Resistance	ciprofloxacin I/R	Ciprofloxacin	100	100	645/645	NODE_86_length_1211_cov_23.687716	329	973	EU432277
contigs1430.fasta	sitABCD	Resistance	unknown[sitABCD_1_AY598030]	Hydrogen peroxide	99,62	100	3459/3459	NODE_53_length_8445_cov_13.398808	355	3804	AY598030
contigs1430.fasta	sul3	Resistance	sulfisoxazole	Sulfamethoxazole	100	100	792/792	NODE_55_length_7682_cov_35.586600	2021	2812	AJ459418
contigs1430.fasta	tet(A)	Resistance	tetracycline	Doxycycline, Tetracycline	100	100	1275/1275	NODE_52_length_8551_cov_22.678202	1035	2309	AF534183

Tabla 7 Identificación de plásmidos que confieren resistencia a antibióticos adquiridos en aislado intrahospitalario 1430, detección de plásmido IncX4 con detección de contigs NODE_31 codificante para el gen mcr-1.1 que confiere resistencia a colistin datos obtenidos de Plasmidfinder

Isolate ID	Plasmid	%Identity	%Overlap	HSP Length/Total Length	Contig	Start	End	Accession
contigs1430.fasta	IncFIB(AP001918)	98,39	100	682/682	NODE_49_length_10091_cov_14.007672	1889	2570	AP001918
contigs1430.fasta	IncFIB(pQil)	100	100	740/740	NODE_38_length_34295_cov_15.557155	10054	10793	JN233705
contigs1430.fasta	IncHI2	100	100	327/327	NODE_9_length_190096_cov_22.360075	157758	158084	BX664015
contigs1430.fasta	IncHI2A	99,52	100	630/630	NODE_9_length_190096_cov_22.360075	140331	139702	BX664015
contigs1430.fasta	**IncI2(Delta)**	**98,42**	**100**	**316/316**	**NODE_36_length_38699_cov_10.806154**	**5056**	**4741**	**AP002527**
contigs1430.fasta	**IncX4**	**99,02**	**100**	**712/712**	**NODE_31_length_52139_cov_12.973888**	**23602**	**24313**	**FN543504**
contigs1430.fasta	p0111	98,53	100	885/885	NODE_19_length_93643_cov_11.384547	67956	68840	AP010962

7.8 Ensamblaje de plásmido portador del gen mcr

El análisis plasmídico se determinó mediante el análisis de contigs en formato FASTA. Los archivos fueron cargados al programa Geneious 9.0.5 (Biomatters development team, 2005) usando herramientas "Ensamblado *De Novo*" sin un genoma de referencia, esto con la finalidad de cerrar brechas entre los contigs obtenidos y conseguir una secuencia consenso. Finalmente, es importante resaltar que para este estudio se trabajó únicamente con los contigs en los cuales se identificó el gen de interés gen mcr, los cuales fueron circularizados y anotados en su totalidad. El resultado de los análisis de las secuencias se tomando en cuenta los fragmentos (ISApl1-mcr, pap2- ISApl1) analizados de secuencias de referencia publicadas en GenBank, tal como se indica en la Ilustración 8.

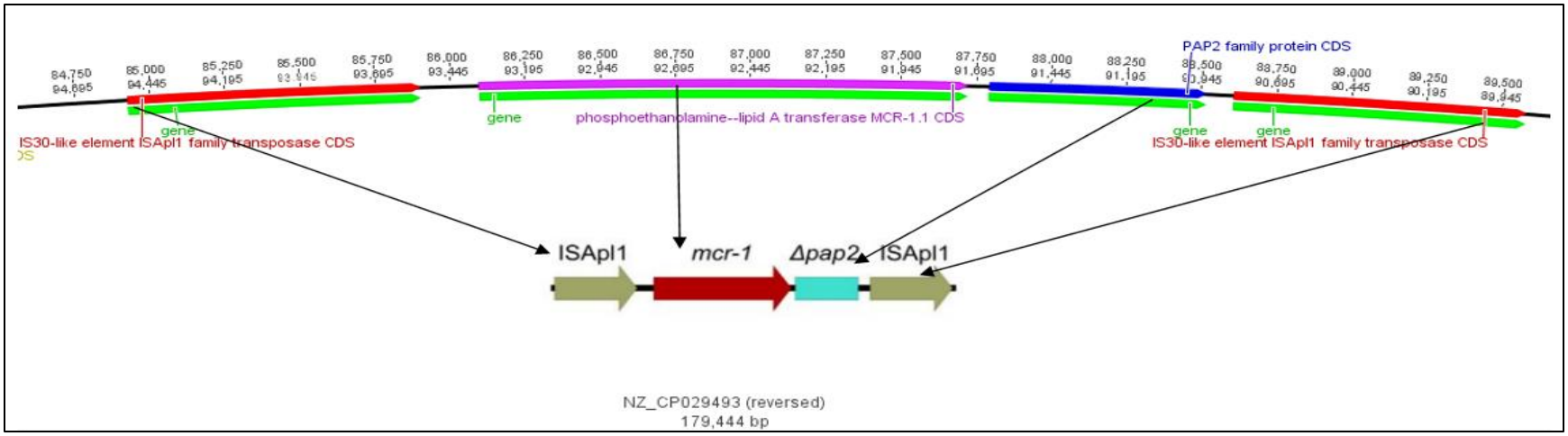


Ilustración 8. Análisis de secuencia modelo blanqueante interrumpida que toma en cuenta los fragmentos (ISApl1-mcr1.1, PAP2- ISApl1) referencias publicadas en GenBank accession NZ_CP029493. Se observa flanqueo de la secuencia de inserción ISApl1 está ubicada inmediatamente aguas arriba del gen mcr-1.1 seguido de un locus putativo pap2 que codifica la proteína de la familia PAPA2 que esta aledaño aguas abajo del gen mcr -1.1

Los dos aislados intrahospitalarios son portadoras del gen mcr-1.1. Se determinó también la presencia de carbapenemasas de tipo A promovida por gen blaKPC-2, tal como se indica en la Tabla 6 y 7.

Los dos asilados intrahospitalarios portadores de resistencia a colistina presentaron dos tipos diferentes de replicones plasmídicos estrechamente relacionados al gen mcr-1.1. el plásmido IncI2 para la muestra 499 y el plásmido IncX4 para la muestra 1430, tal como se indica en la Tabla 5 y 6 respectivamente. La Ilustración 9 y 10 muestra la diversidad de secuencias codificantes aguas arriba y aguas abajo que flanquean a mcr-1.1 en la circularización de los elementos genéticos móviles en Geneious 9.0.5.

En este estudio, *Escherichia coli* fue identificada como la especie portadora del gen mcr-1.1 en los dos aislamientos intrahospitalarios examinados. La construcción de una representación esquemática parcial de las secuencias que rodean al gen mcr-1.1 facilitó el análisis de los marcos abiertos de lectura, los cuales se indican mediante flechas que señalan su orientación correspondiente. Esto permitió realizar una comparación detallada de las relaciones genéticas entre tres variantes de *E. coli: E. coli 499 NODE_22, E. coli 1430 NODE_31, y E. coli NZ_cp029493,* tal y como se ilustra en la Figura 11.

Las resultados de los alineamientos múltiples *Geneious alignment* de secuencias del entorno genético del gen mcr1.1 en aislados de *Escherichia coli* intrahospitalaria determinaron que las dos secuencias de estudio no presentaron el transposón medido por SpApl1; E. coli 499 NODE_22 y E coli 1430 NODE_31, además presentan las secuencias el factor gen accesorio de la relaxasa nikB aguas arriba. Por último, se destaca la presencia de un locus putativo anotado como un gen que codifica PAP2 en *Escherichia coli* 1430 NODE_31 tal como se muestra en la ilustración 11 y 12 respectivamente.

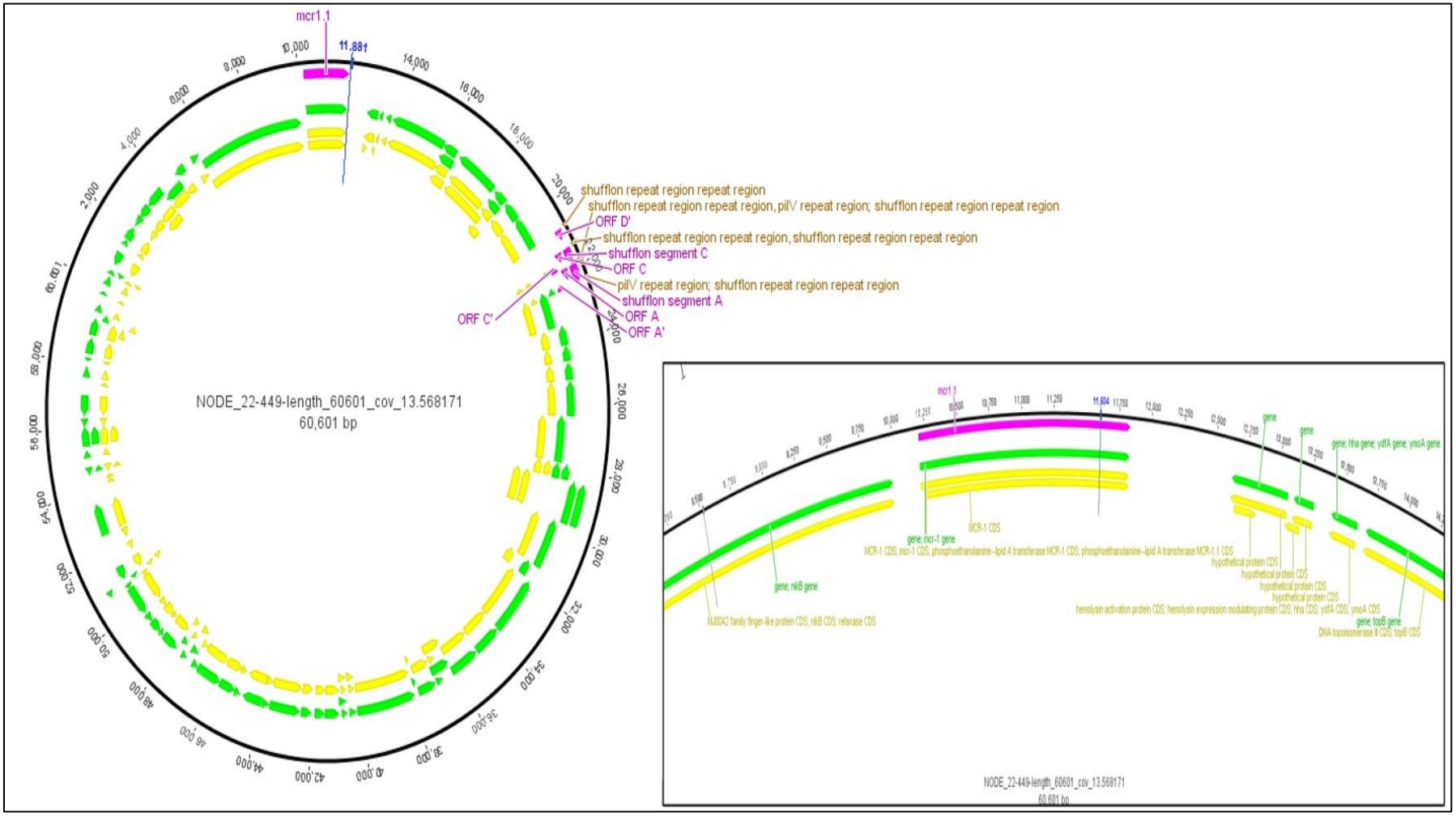


Ilustración 9. Circularización del NODE-22 muestra intrahospitalaria 449 con marcos de lectura con flechas de color verde; marcos de lectura secuencia NZ_CP029493 se representan con flechas de color amarillo que describen: genes relacionados con transposones, secuencias de inserción, regiones de repetición, genes de replicación, sistemas de estabilización del plásmido, genes que regulan la antirestricción, genes de integrasa y resolvasa. El gen de resistencia mcr 1.1 se describe de color lila.

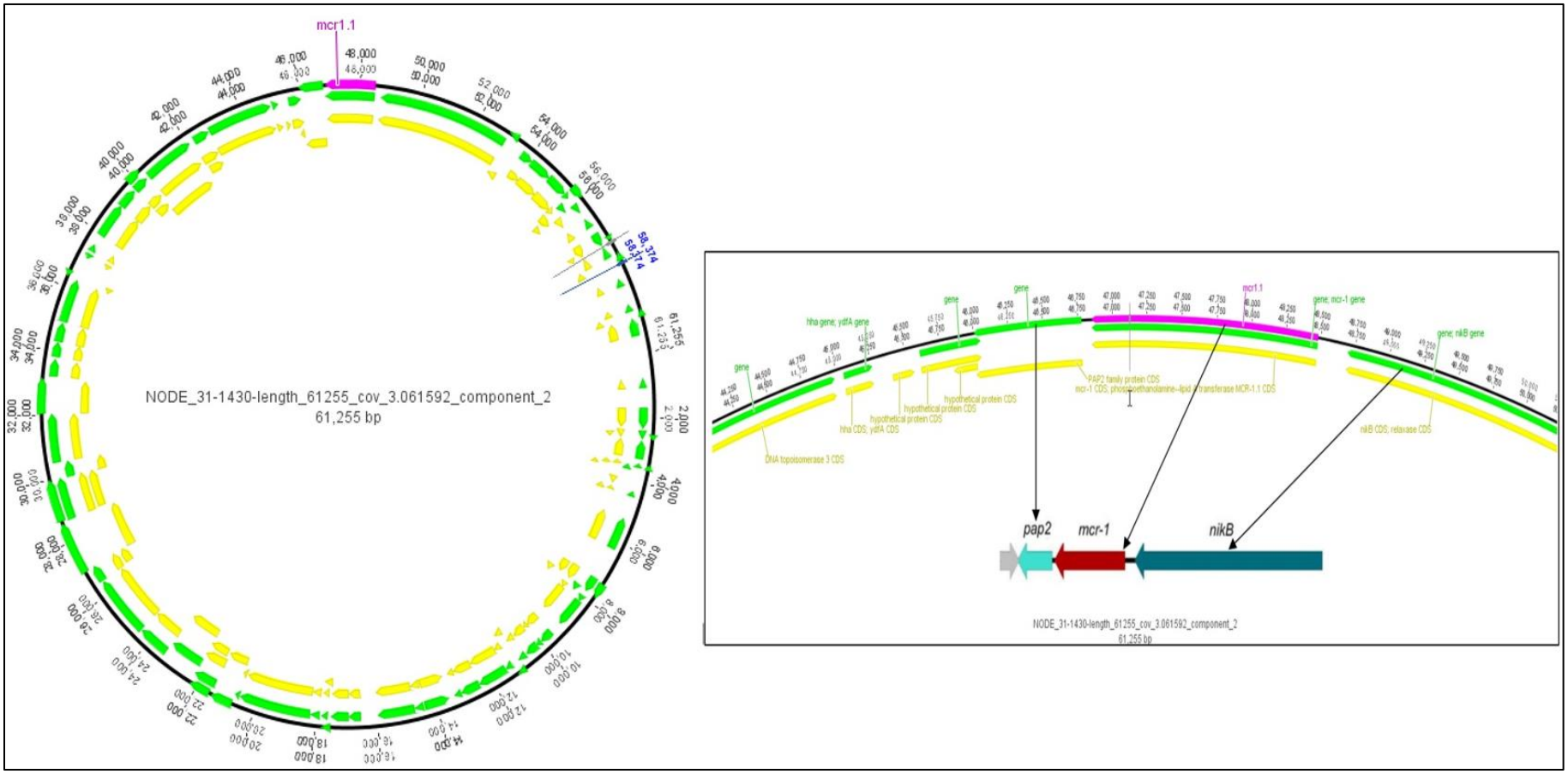


Ilustración 10. Circularización del NODE_31 muestra intrahospitalaria 1430 con marcos de lectura flechas de color verde; marcos de lectura secuencia NZ_CP029493 se representan con flechas de color amarillo que describen: genes relacionados con transposones, secuencias de inserción, regiones de repetición, genes de replicación, sistemas de estabilización del plásmido, genes que regulan la antirestricción, genes de integrasa y resolvasa. El gen de resistencia mcr 1.1 se describe de color lila.

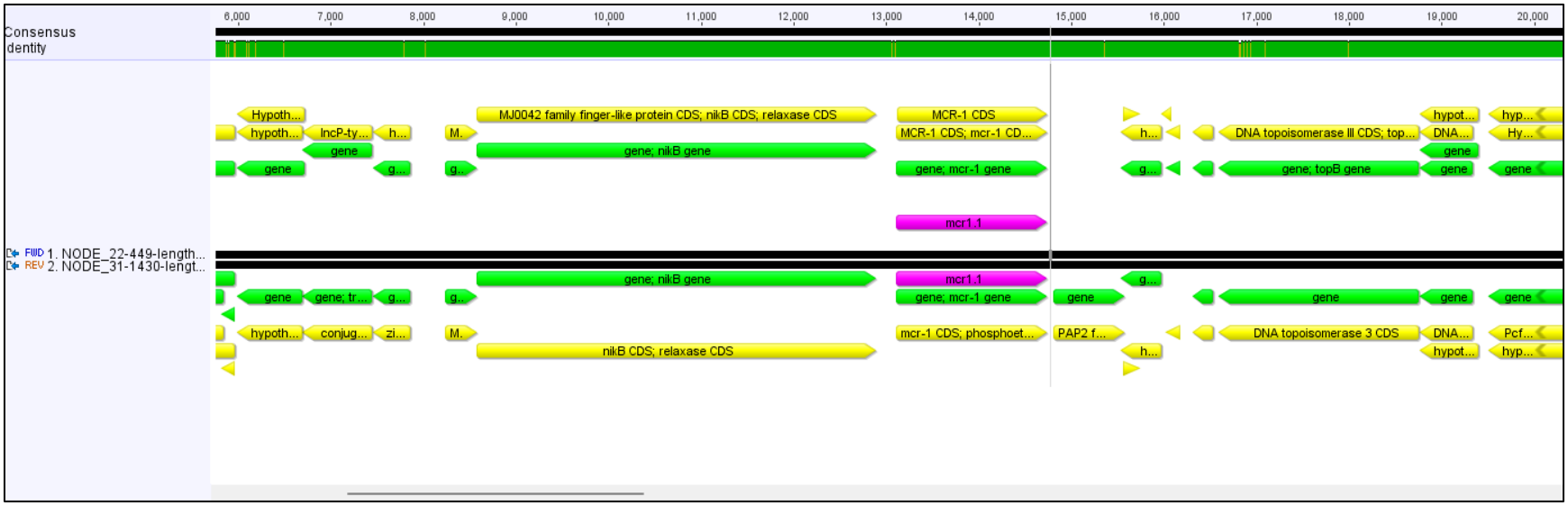


Ilustración 11. Alineamiento de secuencias del entorno genético del gen mcr1.1 en aislados de E.coli intrahospitalaria. Dentro de las dos secuencias no se encuentra presente el transposón medido por SpApl1; E. coli 499 NODE_22 y E coli 1430 NODE_31 presentan el factor gen accesorio de la relaxasa nikB aguas arriba. Además, se destaca la presencia de un locus putativo anotado como un gen que codifica PAP2 en E coli 1430 NODE_31.

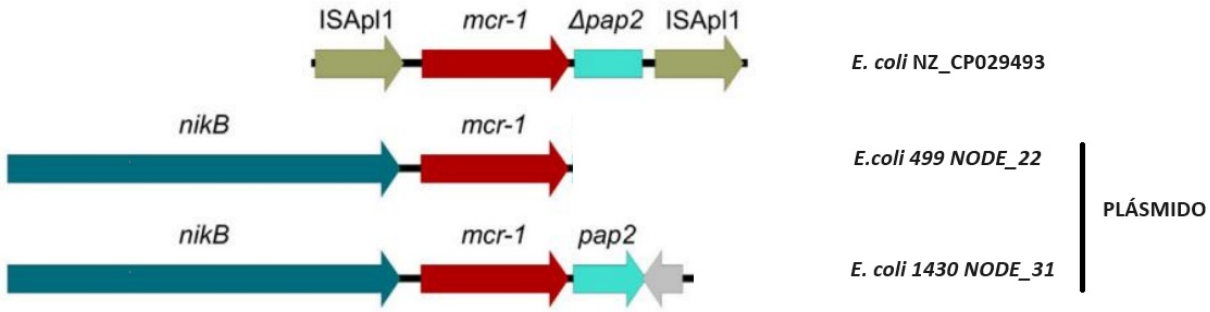


Ilustración 12. Representación parcial esquemático de las secuencias codificantes del entorno genético del gen mcr1.1 en aislados intrahospitalarios positivos para mcr. Los marcos de lectura (ORF) se ilustran con flechas que apuntan hacia su orientación respectiva permitiendo una comparación entre las relaciones genéticas de E. coli 499 NODE_22, E coli 1430 NODE_31 y E. coli NZ_cp029493.

8. CONCLUSIONES.

La creciente accesibilidad a métodos de secuenciación de ADN de próxima generación ha llevado a una explosión en la cantidad de secuencias de genomas bacterianos completos disponibles.

Los resultados de este análisis subrayan la importancia del estudio de los elementos genéticos móviles, y del uso de tecnologías de secuenciación de alto rendimiento para caracterizar patógenos bacterianos y comprender la evolución de la resistencia. La detección de *Escherichia coli* resistente en las dos muestras de origen rectal y sanguínea subraya la importancia crítica de la vigilancia microbiológica, especialmente en contextos de infecciones sistémicas que pueden comprometer seriamente la salud del paciente.

La transferencia horizontal de genes juega un papel importante en la adquisición de nuevas propiedades, como la patogenicidad y la resistencia a los antibióticos, lo que sustenta el gran potencial de adaptación de las bacterias, la disposición ISApl1-mcr1-pap2-ISApl1 sugiere el movimiento de una estructura compuesta de tipo transposón mediado por ISApl1, con la pérdida posterior de una o ambas copias de ISApl1 por recombinación al parecer puede evitar el movimiento posterior del gen mcr-1 estabilizando en un plásmido, tal como se describió en el presente trabajo.

Las secciones anteriores de esta revisión describen el diverso conjunto de herramientas de elementos genéticos móviles que las especies de interés explotan para acceder a un acervo genético extendido a fin de superar el desafío evolutivo que representa la quimioterapia antimicrobiana. El gen mcr-1.1 se encuentra como parte de un segmento aparentemente derivado de *Moraxella* sp.

que contiene un segmento anotado como un gen que codifica PAP2 como una proteína transmembrana de la familia PAP lo que facilitará la transferencia de mcr 1.1.

Los clones bacterianos exitosos o de alto riesgo son una fuente importante para la propagación de elementos genéticos móviles que confieren resistencia a los antimicrobianos, es decir, integrones, transposones y plásmidos. Estos clones son capaces de proporcionar plataformas estables para el mantenimiento y la propagación de genes responsables de la resistencia a los antimicrobianos y han desempeñado un papel esencial en la aparición mundial de resistencia a múltiples antibióticos.

La identificación de *Escherichia coli* como portadora del gen mcr-1.1 en ambos aislamientos intrahospitalarios resalta la importancia de monitorear la presencia y diseminación de genes de resistencia a antibióticos. La capacidad de comparar el entorno genético de diferentes cepas mediante representaciones esquemáticas parciales es crucial para entender las relaciones genéticas y la evolución de los mecanismos de resistencia. Este enfoque no solo profundiza nuestro conocimiento sobre la biología molecular de microorganismos patógenos, sino que también informa estrategias de intervención para combatir la resistencia a los antibióticos, un desafío creciente en la salud pública global.

9. RECOMENDACIONES

Para un ensamblaje preciso de genomas plasmídicos, es necesario combinar tecnologías de secuenciación de lecturas largas y cortas como son Illumina MiSeq y Oxford Nanopore. Esta metodología mejora el cierre de brechas entre nodos, siendo crucial para el ensamblaje eficiente de plásmidos de resistencia. Se aconseja utilizar estas tecnologías para asegurar una reconstrucción detallada del genoma plasmídico.

La distribución global de mcr-1 en poblaciones de *E.coli* enfatiza la importacia de pr evenir el uso excesivo o indebido de colistina a nivel regional tales como factor de crecimiento y el mantenimiento de animales de granjas se han mencionado en todo el mundo como un foco de afección. La mayoría de los plásmidos que portan el gen mcr-1.1 son transferibles en IncX4 e IncI2 son predominantes en todo mundo. Los programas de vigilancia de la resistencia a los antibióticos deben extenderse y existir programas que permitan reconocer la diseminación de elementos genéticos móviles del gen mcr que confiere la resistencia a la colistina a nivel intrahospitalario. Las características de las secuencias tipo de las cepas bacterianas contribuyen a la generación de datos epidemiológicos de utilidad, por ello debería generarse bases de datos en este tipo de análisis.

10. BIBLIOGRAFÍA

Afgan, E., Baker, D., Batut, B., Van Den Beek, M., Bouvier, D., Ech, M., Chilton, J., Clements, D., Coraor, N., Grüning, B. A., Guerler, A., Hillman-Jackson, J., Hiltemann, S., Jalili, V., Rasche, H., Soranzo, N., Goecks, J., Taylor, J., Nekrutenko, A., & Blankenberg, D. (2018). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Research*, *46*(W1), W537–W544. https://doi.org/10.1093/nar/gky379

Alanis, A. J. (2005). Resistance to antibiotics: Are we in the post-antibiotic era? In *Archives of Medical Research* (Vol. 36, Issue 6, pp. 697–705). https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.06.009

Aminov, R. I. (2010). A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in Microbiology*, *1*(DEC). https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00134

Andrews, S. (2010). *FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data*. Babraham Bioinformatics. https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/

Antipov, D., Hartwick, N., Shen, M., Raiko, M., Lapidus, A., & Pevzner, P. A. (2016). PlasmidSPAdes: Assembling plasmids from whole genome sequencing data. *Bioinformatics*, *32*(22), 3380–3387. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw493

Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Prjibelski, A. D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A., & Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell

sequencing. *Journal of Computational Biology*, *19*(5), 455–477. https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021

Bharat, A., Petkau, A., Avery, B. P., Chen, J., Folster, J., Carson, C. A., Kearney, A., Nadon, C., Mabon, P., Thiessen, J., Alexander, D. C., Allen, V., El Bailey, S., Bekal, S., German, G. J., Haldane, D., Hoang, L., Chui, L., Minion, J., … Mulvey, M. R. (2022). Correlation between Phenotypic and In Silico Detection of Antimicrobial Resistance in Salmonella enterica in Canada Using Staramr. *Microorganisms*, *10*(2). https://doi.org/10.3390/microorganisms10020292

Biomatters development team. (2005). *Geneious | Bioinformatics Software for Sequence Data Analysis*. https://www.geneious.com/

Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, *30*(15), 2114–2120. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170

Bortolaia, V., Kaas, R. S., Ruppe, E., Roberts, M. C., Schwarz, S., Cattoir, V., Philippon, A., Allesoe, R. L., Rebelo, A. R., Florensa, A. F., Fagelhauer, L., Chakraborty, T., Neumann, B., Werner, G., Bender, J. K., Stingl, K., Nguyen, M., Coppens, J., Xavier, B. B., … Aarestrup, F. M. (2020). ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *75*(12), 3491–3500. https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345

Bruno, S. (2015). *Uso de colistina en el hospital nacional Edgardo Rebagliati Martins en el período febrero a Agosto 2012*.

Calero-Cáceres, W., Tadesse, D., Jaramillo, K., Villavicencio, X., Mero, E., Lalaleo, L., Welsh, C., Villacís, J. E., Quentin, E., Parra, H., Ramirez, M. S., Harries, A. D., & Balcázar, J. L. (2022). Characterization of the genetic structure of mcr-1 gene among Escherichia coli isolates recovered from surface waters and sediments from Ecuador. *Science of the Total Environment*, *806*. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150566

Carattoli, A., Zankari, E., Garciá-Fernández, A., Larsen, M. V., Lund, O., Villa, L., Aarestrup, F. M., & Hasman, H. (2014). In Silico detection and typing of plasmids using plasmidfinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *58*(7), 3895–3903. https://doi.org/10.1128/AAC.02412-14

Carroll, L. M., Gaballa, A., Guldimann, C., Sullivan, G., Henderson, L. O., & Wiedmann, M. (2019). Identification of novel mobilized colistin resistance gene mcr-9 in a multidrug-resistant, colistin-susceptible salmonella enterica serotype typhimurium isolate. *MBio*, *10*(3). https://doi.org/10.1128/mBio.00853-19

Cho, M. S., Joh, K., Ahn, T. Y., & Park, D. S. (2014). Improved PCR assay for the specific detection and quantitation of Escherichia coli serotype O157 in water. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *98*(18), 7869–7877. https://doi.org/10.1007/s00253-014-5855-8

Davis, J. J., Wattam, A. R., Aziz, R. K., Brettin, T., Butler, R., Butler, R. M., Chlenski, P., Conrad, N., Dickerman, A., Dietrich, E. M., Gabbard, J. L., Gerdes, S., Guard, A., Kenyon, R. W., MacHi, D., Mao, C., Murphy-Olson, D., Nguyen, M., Nordberg, E. K., … Stevens, R. (2020). The PATRIC Bioinformatics Resource Center: Expanding data and analysis capabilities. *Nucleic Acids Research*, *48*(D1), D606–D612. https://doi.org/10.1093/nar/gkz943

Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., & Käller, M. (2016). MultiQC: Summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*, *32*(19), 3047–3048. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354

Falagas, M. E., & Bliziotis, I. A. (2007). Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: the dawn of the post-antibiotic era? In *International Journal of Antimicrobial Agents* (Vol. 29, Issue 6, pp. 630–636). https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.12.012

Fernandes, M. R., Moura, Q., Sartori, L., Silva, K. C., Cunha, M. P., Esposito, F., Lopes, R., Otutumi, L. K., Gonçalves, D. D., Dropa, M., Matté, M. H., Monte, D. F., Landgraf, M., Francisco, G. R., Bueno, M. F., de Oliveira Garcia, D., Knöbl, T., Moreno, A. M., & Lincopan, N. (2016). Silent dissemination of colistin-resistant Escherichia coli in South America could contribute to the global spread of the mcr-1 gene. *Eurosurveillance*, *21*(17), 1–6. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.17.30214

Fernández, J., Guerra, B., & Rodicio, M. (2018). Resistance to Carbapenems in Non-Typhoidal Salmonella enterica Serovars from Humans, Animals and Food. *Veterinary Sciences*, *5*(2), 40. https://doi.org/10.3390/vetsci5020040

Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QUAST: Quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, *29*(8), 1072–1075. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086

He, Y. Z., Li, X. P., Miao, Y. Y., Lin, J., Sun, R. Y., Wang, X. P., Guo, Y. Y., Liao, X. P., Liu, Y. H., Feng, Y., & Sun, J. (2019). The ISApl12 dimer circular intermediate participates in mcr-1 transposition. *Frontiers in Microbiology*, *10*(JAN). https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00015

Li, A., Yang, Y., Miao, M., Chavda, K. D., Mediavilla, J. R., Xie, X., Feng, P., Tang, Y. W., Kreiswirth, B. N., Chen, L., & Du, H. (2016a). Complete sequences of mcr-1-harboring plasmids from extended-spectrum-β-lactamase- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *60*(7), 4351–4354. https://doi.org/10.1128/AAC.00550-16

Li, A., Yang, Y., Miao, M., Chavda, K. D., Mediavilla, J. R., Xie, X., Feng, P., Tang, Y. W., Kreiswirth, B. N., Chen, L., & Du, H. (2016b). Complete sequences of mcr-1-harboring plasmids from extended-spectrum-β-lactamase- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *60*(7), 4351–4354. https://doi.org/10.1128/AAC.00550-16

Li, Q., Qian, C., Zhang, X., Zhu, T., Shi, W., Gao, M., Feng, C., Xu, M., Lin, H., Lin, L., Lu, J., Lin, X., Li, K., Xu, T., Bao, Q., Li, C., & Zhang, H. (2022). Colistin Resistance and Molecular Characterization of the Genomes of mcr-1-Positive Escherichia coli Clinical Isolates. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *12*. https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.854534

Ling, Z., Yin, W., Shen, Z., Wang, Y., Shen, J., & Walsh, T. R. (2020a). Epidemiology of mobile colistin resistance genes mcr-1 to mcr-9. In *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (Vol. 75, Issue 11, pp. 3087–3095). Oxford University Press. https://doi.org/10.1093/jac/dkaa205

Ling, Z., Yin, W., Shen, Z., Wang, Y., Shen, J., & Walsh, T. R. (2020b). Epidemiology of mobile colistin resistance genes mcr-1 to mcr-9. In *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (Vol. 75, Issue 11, pp. 3087–3095). Oxford University Press. https://doi.org/10.1093/jac/dkaa205

Ling, Z., Yin, W., Shen, Z., Wang, Y., Shen, J., & Walsh, T. R. (2020c). Epidemiology of mobile colistin resistance genes mcr-1 to mcr-9. In *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (Vol. 75, Issue 11, pp. 3087–3095). Oxford University Press. https://doi.org/10.1093/jac/dkaa205

Liu, H., Zhu, B., Liang, B., Xu, X., Qiu, S., Jia, L., Li, P., Yang, L., Li, Y., Xiang, Y., Xie, J., Wang, L., Yang, C., Sun, Y., & Song, H. (2018). A novel mcr-1 variant carried by an IncI2-Type plasmid identified from a multidrug resistant enterotoxigenic Escherichia coli. *Frontiers in Microbiology*, *9*(APR). https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00815

Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L. F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J. H., & Shen, J. (2016a). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*, *16*(2), 161–168. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7

Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L. F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J. H., & Shen, J. (2016b). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*, *16*(2), 161–168. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7

Martino, F., Petroni, A., Menocal, M. A., Corso, A., Melano, R., & Faccone, D. (2024). New insights on mcr-1-harboring plasmids from human clinical Escherichia coli isolates. *PLoS ONE*, *19*(2 February). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0294820

Nordmann, P., & Poirel, L. (2016a). Plasmid-mediated colistin resistance: An additional antibiotic resistance menace. In *Clinical Microbiology and Infection* (Vol. 22, Issue 5, pp. 398–400). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.03.009

Nordmann, P., & Poirel, L. (2016b). Plasmid-mediated colistin resistance: An additional antibiotic resistance menace. In *Clinical Microbiology and Infection* (Vol. 22, Issue 5, pp. 398–400). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.03.009

OMS. (2017). Lista OMS de Antimicrobianos de Importancia Crítica para la Medicina Humana. *Lista OMS de AIC*, *115*(10), 527–531.

Ondov, B. D., Bergman, N. H., & Phillippy, A. M. (2011). Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC Bioinformatics*, *12*. https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-385

Osei Sekyere, J. (2019a). Mcr colistin resistance gene: a systematic review of current diagnostics and detection methods. *MicrobiologyOpen*, *8*(4), 1–21. https://doi.org/10.1002/mbo3.682

Osei Sekyere, J. (2019b). Mcr colistin resistance gene: a systematic review of current diagnostics and detection methods. *MicrobiologyOpen*, *8*(4). https://doi.org/10.1002/mbo3.682

Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., & Jensen, S. O. (2018). *Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance*. http://cmr.asm.org/

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, *41*(D1). https://doi.org/10.1093/nar/gks1219

Seemann, T. (2014). Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, *30*(14), 2068–2069. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153

Shen, Z., Wang, Y., Shen, Y., Shen, J., & Wu, C. (2016a). Early emergence of mcr-1 in Escherichia coli from food-producing animals. In *The Lancet Infectious Diseases* (Vol. 16, Issue 3, p. 293). Lancet Publishing Group. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00061-X

Shen, Z., Wang, Y., Shen, Y., Shen, J., & Wu, C. (2016b). Early emergence of mcr-1 in Escherichia coli from food-producing animals. In *The Lancet Infectious Diseases* (Vol. 16, Issue 3, p. 293). Lancet Publishing Group. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00061-X

Shen, Z., Wang, Y., Shen, Y., Shen, J., & Wu, C. (2016c). Early emergence of mcr-1 in Escherichia coli from food-producing animals. In *The Lancet Infectious Diseases* (Vol. 16, Issue 3, p. 293). Lancet Publishing Group. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00061-X

Wang, J., Dou, X., Song, J., Lyu, Y., Zhu, X., Xu, L., Li, W., & Shan, A. (2019). Antimicrobial peptides: Promising alternatives in the post feeding antibiotic era. In *Medicinal Research Reviews* (Vol. 39, Issue 3, pp. 831–859). John Wiley and Sons Inc. https://doi.org/10.1002/med.21542

Wang, Q., Sun, J., Li, J., Ding, Y., Li, X. P., Lin, J., Hassan, B., & Feng, Y. (2017a). Expanding landscapes of the diversified mcr-1-bearing plasmid reservoirs. *Microbiome*, *5*(1), 70. https://doi.org/10.1186/s40168-017-0288-0

Wang, Q., Sun, J., Li, J., Ding, Y., Li, X. P., Lin, J., Hassan, B., & Feng, Y. (2017b). Expanding landscapes of the diversified mcr-1-bearing plasmid reservoirs. *Microbiome*, *5*(1), 70. https://doi.org/10.1186/s40168-017-0288-0

Wang, R., Van Dorp, L., Shaw, L. P., Bradley, P., Wang, Q., Wang, X., Jin, L., Zhang, Q., Liu, Y., Rieux, A., Dorai-Schneiders, T., Weinert, L. A., Iqbal, Z., Didelot, X., Wang, H., & Balloux, F. (2018a). The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene mcr-1. *Nature Communications*, *9*(1). https://doi.org/10.1038/s41467-018-03205-z

Wang, R., Van Dorp, L., Shaw, L. P., Bradley, P., Wang, Q., Wang, X., Jin, L., Zhang, Q., Liu, Y., Rieux, A., Dorai-Schneiders, T., Weinert, L. A., Iqbal, Z., Didelot, X., Wang, H., & Balloux, F. (2018b). The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene mcr-1. *Nature Communications*, *9*(1), 1–9. https://doi.org/10.1038/s41467-018-03205-z

Wood, D. E., & Salzberg, S. L. (2014). *Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments*. http://ccb.jhu.edu/software/kraken/.

Zhang, C., Feng, Y., Liu, F., Jiang, H., Qu, Z., Lei, M., Wang, J., Zhang, B., Hu, Y., Ding, J., & Zhu, B. (2017). A phage-like IncY plasmid carrying the mcr-1 gene in Escherichia coli from a pig farm in China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *61*(3). https://doi.org/10.1128/AAC.02035-16

11. ANEXOS

ANEXO 1. CÓDIGO EJECUTADO EN EL BASH DE LINUX, A TRAVÉS DEL CLÚSTER DE CEDIA

>>>>>>> REQUERIMIENTOS DEL NODO CEDIA

salloc -p gpu -n 1 -c 16 --mem=5G --gres=gpu:a100_1g.5gb:1 --time=02:00:00

salloc -p gpu -n 1 -c 16 --mem=5G --gres=gpu:a100_1g.5gb:1 --time=01:00:00

salloc -p gpu -n 1 -c 16 --mem=5G --gres=gpu:a100_1g.5gb:1 --time=02:00:00

salloc -p gpu -n 1 -c 32 --mem=5G --gres=gpu:a100_2g.10gb:1 --time=02:00:00

salloc -p gpu -n 1 -c 64 --mem=32G --gres=gpu:a100_2g.10gb:1 --time=02:00:00

salloc -p gpu -n 1 -c 64 --mem=120G --gres=gpu:a100_3g.20gb:1 --time=02:00:00 #### el seleccionado

>>>>>> ACTIVAR EL NODO DE REQUERIMIENTO

ssh dgx-node-0-0

>>>>> FASTQC

wget https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/fastqc_v0.12.1.zip

unzip fastqc_v0.12.1.zip

export PATH=$PATH:/home/wladimir.enriquez/Genoma/FastQC/

fastqc 1430_S5_L001_R1_001.fastq1430_S5_L001_R2_001.fastq 499_S1_L001_R1_001.fastq 499_S1_L001_R2_001.fastq

unzip 1430_S5_L001_R1_001.fastq.zip 1430_S5_L001_R2_001.fastq.zip 499_S1_L001_R1_001.fastq.zip 499_S1_L001_R2_001.fastq.zip

>>>>>>>> TRIMOMATIC

wget http://www.usadellab.org/cms/uploads/supplementary/Trimmomatic/Trimmomatic-0.39.zip

unzip Trimmomatic-0.39.zip

/home/wladimir.enriquez/Genoma/Trimmomatic-0.39/adapters/TruSeq3-PE-2.fa

export PATH=$PATH:/home/wladimir.enriquez/Genoma/Trimmomatic-0.39/adapters/TruSeq3-PE-2.fa

java -jar /home/wladimir.enriquez/Genoma/Trimmomatic-0.39/trimmomatic-0.39.jar PE -phred33 1430_S5_L001_R1_001.fastq 1430_S5_L001_R2_001.fastq 1430_R1_paired.fq.gz 1430_R1_unpaired.fq.gz 1430_R2_paired.fq.gz 1430_R2_unpaired.fq.gz ILLUMINACLIP:/home/wladimir.enriquez/Genoma/Trimmomatic-0.39/adapters/TruSeq3-PE-2.fa:2:30:10:2:True HEADCROP:20 LEADING:5 TRAILING:5 MINLEN:30

java -jar /home/wladimir.enriquez/Genoma/Trimmomatic-0.39/trimexport PATH=$PATH:/home/wladimir.enriquez/Genoma/Trimmomatic-0.39/adapters/TruSeq3-PE-2.famomatic-0.39.jar PE -phred33 499_S1_L001_R1_001.fastq 499_S1_L001_R2_001.fastq 499_R1_paired.fq.gz 499_R1_unpaired.fq.gz 499_R2_paired.fq.gz 499_R2_unpaired.fq.gz ILLUMINACLIP:/home/wladimir.enriquez/Genoma/Trimmomatic-0.39/adapters/TruSeq3-PE-2.fa:2:30:10:2:True HEADCROP:15 LEADING:3 TRAILING:3 MINLEN:30

java -jar /home/wladimir.enriquez/Genoma/Trimmomatic-0.39/trimexport PATH=$PATH:/home/wladimir.enriquez/Genoma/Trimmomatic-0.39/adapters/TruSeq3-PE-2.famomatic-0.39.jar PE -phred33 1430_S5_L001_R1_001.fastq 1430_S5_L001_R2_001.fastq 1430_R1_paired.fq.gz 1430_R1_unpaired.fq.gz 1430_R2_paired.fq.gz 1430_R2_unpaired.fq.gz ILLUMINACLIP:/home/wladimir.enriquez/Genoma/Trimmomatic-0.39/adapters/TruSeq3-PE-2.fa:2:30:10:2:True HEADCROP:20 LEADING:5 TRAILING:5 MINLEN:30

>>>>>>>>> **SPADES**

wget http://cab.spbu.ru/files/release3.15.4/SPAdes-3.15.4-Linux.tar.gz

tar -xzf SPAdes-3.15.4-Linux.tar.gz

wladimir.enriquez@login1:~/Genoma/SPAdes-3.15.4-Linux/bin$

/home/wladimir.enriquez/Genoma/SPAdes-3.15.4-Linux/bin >>>>> directotio

export PATH=$PATH:/home/wladimir.enriquez/Genoma/SPAdes-3.15.4-Linux/bin/

spades.py -h

spades.py -1 1430_R1_paired.fq.gz -2 1430_R2_paired.fq.gz -o output_Ensamble_Spades1

spades.py -1 499_R1_paired.fq.gz -2 449_R2_paired.fq.gz -o output_Ensamble_Spades2

spades.py -1 499_R1_paired.fq.gz -2 499_R2_paired.fq.gz -o Ensamble_Spades2

Para continuar corriendo

spades.py --continue -o output_Ensamble_Spades

>>>>>>> **QUAST**

wget https://github.com/ablab/quast/releases/download/quast_5.2.0/quast-5.2.0.tar.gz

tar -xzf quast-5.2.0.tar.gz

cd quast-5.2.0

pwd

/home/wladimir.enriquez/Genoma/quast-5.2.0 >>>>>> directorio

export PATH=$PATH:/home/wladimir.enriquez/Genoma/quast-5.2.0

cd Ensamble_Spades1

wladimir.enriquez@login1:~/RAM/Ensamble_Spades1

./quast.py test_data/contigs_1.fasta \

test_data/contigs_2.fasta \

qu -r test_data/reference.fasta.gz \

-g test_data/genes.gff

quast.py /home/wladimir.enriquez/RAM/Ensamble_Spades1/contigs.fasta -o QUAST1430

quast.py /home/wladimir.enriquez/RAM/Ensamble_Spades2/contigs.fasta -o QUAST499

>>>>>>> **ALINEAMIENTO QUAST CON SECUENCIA DE REFERENCIA**

quast.py /home/wladimir.enriquez/RAM/Ensamble_Spades1/contigs.fasta -r EcoliO157H7.fna -o QUASTref_1430

quast.py /home/wladimir.enriquez/RAM/Ensamble_Spades1/scaffolds.fasta -r EcoliO157.fna -o QUASTrefscafffolds_1430

quast.py /home/wladimir.enriquez/RAM/Ensamble_Spades1/K55/final_contigs.fasta -r EcoliO157H7.fna -o QUASTrefK55_1430

quast.py /home/wladimir.enriquez/RAM/Ensamble_Spades2/K55/final_contigs.fasta -r EcoliO157.fna -o QUASTrefscafffolds_499

>>>>>>>>>> **KRAKEN IDENTIFICACIÓN**

wget https://github.com/DerrickWood/kraken2/archive/refs/tags/v2.1.3.tar.gz

tar -xzf v2.1.3.tar.gz

/home/wladimir.enriquez/Genoma/kraken2-2.1.3 >>>>>> directorio

install_kraken2.sh /home/wladimir.enriquez/Genoma/kraken2-2.1.3 >>>>>installation

export PATH=$PATH:/home/wladimir.enriquez/Genoma/kraken2-2.1.3

Directorio de instalación

Kraken installation complete.

To make things easier for you, you may want to copy/symlink the following

files into a directory in your PATH:

/home/wladimir.enriquez/Genoma/kraken2-2.1.3/kraken2

export PATH=$PATH:/home/wladimir.enriquez/Genoma/kraken2-2.1.3/kraken2-build

/home/wladimir.enriquez/Genoma/kraken2-2.1.3/kraken2-inspect

/home/wladimir.enriquez/Genoma/kraken2-2.1.3 >>>>>> directorio