



Caracterización *in silico* de los genes *emrA*, *arnA* y *marR* involucrados en resistencia a medicamentos en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* con fenotipo multidrogorresistente (MDR)

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico
Trabajo de grado

Bogotá, 01 de abril de 2022



Caracterización *in silico* de los genes *emrA*, *arnA* y *marR* involucrados en resistencia a medicamentos en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* con fenotipo multidrogorresistente (MDR)

Laura Stephanie Mendieta Alarcón

Laura Marcela Navarro Guevara

Asesora interna

Ruth Mérida Sánchez Mora, PhD en Biotecnología

Asesora externa

Ibeth Cristina Romero Calderón, PhD en Biotecnología y Biociencias

Universidad Nacional de Colombia, Sede La Paz

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico

Trabajo de grado

Bogotá, 01 de abril de 2022



Caracterización *in silico* de los genes *emrA*, *arnA* y *marR* involucrados en resistencia a medicamentos en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* con fenotipo multidrogorresistente (MDR)

Aprobada _____

Jurados

Asesores

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico
Trabajo de grado
Bogotá, 01 de abril de 2022

Dedicatoria

Este trabajo va dedicado a todas las personas que hicieron parte de este proceso, a nuestra familia siempre dispuesta a acompañarnos en las noches de desvelo, brindar su ayuda incondicional y fortalecernos en todo momento. A nuestros amigos, quienes nos acompañaron en este camino sin titubear. Especialmente, va dedicado a nuestra compañera y amiga Dayanna, que fue protagonista junto a nosotras de esta ilusión llamada proyecto desde el momento cero, quien ahora nos acompaña desde otro espacio del universo.

Agradecimientos

Nuestros más sinceros agradecimientos para todos aquellos que hicieron posible este proyecto, a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, quien nos concedió las bases del conocimiento para investigar. A nuestros amigos y familiares por todos sus consejos. A nuestra asesora interna Ruth Mérida Sánchez Mora por sus correcciones y participación. Finalmente, nuestro más profundo agradecimiento para nuestra asesora Ibeth Cristina Romero Calderón, quien desde el principio creyó en nuestras capacidades, nos acompañó y brindó apoyo incondicional con su conocimiento, experiencia, paciencia y dedicación.

Tabla de contenido

Resumen	10
Introducción	13
Objetivos	15
Objetivo general	15
Objetivos específicos	15
1. Antecedentes	16
2. Marco referencial	21
2. 1 Generalidades de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
2. 1. 1 Características morfológicas, bioquímicas y microbiológicas.	22
2. 2 Infecciones causadas por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
2. 4 Generalidades de factores de virulencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
2. 5 Resistencia a fármacos	24
2.5.1 Mecanismos de resistencia intrínseca	25
2.5.2 Mecanismos de resistencia extrínseca	26
2. 6 Principal función de los genes de resistencia <i>emrA</i> , <i>arnA</i> y <i>marR</i>	27
3. Diseño metodológico	28
3.1 Tipo de Investigación	28
3.2 Enfoque de la investigación	28
3.3 Población y muestra	28
3.4 Técnicas y procedimientos	29
3.4.1 Identificación de los genes <i>emrA</i> , <i>arnA</i> y <i>marR</i> a partir de los genomas de dos cepas de <i>P. aeruginosa</i> MDR	29
3.4.2 Comparación de secuencias de los genes <i>emrA</i> , <i>arnA</i> y <i>marR</i> para determinar mutaciones puntuales asociadas a resistencia	29
3.4.3 Análisis filogenético de los genes <i>emrA</i> , <i>arnA</i> y <i>marR</i> y sus ortólogos en otras especies	30
3.4.4 Análisis de las secuencias de proteínas codificadas por los genes <i>emrA</i> , <i>arnA</i> y <i>marR</i>	30

3.4.5 Predicción de estructura secundaria y terciaria de las proteínas	31
4. Resultados	31
4.1 Identificación de los genes <i>emrA</i> , <i>arnA</i> y <i>marR</i> a partir de los genomas de dos cepas de <i>P. aeruginosa</i> MDR.	31
4.2 Comparación de secuencias de los genes <i>emrA</i> , <i>arnA</i> y <i>marR</i> para determinar mutaciones puntuales asociadas a resistencia.	32
4.2.1. Mutaciones en la secuencia del gen <i>emrA</i>	32
4.2.2 Mutaciones en la secuencia del gen <i>ArnA</i>	35
4.2.3 Mutaciones en la secuencia del gen <i>MarR</i>	39
4.2.4 Comparación de secuencias ortólogas del gen <i>emrA</i> , <i>arnA</i> y <i>marR</i>	40
4.2.4.1 Alineamiento múltiple de secuencias ortólogas del gen <i>emrA</i>	40
4.2.4.2 Alineamiento múltiple secuencias ortólogas gen <i>arnA</i>	41
4.2.4.3 Alineamiento múltiple secuencias ortólogas gen <i>MarR</i>	41
4.3 Análisis filogenético de los genes <i>EmrA</i> , <i>ArnA</i> y <i>MarR</i>	41
4.4 Análisis de secuencias de proteínas codificadas por los genes <i>emrA</i> , <i>arnA</i> y <i>marR</i>	43
4.4.1 Predicción de los marcos abierto de lectura y secuencias aminoacídicas de las proteínas codificadas por los genes <i>emrA</i> , <i>arnA</i> y <i>marR</i>	43
4.4.1 Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos codificados por los genes de interés	44
4.4.1.1 Alineamiento múltiple de secuencia de aminoácidos codificado por el gen <i>emrA</i>	44
4.4.1.2 Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos codificado por el gen <i>arnA</i>	44
4.4.1.3 Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos codificadas por el gen <i>marR</i>	46
4.5. Predicción de las estructuras secundaria y terciaria de las proteínas <i>EmrA</i> , <i>ArnA</i> y <i>MarR</i> de <i>P. aeruginosa</i> MDR 03 y 04	46
5. Discusión	50
6. Conclusiones	53
Referencias Bibliográficas	54
Anexos	66

Índice de figuras

- Figura 1.** Alineamiento múltiple de secuencias de nucleótidos del gen EmrA en cepas de *P. aeruginosa* MDR 03, 04, y cepa de referencia o sensible *P. aeruginosa* PAO1 realizado por medio de programa Clustal Omega. 34
- Figura 2.** Alineamiento múltiple de secuencias de nucleótidos de cepas de *P.aeruginosa* MDR 03, MDR 04 y cepa de referencia o sensible *P.aeruginosa* PAO1 con gen *ArnA* realizado por el programa Clustal Omega. 38
- Figura 3.** Alineamiento múltiple de secuencias, cepas de *P.aeruginosa* MDR 03, MDR 04 y de referencia *P.aeruginosa* PAO1 con gen *MarR* realizado por medio de programa Clustal Omega. 40
- Figura 4.** Árboles filogenéticos de secuencias de los genes *EmrA*, *ArnA*, *MarR* de *P. aeruginosa* con relación a otras bacterias ortólogas. 42
- Figura 5.** Marcos abiertos de lectura en el gen *emrA*, *arnA* y *marR* de *Pseudomonas aeruginosa* MDR 03 y MDR 04 obtenidos mediante Expasy. 43
- Figura 6.** Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas de la proteína *EmrA* de cepas MDR 03 y 04 y cepa de referencia PAO1 de *P. aeruginosa* (Fenotipo sensible), realizado por el programa Clustal Omega. 44
- Figura 7.** Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de la proteína *ArnA* de las cepas MDR 03 y MDR 04, con respecto a la cepa de referencia de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 realizado por el programa Clustal omega. 46
- Figura 8.** Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas de la proteína *MarR* de cepas MDR 03 y 04 y cepa de referencia PAO1 de *P. aeruginosa* (Fenotipo sensible) realizado por el programa Clustal omega. 46
- Figura 9.** Método de predicción de estructura secundaria GOR IV, *EmrA* (I), *ArnA* (II), *MarR*(III) (visualización gráfica de la predicción) 47

Figura 10. Modelo tridimensional de las proteínas deducidas de *emrA*, *arnA* y *marR* de *P.aeruginosa* MDR03 y MDR04 predicho por medio de la herramienta I-TASSER. I. EmrA; II. ArnA y III. MarR. A. Modelo tridimensional de la proteína. B. Sitios de unión a los ligandos. . 48

Figura 11. Validación local, global y estructural de los modelos tridimensionales de EmrA(I), ArnA (II) y MarR (III) mediante ProSA-web Gráficos de puntuación Z (A). Gráfico de energía de residuos (B). Representación visual de la energía en las estructuras tridimensionales mediante Jmol (C). 49

Lista de tablas

Tabla 1. Genes presentes en cepas MDR 03 y 04 de <i>P. aeruginosa</i>	32
Tabla 2. Mutaciones tipo sustitución encontradas en el gen <i>EmrA</i> de cepas MDR 03 y 04 en comparación con la cepa de referencia PA01 de <i>P. aeruginosa</i>	35
Tabla 3. Mutaciones tipo sustitución encontradas en el gen <i>ArnA</i> de cepas MDR 03 y MDR 04 en comparación con la cepa de referencia PAO1 de <i>P. aeruginosa</i>	39
Tabla 4. Mutaciones tipo sustitución encontradas en el gen <i>MarR</i> de cepas MDR 03 y 04 en comparación con la cepa de referencia PA01 de <i>P. aeruginosa</i>	40



Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico

Caracterización *in silico* de los genes *EmrA*, *ArnA* y *MarR* involucrados en resistencia a medicamentos en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* con fenotipo multidrogorresistente (MDR)

Resumen

Las infecciones nosocomiales generadas por *Pseudomonas aeruginosa* se han convertido en una problemática de importancia en salud pública, debido a la alta tasa de morbilidad y mortalidad alrededor del mundo, como consecuencia del aumento de resistencia a antibióticos, a tal punto de bajar la efectividad de los fármacos más fuertes. A partir de lo anterior, surge la necesidad de la búsqueda de nuevas terapias, por lo que es vital el estudio de nuevos blancos terapéuticos para tratar esta bacteria. Es por ello que en el presente estudio se realizó la caracterización *in silico* de tres genes (*EmrA*, *ArnA* y *MarR*) relacionados a la resistencia para determinar si podrían ser de utilidad en la implementación de nuevos tratamientos. Se realizó el alineamiento múltiple de nucleótidos y aminoácidos de las cepas MDR 03 y 04, junto con la cepa de referencia y los ortólogos encontrados, donde se observaron mutaciones, las cuales pueden estar relacionadas a la resistencia de los aislados clínicos colombianos. Así mismo, se predijo la estructura terciaria de las proteínas de estudio por medio de la herramienta bioinformática I-TASSER, los modelos seleccionados presentan puntajes TM y C-score dentro de los parámetros, que permiten evidenciar

la confiabilidad de ésta para el presente estudio y los que se puedan derivar de éste. De igual manera, los resultados obtenidos, podrían ser empleados en otros estudios para evaluar inhibidores específicos para dichas proteínas.

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*, proteína, gen, multidrogorresistencia, blancos terapéuticos.

Abstract

Nosocomial infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* have become an important problem in public health, due to high rates of morbidity and mortality worldwide, as a consequence of the increase in antibiotic resistance, until the point to reduce the most potent drug effectiveness. Based on the above, the need to search for new therapies arises, for that, it is vital the study of new therapeutic targets to treat this bacterium. For this reason, the present study of the characterization *in silico* of three genes (*EmrA*, *ArnA* and *MarR*) was made to determine if they could be used in the implementation of new treatments. The nucleotides and amino acids multiple alignments of MDR 03 and MDR 04 strains were made, together with reference strain and orthologues found, where mutations were observed, which may be related to Colombian clinical isolates resistance, however, future studies are needed to corroborate this. Likewise, tertiary structure protein was predicted by bioinformatic tool I-TASSER, the selected models have TM and C scores within the parameters, which provide evidence of reliability of that for the present study and what can be generated based on this one. Similarly, the obtained results might be used in other studies to test specific inhibitors for these proteins.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, protein, gene, multidrug resistance, therapeutic targets.

Estudiantes:

Laura Stephanie Mendieta Alarcón

Laura Marcela Navarro Guevara

Docentes:

Ruth Mélida Sánchez Mora

Ibeth Cristina Romero Calderón

Institución:

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Fecha:

01 de abril de 2022

Introducción

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram negativa presente en el ambiente y en el agua, conocida por su alta prevalencia en pacientes hospitalarios e inmunosuprimidos, provocando infecciones graves con altas tasas de morbilidad y mortalidad; es por eso que a partir del año 2017 la Organización Mundial de la Salud (OMS) incluyó a *Pseudomonas aeruginosa* dentro de la lista de bacterias con prioridad crítica para la búsqueda y desarrollo de nuevos antibióticos, debido a su importancia en el ambiente hospitalario, infecciones asociadas a dispositivos médicos y su frecuente resistencia a fármacos como carbapenémicos y cefalosporinas, además de sus altas tasas de resistencia a múltiples fármacos (MDR) ^{1,2}.

La aparición de cepas de *P. aeruginosa* resistentes a antibióticos se ha convertido en un problema a nivel de salud pública, en Europa la tasa de resistencia es superior al 10% para la mayoría de los antimicrobianos bajo vigilancia (ceftazidime, fluoroquinolonas, aminoglucósidos, carbapenémicos, entre otros); tan solo para el 2015, según los informes de los Centros Europeos para la prevención y control de enfermedades, el 13,7% de los aislados de *P. aeruginosa* eran resistentes al menos a tres grupos de antimicrobianos y el 5,5% a los cinco grupos de antimicrobianos bajo vigilancia⁵. Por otro lado, en un estudio donde se evaluó y comparó la prevalencia de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos en toda América Latina, en los años 2002-2013, se encontró que Latinoamérica supera los porcentajes de prevalencia, (26%) en comparación con Europa Occidental y América del Norte (17% y 13%, respectivamente) y se evidenció que las infecciones nosocomiales causadas por esta bacteria poseen una tasa de mortalidad del 50%⁶.

En Colombia, en el 2016, se registró en el informe de vigilancia de resistencia antimicrobiana de Infecciones Asociadas a Atención en Salud (IAAS), que *P. aeruginosa* mostró resistencia a carbapenémicos, 31% en UCI y 23% en no UCI, muy similar a lo reportado el año anterior (porcentaje de 33% en UCI y 24% en No UCI)²².

En cuanto a la prevalencia de fenotipos MDR en diferentes áreas geográficas, se ha visto que ésta oscila entre el 15-30% en el 2010 al 2015, lo que acrecentó la preocupación de la diseminación de las cepas MDR por todo el mundo ^{3,4,5,13}. En España, en dos estudios realizados se evidenció que la prevalencia de cepas MDR osciló entre 28% y 65 % y se observó que un porcentaje importante (15% - 17% de los aislados) cumplía criterios de extremadamente resistente (XDR)^{5,13} y en Europa se encontró que las tasas de MDR reportadas fueron del 24,7% al 27,7% entre 2015 y 2017¹⁵.

Por otra parte, para América Latina según un estudio realizado entre los años 2004 a 2015, se encontró que de 3613 aislados de *Pseudomonas aeruginosa* el 26,7% eran multirresistentes (MDR)¹⁴, resultado similar al estudio realizado entre 2015 - 2017 donde se obtuvo que la tasa de prevalencia, aumentó 6,5%, pasando de 16% a 22,5%¹⁶. Para Colombia, se ha reportado un aumento de la presencia de cepas MDR principalmente en aislados clínicos, como es el caso del estudio realizado por el Instituto Nacional de Salud (INS), en donde del total de aislados el 75,4% tenían fenotipo MDR (2012-2013)¹⁷. De igual manera, en el 2018, se reportó una prevalencia de 66,7%, en una investigación realizada en los hospitales principales de Santiago de Cali¹⁸.

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno hace parte de las IAAS conocidas como nosocomiales, principalmente vinculado a la neumonía asociada a ventilador (NAV), estimándose que aproximadamente el 24% de los casos de NAV es ocasionado por esta bacteria principalmente en Europa y Estados Unidos⁸. Igualmente, según la Red Nacional de Seguridad Sanitaria (NHSN) de Estados Unidos, *P. aeruginosa* es el segundo patógeno encontrado en pacientes con NAV y la mayoría de cepas presentes suelen ser de fenotipo MDR, lo cual está estrechamente relacionado con un aumento en la mortalidad y una estancia hospitalaria más prolongada^{7,13}. Este microorganismo también está presente en patologías del tracto urinario intrahospitalarias comúnmente posteriores a una intervención quirúrgica o a la presencia de sondas, donde tiene una prevalencia que oscila entre 12,3% y 23,5 %, muchas veces por encima de patógenos como *E.coli* o *Klebsiella pneumoniae*, clásicamente asociados a este tipo de infecciones^{11,12}.

A pesar de que *P. aeruginosa* tiene una mayor prevalencia en ambientes hospitalarios, es importante resaltar que su prevalencia en la comunidad ha ido aumentando, de tal forma que está siendo asociada a neumonía adquirida en comunidad (NAC), frecuentemente en pacientes de la

tercera edad⁹. Es así, como en una de las áreas geográficas en las que más se ha reportado prevalencia de *Pseudomonas aeruginosa* en NAC es América del Sur con tasas mayores al 5,5% y circulación de cepas MDR asociadas a NAC⁹.

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, el estudio del genoma y más aún del resistoma en cepas de *P. aeruginosa* MDR para identificar genes asociados a estos fenotipos resistentes es indispensable, en este sentido en este proyecto se pretendió responder a la siguiente pregunta problema: ¿Cuáles son las características *in silico* que presentan los genes *emrA*, *arnA* y *marR* identificados en el genoma de dos cepas de *Pseudomonas aeruginosa* MDR que permitan catalogarlos como posibles moléculas blanco?

Objetivos

Objetivo general

Caracterizar *in silico* los genes *emrA*, *arnA* y *marR* involucrados en resistencia a medicamentos en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* con fenotipo multidrogorresistente (MDR).

Objetivos específicos

- Identificar las principales mutaciones asociadas a resistencia presentes en las secuencias de los genes *emrA*, *arnA* y *marR* de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* MDR.
- Evaluar las secuencias de los genes *emrA*, *arnA* y *marR* de *Pseudomonas aeruginosa* MDR con secuencias de genes ortólogos en otras bacterias para entender su relación filogenética.
- Determinar las estructuras secundarias y terciarias de las proteínas predichas a partir de los genes *emrA*, *arnA* y *marR* de *Pseudomonas aeruginosa* MDR.

1. Antecedentes

En los últimos años la resistencia antimicrobiana ha ido en aumento, debido al uso indiscriminado de fármacos, lo que ha generado nuevos mecanismos de defensa en los que se incluyen mutaciones y sobreexpresión de genes. Lo anterior se ha conocido gracias al uso de herramientas innovadoras, incluyendo la secuenciación de nueva generación. Kos et al³², en el año 2014, realizó un estudio referente a resistoma en 390 aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidos en diferentes lugares del mundo utilizando la herramienta de secuenciación de próxima generación. Se analizó principalmente los genes asociados a resistencia de antibióticos como meropenem, amikacina y levofloxacina. Se identificaron genes de resistencia a quinolonas como *GyrA*, *GyrB*, *ParE* y *ParC*, además de *OprD* asociado a resistencia a Betalactámicos, y otros genes que inducen resistencia en la bacteria por medio de factores como MLBs, KPC y Bombas Efflux, dentro de los genes principalmente asociados a este último, se encontró los genes *MexAB*, *MexXY*, *MexZ* y *OprM*, además de un mecanismo de asociación a modificaciones de lípido A, lo que hizo resistentes a colistina a dos de los aislados de *P. aeruginosa*³².

También, Murugan et al³³, 2016, realizó la caracterización fenotípica de la cepa VRFPA04 MDR de *Pseudomonas aeruginosa*, aislada de un paciente con queratitis, se hizo para determinar el grado de resistencia a múltiples fármacos. Con ayuda de la secuenciación del genoma bacteriano, se encontró que presentaba los genes *Aph3*, *strB*, *bla TEM*, *bla PAO*, *bla OXA-50* y *blaVIM-2* vinculados con la resistencia a aminoglucósidos, betalactámicos y carbapenémicos respectivamente. Adicionalmente se informó la presencia de varios tipos de sistema de secreción I al VIII, presencia de proteínas de bombas de eflujo de la familia RND *MexCD-OprJ* y *MexEF-OprN*, mutaciones en porinas, zonas CRISPR-cas y 58 regiones de plasticidad genómica (RGP), este último al ser un genoma accesorio, según los autores le atribuyen un papel importante en la resistencia de la cepa virulenta. Lo anterior es relevante ya que, aporta información para el desarrollo de intervenciones médicas efectivas, así como para identificar genes dianas para la elaboración de fármacos.

Actualmente se están realizando numerosos estudios caracterizando el resistoma bacteriano, como en la investigación de Jaillard et al³⁴ 2017 en la que presenta la caracterización del resistoma de 672 cepas de *P. aeruginosa* con genomas completos y valores de concentración mínima inhibitoria (MIC). El estudio se basa en nueve antibióticos pertenecientes a seis familias de fármacos anti- *P. aeruginosa*, donde se identificó 147 loci que previamente se creía que causaban resistencia como en la bomba de eflujo *mexXY* para la amikacina. Asimismo, también se encontró que las formas alélicas *bla* OXA son importantes en la resistencia a la cefepima, lo anterior se identificó a partir de análisis bioinformáticos y las bases de datos permitieron agrupar características nuevas de la colección de los genes que conforman el resistoma identificado. Se demuestra la utilidad de la línea de bioinformática desarrollada para catalogar el contenido completo de genes de resistencia y la caracterización de la composición de integrones.

Galetti et al³⁵, 2018, investigó el resistoma del aislado de *P. aeruginosa* HC84 productora de SPM-1, proveniente de Brasil. Se hizo un análisis *in silico* para comparar la cepa con otras registradas en el mundo. Se encontró que contaba con genes de resistencia como *bla* SPM-1, *rmtD*, *aacA4*, *aadA7*, *bla* OXA-56, *bla* OXA-396, *bla* PAO entre otros. Algunos genes se presentan normalmente en plásmidos, pero el aislado no tenía, por lo que los genes estaban en el genoma propio, a raíz de lo anterior, esta cepa clínica altamente resistente se considera un ejemplo de acumulación cromosómica de genes de resistencia adquiridos, que estaría directamente implicado en la prevalencia del aislado en hospitales de Brasil.

En el estudio de Madaha et al³⁶, en el 2020 donde se evaluó los genomas completos de dos cepas de *P. aeruginosa* MDR (MDRUY1PSABAL y UY1PSABAL2) aisladas de lavado broncoalveolar con el fin de obtener información sobre los genes implicados en su resistencia y virulencia. Por medio de aplicaciones bioinformáticas se realizó la búsqueda de varios genes implicados en la patogenicidad del microorganismo. Como resultados, la cepa UY1PSABAL mostró resistencia frente al 60% de los fármacos, mientras que UY1PSABAL2 fue resistente al 41%. En el genoma se identificó genes de resistencia a quinolonas (*CRPP*, *gryA*, *parE*), betalactámicos (*BlaPAO*, *BlaOXA*), aminoglucósido (*aph*, *rmtB*), entre otros.

La terapia antibiótica para tratar infecciones sospechosas provocadas por *P. aeruginosa* incluye la monoterapia o terapia combinada, sin embargo, actualmente dicha terapia no es eficaz a raíz de la multi resistencia del microorganismo, lo que ha provocado un aumento en la mortalidad de los pacientes especialmente inmunosuprimidos e intrahospitalarios. Como respuesta a la problemática, el diseño de fármacos y la búsqueda e identificación de nuevos blancos terapéuticos es muy importante, es así como Sedighi et al³⁷ 2015 realizó la caracterización *in silico* del factor Sigma (RpoS) que está asociado a la respuesta del *Pseudomonas aeruginosa* ante estrés, por lo que controla la producción de varios factores de virulencia, incluido el alginato extracelular, la exotoxina A y la formación de biopelículas. Los autores por medio de herramientas bioinformáticas analizaron la secuencia primaria, además, predijeron la estructura secundaria y tridimensional de la proteína, e identificaron posibles epítopes importantes a considerar para la elaboración de un fármaco o inhibidor.

Igualmente, Dash et al³⁸ (2016) realizó un análisis *in silico* de la proteína ATPasa, enzima que proporciona la energía para el funcionamiento del sistema de secreción tipo III presente en *Pseudomonas aeruginosa* y otras bacterias Gram negativas. El objetivo del estudio era identificar sitios de unión favorable y residuos claves de la ATPasa en relación con el sistema de secreción, para lo anterior, se utilizó la secuencia de la proteína, y por medio de herramientas bioinformáticas se realizó el análisis filogenético e identificar los sitios de unión favorable. Se obtuvo que efectivamente la ATPasa interactúa con varias proteínas de translocación asociadas al sistema de secreción, así como proteínas regulatorias y de exportación. Se concluye que el estudio es útil para brindar información para la creación de terapias alternativas para *Pseudomonas aeruginosa* y otros patógenos Gram negativos.³⁸

En la revisión del estudio *in silico* realizado por Pramanik et al³⁹ 2017, mediante herramientas bioinformáticas se realizó un análisis filogenético de la fosfatasa alcalina en diferentes cepas de *Pseudomonas aeruginosa* estudiando sus propiedades fisicoquímicas, por otro lado, se predijo su estructura secundaria y se modeló la proteína en 3D, con el fin de comprender mejor el aspecto funcional de un componente tan importante de la vía del metabolismo del fosfato en diferentes cepas de la bacteria. La predicción del modelo 3D permitió el análisis estructura-función de la proteína, mostró principalmente dos motivos funcionales, uno de los cuales pertenece a la

superfamilia de la fosfatasa alcalina y el otro a la metaloenzima, datos de suma relevancia ya que, con este análisis se evidencian nuevas formas de utilizar la enzima en bacterias para trazar nuevos blancos de ataque en el metabolismo³⁹.

Otra de las soluciones planteadas para buscar alternativas en el tratamiento de *Pseudomonas aeruginosa*, se encuentran las terapias no relacionadas directamente con la creación de antibióticos. Burrows et al⁴⁰, en el 2018 realizó una revisión de nuevas terapéuticas en estudio, como lo es la creación de inhibidores de las bombas de expulsión para tratar de potenciar a los antibióticos existentes, pero su uso está limitado ya que solo atacan a una de las múltiples bombas efflux. La parte de inmunología se ha trabajado en el aspecto de la elaboración de anticuerpos específicos contra *P. aeruginosa* para opsonizar y mejorar la destrucción inmunológica en conjunto con la sinergia de los fármacos⁴⁰. Por otro lado, se ha trabajado en el desarrollo de péptidos antimicrobianos por su múltiples acciones posibles sobre la bacteria ya sea provocando la muerte, inhibiendo la formación de biopelículas o potenciando la acción de los fármacos, un ejemplo de lo anterior es el desarrollo del péptido antimicrobiano ELIGO-3233 realizado por EligoChem⁴⁰.

De lo mencionado anteriormente, So et al⁴¹, 2019, realizó ensayos clínicos en pacientes adultos con un anticuerpo específico (MED1-3902) que tiene la capacidad de reconocer la proteína PcrV que forma la punta del sistema de secreción tipo III y el polisacárido de la matriz de biopelícula y de esa manera evitar la expulsión de exotoxinas. Se evidencio que puede servir como prevención de neumonía nosocomial en personas de alto riesgo con seguridad y eficacia, ya que no se observó efectos adversos graves.⁴¹

Así mismo, Pang Z et al⁴², 2019, informaron los últimos avances realizados en la búsqueda para mejorar el tratamiento contra *Pseudomonas aeruginosa*. Según los autores se está trabajando principalmente en la inhibición de la detección de quórum, el cual es un sistema que controla la expresión génica bacteriana, que al inhibirlo permite regular la virulencia y formación de biopelículas, esta estrategia es comprometedoras debido a que tiene un bajo riesgo de desarrollo de resistencia bacteriana.

Adicionalmente, se investiga el uso de la quelación del hierro, que consiste en disminuir la concentración de hierro extracelular o evitar su absorción. Se evidenció que sustancias como el galio (análogo del hierro) interrumpe el metabolismo bacteriano al actuar como sustituto, así como quelantes del hierro 2,2'-dipiridilo (2DP), ácido dietilentriaminopentacético (DTPA) y EDTA, que afectan el desarrollo de *P. aeruginosa* y la formación de biopelículas²⁶. Por último, se encuentra el desarrollo de nuevos fármacos como POL7001 que inhiben el transporte de LPS a la membrana externa bacteriana, este es usado actualmente en ensayos clínicos con murinos dando un buen resultado a la hora de combatir la infección, sin embargo, se sigue estudiando sus posibles efectos secundarios⁴².

En la actualidad se está estudiando el uso de diferentes herramientas como CRISPR-CAS para la edición de genes importantes en las bacterias como estrategia para el desarrollo de una terapia antimicrobiana, es por esto que Xu Z et al⁴³ en el 2020 utilizaron IF CRISPR-Cas, un sistema de edición de genes en un solo paso. Xu plantea el problema de Edición del genoma en aislados de *P. aeruginosa* con otros tipos de sistemas CRISPR-Cas o en otras células procariontas o eucariotas que carecen de un sistema CRISPR-Cas nativo y, en el estudio se demostró que, al usar promotores, plásmidos, miniCRISPR, secuencias proto espaciadoras como 5'-AATTG-3' y 5'-AAA-3' se puede lograr eliminar un gen que contiene múltiples objetivos diseñando un casete de mini-CRISPR que incorpora simultáneamente de dos a tres espaciadores.

En los últimos años también se ha investigado la terapia fágica, Luscher et al⁴⁴ realizaron un estudio en 2020 donde evalúan una nueva alternativa de terapia usando bacteriófagos en combinación con un antibiótico (ciprofloxacina) para tratar una línea epitelial infectada por *P. aeruginosa*, la combinación redujo la carga bacteriana y en cuanto a la respuesta inflamatoria debido a la lisis inducida por fagos no se pudo establecer claramente. Sin embargo, encontraron que la mayoría de los genes proinflamatorios regulados positivamente en células Calu-3 por flagelina también fueron inducidos por *P. aeruginosa* tratada con el cóctel de fagos e antibiótico y al utilizar los fagos individualmente al igual que los antibióticos no mostraron ninguna respuesta inmune positiva, por lo que Alexandre concluye su estudio resaltando la necesidad de

combinaciones de cócteles de fagos / antibióticos para disminuir la carga bacteriana con el fin de evitar la aparición de resistencias.⁴⁴

De igual manera, Broniewsk et al⁴⁵, en el año 2021, analizó la relación entre sistemas de defensa de *Pseudomonas aeruginosa* como Quorum Sensing (QS) y CRISPR-cas (sistema de inmunidad de la bacteria) ante la nueva terapia empleada con bacteriófagos líticos. Para el estudio se usó fagos DMS3vir en la bacteria y se adicionó anti-*Quorum sensing* (Dimetilsulfóxido o Baicalein). Encontraron que la inhibición química de QS baja la adsorción fágica debido a la regulación de pili tipo IV y que puede haber disminución en la eficacia de fagos-pili específicos. Por lo que, aunque en estudios anteriores se mostraba una ventaja en el uso de químicos anti QS para disminuir la evolución de la bacteria y uso de inmunidad por CRISPR-cas, se requieren más estudios para evaluar si es efectivo en conjunto con la terapia fágica.

2. Marco referencial

2.1 Generalidades de *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es una especie de bacteria Gram negativa, con motilidad unipolar, se caracteriza por generar diversos pigmentos dentro de los cuales están: piocianina (azul verdoso), fluoresceína (amarillo verdoso fluorescente), piorrubina (rojo pardo), y piomelanina (negro)⁵⁴.

Es un microorganismo muy variable puesto que, aunque puede ser muy beneficioso en procesos de biorremediación debido a su capacidad de degradar hidrocarburos, también es un patógeno oportunista en el hombre y animal. Es aerobio (aunque puede desarrollarse en condiciones anaeróbicas utilizando nitrato como fuente de energía), puede sobrevivir con bajos niveles de nutrientes y crecer en rangos de temperatura de 4 a 42°C⁵⁵. Se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, en el agua, en los suelos húmedos, en los vegetales y en alimentos; también puede formar parte del microbiota normal de algunas zonas húmedas de la piel como las regiones sudoríparas.

La transmisión en humanos y animales se produce principalmente a través del contacto de la piel lesionada y de las mucosas con el agua o con objetos contaminados. Constituyen una fuente de infección sobre todo para los pacientes en el ámbito hospitalario, tratados con instrumental quirúrgico, respiradores, catéteres, entre otros ⁵⁶.

2. 1. 1 Características morfológicas, bioquímicas y microbiológicas.

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo Gram negativo recto o ligeramente curvado, con un tamaño promedio de 2–4 x 0,5-1 micras⁵⁷. Es motil debido a que presenta uno o varios flagelos polares. Se considera un microorganismo no exigente nutricionalmente puesto que se adapta según las condiciones del ambiente ya que a pesar de que no fermentan hidratos de carbono, produce ácido a partir de azúcares como la glucosa, fructosa, lactosa o sacarosa y la mayoría de las cepas presentan un olor característico frutal o cítrico.

Generalmente crece en agar Macconkey y en agar sangre se observa de color gris, como cera de vela, con colonias no definidas y sobrepuestas. Como medio selectivo, se emplea el agar Cetrimide, en donde las colonias al crecer presentan una pigmentación verde pálida. Es oxidasa positivo, arginina dihidrolasa y Simmons citrato positivo. Con respecto a la morfología de las colonias generalmente son redondas y presentan pigmentos.

2. 2 Infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa*

Dentro de las infecciones más comunes causadas por *Pseudomonas aeruginosa* se encuentran infecciones sanguíneas, es decir bacteriemia presentada en pacientes inmunocomprometidos, infecciones de la válvula del corazón, infecciones pulmonares como neumonía, sobre todo presentada en adultos mayores, infecciones oculares como queratitis, infecciones del tracto urinario (riñones y vejiga), infecciones en la piel por quemaduras, infecciones en los oídos (otitis aguda). Las infecciones generadas por esta bacteria son por lo general de origen intrahospitalario principalmente en Unidad de Cuidados Intensivos (UCIs), ya que se asocian a la inmunosupresión

de los pacientes, sumado a su permanencia en dispositivos médicos generado por sus biopelículas, lo que les ayuda a colonizar diferentes órganos.

2.3 Tratamiento para infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa*

A lo largo del tiempo las infecciones ocasionadas por *Pseudomonas aeruginosa* han sido tratadas con variedad de antibióticos, dentro de los que se encuentran diversos Betalactámicos^{16,17}; allí se incluyen cefalosporinas de tercera y cuarta generación como Ceftazidima y Cefepime¹³. Asimismo, son utilizados otra clase de antibióticos como los aminoglucósidos, de los que comúnmente se usa la tobramicina, sobre todo en infecciones graves. Otras alternativas de fármacos empleados para contrarrestar el microorganismo son los carbapenémicos, por ejemplo, Imipenem y Meropenem, fluoroquinolonas, polimixinas como Colistina, la cual es considerada como la última opción terapéutica¹⁷. Actualmente se debate y recomienda el tratamiento de antibiótico combinado sobre infecciones causadas por *Pseudomona aeruginosa*, este tipo de tratamiento tiene ciertas ventajas como la sensibilidad de la bacteria por alguno de estos antibióticos, prevención de desarrollo de resistencias y efecto sinérgico del antibiótico¹⁷. En cuanto a sinergismo se destaca el que se presenta entre la combinación de betalactámicos y aminoglucósidos. Dentro de las combinaciones más empleadas se encuentran Piperacilina-Tazobactam¹³ (compuesto de un Betalactámico y un inhibidor de Betalactamasa respectivamente), Cefotolozane-Tazobactam²⁰, y Colistina con otros antibióticos antipseudomonas como Imipenem, piperacilina, aztreonam, rifampicina, ciprofloxacina o ceftazidime.

2.4 Generalidades de factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*

Los factores de virulencia contribuyen de manera radical en la patogenia del microorganismo y por lo tanto, en su resistencia, algunos de estos son: la presencia de exotoxinas, fosfolipasa C, ramnolípidos, elastasa, piocianina, capacidad de formación de biopelículas y el sistema de secreción tipo III (T3SS), este último es un marcador de los aislamientos bacterianos y asociado a una respuesta negativa del tratamiento, adicionalmente es responsable de la inyección de cuatro

proteínas al citosol de las células humanas, la exoenzima T,S Y y U codificadas por los genes *exoS*, *exoT*, *exoY* y *exoU*, respectivamente, de las enzimas mencionadas prevalecen en los aislados clínicos la exoenzima U asociada a lesiones en tejido epitelial respiratorio superior y en macrófagos, y exoenzima S, relacionada a infecciones del tracto respiratorio y en pacientes quemados⁵⁸. Por otro lado, la capacidad de formación de biopelículas permite la persistencia bacteriana y dificulta las acciones de los antibióticos.

Se destaca su producción de biopelícula cuya matriz está compuesta por diversos factores como los polisacáridos Pel, Psl, ADN extracelular y proteínas como fimbrias, también se destaca el sistema de excreción de toxinas, así mismo se tiene presente la percepción de *quorum sensing* de forma que la bacteria se adapte a cambios microambientales.

2. 5 Resistencia a fármacos

Como se mencionó anteriormente, *Pseudomonas aeruginosa* se considera un patógeno multiresistente, debido al uso indiscriminado de fármacos por un tiempo. Algunos años atrás se utilizaban los carbapenémicos especialmente Imipenem y Meropenem como principales recursos gracias a su potente actividad para tratar infecciones provocadas por este microorganismo, sin embargo, hoy en día ya no es una solución viable debido a que ha adquirido diversos mecanismos para hacerle frente a este tipo de medicamentos, restringiendo las opciones terapéuticas aún más sumado a que se conoce que ésta posee una resistencia intrínseca a otros antibióticos^{6,59}. Es así como se evidencia la presencia de cepas multiresistentes, las cuales son aquellas que son resistentes a varios antibióticos (mínimo tres) de diferente naturaleza química utilizados en la terapia antibiótica ^{24,27,33}

Los principales mecanismos de resistencia asociados son la expresión de bombas de eflujo también llamadas de salida, la baja permeabilidad de la membrana, la producción de carbapenemasas impermeabilidad de la membrana externa, modificación del blanco antimicrobiano, transferencia horizontal y cambios en la membrana, de igual forma, lo que permite que este microorganismo presente esta resistencia son los genes Mex-AB, AmpD y GyrA7 y las alteraciones o pérdida de la porina OprD⁶⁰.

La mayoría de las bacterias poseen genes y diferentes tipos de mecanismos de resistencia, hay mecanismos intrínsecos, que se refiere a aquellos que son propios del género bacteriano sin la intervención de un agente externo y son codificados en el cromosoma único del microorganismo; así como mecanismos de tipo extrínsecos que son aquellos adquiridos por la bacteria por medio de la transferencia horizontal de genes, en los cuales se agrupan la conjugación, la transducción y transformación⁶⁰.

2.5.1 Mecanismos de resistencia intrínseca

La presencia de sistemas de expulsión o bombas de eflujo se conoce como principal mecanismo intrínseco en *Pseudomonas aeruginosa*, su sobreexpresión produce una elevada resistencia a distintos antibióticos y se afirma que es el primer mecanismo en activarse ante una exposición de un fármaco normalmente ante un carbapenémico, además se afirma que ayuda a las bacterias a sobrevivir a la presión de los antibióticos y a adquirir determinantes de resistencia adicionales⁶. Adicionalmente se ha observado que la presencia de dicho mecanismo en conjunto con otros de tipo adquiridos como la presencia de carbapenemasas, betalactamasas de espectro extendido (BLEES), metalobetalactamasas y la pérdida de la porina ocasiona la presencia de un fenotipo mucho más resistente⁶.

Otro mecanismo intrínseco es la pérdida de porina, la porina es una proteína de *Pseudomonas aeruginosa* específica de sustrato que facilita la difusión de aminoácidos básicos, péptidos pequeños y carbapenémicos en la célula⁶¹. Las alteraciones o la pérdida de OprD disminuyen significativamente la susceptibilidad a los carbapenémicos disponibles para esta bacteria, este va muy de la mano con el anterior, ya que en la mayoría de ocasiones se presentan en conjunto el bajo número de porinas no específicas disminuye la permeabilidad de sustancias tóxicas⁶².

En el gen *OPrD* que codifica para la porina se ha encontrado una gran variedad de deleciones, inserciones y codones de terminación prematura, que provoca el bloqueo del funcionamiento correcto del gen provocando la pérdida de la proteína, ya que por ejemplo la presencia de mutaciones causa la formación de secuencias de inserciones (IS) que truncan el gen evitando su traducción⁶².

2.5.2 Mecanismos de resistencia extrínseca

La producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEES), metalo-betalactamasas y carbapenemasas es un mecanismo extrínseco propio de *P. aeruginosa* que normalmente se asocia a elementos móviles promiscuos (MGE)⁵⁸.

Las *BLEES* se conocen como enzimas propias de una variedad de bacterias Gram negativas, confiere resistencia a las cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación y monobactámicos, así mismo se ha comprobado que reduce la sensibilidad a otros antibióticos como los aminoglucósidos y fluoroquinolonas⁵⁸.

Por otro lado, como su nombre lo indica las carbapenemasas son proteínas enzimáticas con capacidad catalítica sobre los carbapenémicos, pero también confiere resistencia a los inhibidores de las betalactamasas y a todas las generaciones de otros betalactámicos como las cefalosporinas. Entre los genes implicados en su desarrollo se encuentra el gen *bla VIM*, *bla NDM*, *bla IMP*, *bla SPM-1*, *bla KPC* y *bla OXA-48*, *-23*, *-24/40* y *-58*⁶.

En cuanto a las metalo-betalactamasas, entre las existentes resalta principalmente la presencia de la metalo- β -lactamasa-1 de Nueva Delhi (NDM-1), es uno de los determinantes de resistencia a carbapenémicos adquiridos más importantes y de rápida diseminación. Esta proteína se encuentra codificada en elementos móviles bacterianos y es dependiente de zinc; confiere resistencia a una amplia gama de antibióticos incluyendo a los carbapenémicos⁶.

Según diversos estudios, la resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* es respuesta de la interacción de distintos mecanismos, es decir que su capacidad de evitar la acción de los fármacos es por medio de la acción de varios de sus mecanismos tanto intrínsecos como extrínsecos^{60,6}.

2. 6 Principal función de los genes de resistencia *emrA*, *arnA* y *marR*

El gen *emrA* está estrechamente vinculado a la resistencia a fármacos como: dinitrofenol, ácido nalidíxico, tiolactomicina, nitroxolina entre otros. Se presenta comúnmente en bacterias Gram negativas principalmente *E.coli*, *Shigella*, *Klebsiella* entre otras^{63,64}. Este gen codifica una proteína de fusión de membrana (adaptador periplásmico) que forma una bomba de flujo tripartita (EmrAB-ToIC) que permite la expulsión de compuestos hidrofóbicos, proporcionando la unión entre EmrB y ToIC, la proteína se encuentra anclada en la membrana interna gracias a una hélice α N-terminal y contiene un sitio de unión al fármaco. La presencia y sobreexpresión de bombas de expulsión como la EmrAB-ToIC se considera un mecanismo intrínseco de bacterias Gram negativas^{63,64}.

La resistencia asociada al gen *arnA*, se produce debido a la modificación del lípido A con 4-amino-4-desoxi-L-arabinosa (Ara4N), lo cual desencadena resistencia a la polimixina y los polipeptidos microbianos catiónicos. Cumple con diversas funciones, comenzando por la del proceso biosintético del lípido A, en la cual se realizan las reacciones químicas y las vías que dan como resultado la formación del lípido A, el grupo glicolípido de los lipopolisacáridos bacterianos, que consta de cuatro a seis cadenas de acilo graso unidas a dos residuos de glucosamina^{60,65}. También está la función de proceso biosintético de lipopolisacáridos, donde se encuentran las reacciones químicas y las vías que dan como resultado la formación de lipopolisacáridos, sobre todo los relacionados y estructuralmente complejos de la membrana externa de las bacterias Gramnegativas. La hexamerización de las proteínas es otra capacidad de este gen, así como la respuesta al antibiótico y el proceso biosintético que da como resultado la formación de una UDP-4-desoxi-4-formamido-beta-L-arabinopiranosina. Finalmente, reacciones químicas y las vías también dan lugar a la formación de UDP-D-xilosa, uridindifosfoxilosa, una sustancia compuesta de xilosa en enlace glicosídico con difosfato de uridina^{60,65}.

El gen *marR* participa en la activación de genes de resistencia a antibióticos y estrés oxidativo, ya que es un regulador transcripcional⁶⁶. Las proteínas de la familia MarR se unen a reconocibles secuencias palindrómicas dentro de la región intergénica de genes de orientación divergente, lo que resulta en atenuación de la expresión génica al obstaculizar la unión de la ARN polimerasa al

promotor lo cual es una consecuencia común de la unión de la proteína MarR a genes y es cuando esta empieza a expresar aproximadamente sus siete genes para diversas proteínas relacionadas con la resistencia⁶⁷. Controla indirectamente la expresión a la bomba de salida de múltiples fármacos por medio de la represión del operón *marRAB* este codifica en cascada al activador transcripcional *marA* y la sobre expresión de este expresa en la misma cantidad la bomba de salida a múltiples fármacos AcrAB-TolC^{71,72}

3. Diseño metodológico

3.1 Tipo de Investigación

La presente investigación es mixta, teniendo en cuenta que es cualitativa, ya que parte del estudio se realizó por medio de la recolección de información referente a la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* y parte de algunos genes de resistencia que hacen parte del resistoma. Además, una parte es cuantitativa puesto que la caracterización de los genes implicados se realizó por medio de análisis *in silico* o *bioinformático*.

3.2 Enfoque de la investigación

La investigación tiene un enfoque descriptivo, en la cual se realizó un análisis y descripción de los genes implicados en resistencia, identificados mediante la secuenciación del genoma completo de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* con fenotipo multidrogorresistente (MDR) y se comparó con la información depositada en las bases de datos genómicas de libre acceso.

3.3 Población y muestra

En cuanto al universo del estudio es el genoma de *Pseudomonas aeruginosa*. La población del estudio son los genes de resistencia a antibióticos en *P. aeruginosa* y como muestra se seleccionaron las secuencias de los genes *emrA*, *arnA* y *marR* de *Pseudomonas aeruginosa* con las cuales se realizó el análisis *in silico*.

3.4 Técnicas y procedimientos

3.4.1 Identificación de los genes *emrA*, *arnA* y *marR* a partir de los genomas de dos cepas de *P. aeruginosa* MDR

Se utilizaron las secuencias de los genes *emrA*, *arnA* y *marR* obtenidos a partir de la secuenciación del genoma completo de las cepas MDR 03 y 04 de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de dos aislados clínicos colombianos de pacientes en Unidad de cuidados intensivos (UCI) con diagnóstico de neumonía, la cual fue realizada por Romero y colaboradores en la Universidad Federal de Santa Catarina, Brasil durante el año 2020. Estos genes fueron escogidos teniendo en cuenta, que a priori se identificaron los genes relacionados con la resistencia del microorganismo, adicionalmente se clasificaron los que estaban presentes en las cepas, basándose en los que compartían y los que no; se predijo la función biológica de cada familia de genes, de acuerdo con lo encontrado en las bases de datos bioinformáticas y bibliográficas consultadas, como NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y CARD (<https://card.mcmaster.ca/ontology/36036>) Finalmente, se seleccionaron los tres de mayor interés para el grupo de investigación con los cuales se hizo el estudio *in silico*³⁷

3.4.2 Comparación de secuencias de los genes *emrA*, *arnA* y *marR* para determinar mutaciones puntuales asociadas a resistencia

Para confirmar la identidad de las secuencias de los genes de interés *emrA*, *arnA* y *marR* obtenidas mediante la secuenciación del genoma completo, se utilizó la plataforma BlastN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), la cual permite identificar la similitud, así como inferir la

función biológica y evolutiva entre dos o más secuencias de nucleótidos^{37,46,47}. De igual forma, usando la herramienta BlastN, se identificaron secuencias ortólogas de los genes *emrA*, *arnA* y *marR* en otras bacterias multidrogorresistentes que presentaron mayor similitud con los de *P. aeruginosa*, (*Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella bongori*, entre otras), las cuales junto con las secuencias de estos genes de la cepa de referencia de *Pseudomonas aeruginosa* sensible (Cepa PAO1) fueron utilizadas para los alineamientos múltiples y los análisis filogenéticos posteriores (Anexo 7).

3.4.3 Análisis filogenético de los genes *emrA*, *arnA* y *marR* y sus ortólogos en otras especies

Inicialmente, se realizó un alineamiento múltiple (alineación de secuencias múltiples MSA) con las secuencias MDR de las dos cepas mediante la herramienta web Clustal Omega (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>)^{37,48,49}. Posteriormente, las secuencias de los tres genes estudiados se compararon con las secuencias ortólogas seleccionadas como punto de partida para realizar un análisis filogenético, para observar el comportamiento y las distancias evolutivas de los genes en las cepas de *P. aeruginosa* respecto de las demás secuencias analizadas por medio del Software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA X).^{37,46} La historia evolutiva se infiere utilizando el método de unión de vecinos (Neighbor joining), las distancias evolutivas se calcularon usando el método de máxima verosimilitud compuesta y están en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. Adicionalmente, el árbol de consenso bootstrap inferido de 1000 repeticiones se toma para representar la historia evolutiva de los taxones analizados y las ramas con valores de bootstrap menores a 50% fueron colapsadas^{37,46}.

3.4.4 Análisis de las secuencias de proteínas codificadas por los genes *emrA*, *arnA* y *marR*

Usando la herramienta ORFfinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>), a partir de las secuencias de nucleótidos de los tres genes estudiados se encontraron los marcos abiertos de lectura posibles que codifican para la proteína en cada uno de los genes y gracias a la herramienta ExPASy (<https://www.expasy.org/>) la secuencia proteica fue corroborada^{37,50,51}. Una vez obtenidas las secuencias proteicas, se realizó un alineamiento múltiple entre las secuencias para

identificar presencia de mutaciones o cambios en los aminoácidos, teniendo como referencia la cepa PAO1 de *Pseudomonas aeruginosa* (fenotipo sensible)^{37,52}.

3.4.5 Predicción de estructura secundaria y terciaria de las proteínas

A partir de la secuencia primaria de las proteínas, se predijo la estructura secundaria y terciaria utilizando las herramientas GOR IV e I-TASSER. Se usó la herramienta ProSA-web para validar la predicción de la estructura tridimensional. Lo anterior es de vital importancia para estudiar la evolución, estructura y función de las proteínas, lo cual es necesario conocer para realizar un adecuado diseño y búsqueda de fármacos cuando se quiere usar proteínas como posible blanco terapéutico^{37,48,53}.

4. Resultados

4.1 Identificación de los genes *emrA*, *arnA* y *marR* a partir de los genomas de dos cepas de *P. aeruginosa* MDR.

Se identificaron los principales genes de resistencia asociados a las cepas MDR 03 y 04 de *Pseudomonas aeruginosa*, tras la secuenciación con Illumina Miseq. Se clasificaron los genes teniendo en cuenta cuáles eran comunes a las dos cepas y cuáles eran propios de cada una (Tabla 1).

De acuerdo con el análisis de la función biológica de los genes en la bacteria por medio de la revisión de literatura, se eligieron tres genes de resistencia principales, para abarcar durante el estudio: *emrA*, *arnA* y *marR*.

<i>abaF</i>	<i>bmrA</i>	<i>mdtN</i>	<i>mdtB</i>	<i>tetA</i>
<i>acrA</i>	<i>cnrA</i>	<i>mexA_1</i>	<i>mdtC_1</i>	<i>vanW</i>
<i>acrB_1</i>	<i>copA_3</i>	<i>mexA_2</i>	<i>mdtC_2</i>	<i>yaaA</i>
<i>acrB_2</i>	<i>copB</i>	<i>mexB</i>	<i>mexR</i>	<i>jefA</i>
<i>acrB_3</i>	<i>czcA_1</i>	<i>emrA</i>	<i>OhrR</i>	<i>farB_1</i>
<i>acrE</i>	<i>czcA_2</i>	<i>emrB_1</i>	<i>oqxB10</i>	<i>farB_2</i>
<i>arnA</i>	<i>czcB</i>	<i>emrB_2</i>	<i>oqxB7</i>	<i>mdtK_1</i>
<i>arsR2</i>	<i>czcC</i>	<i>emrB_3</i>	<i>pasT</i>	<i>mdtK_2</i>
<i>bcr1</i>	<i>mdtD</i>	<i>mdtA</i>	<i>smvA</i>	<i>norM</i>
<i>bcr2</i>	<i>mdtE</i>	<i>jefA</i>	<i>stp</i>	<i>marR</i>

MDR03 y MDR04

MDR03

MDR04

Tabla 1. Genes presentes en cepas MDR 03 y 04 de *P. aeruginosa*. Se presentan con distintos colores los genes en común y propios de cada cepa de interés.

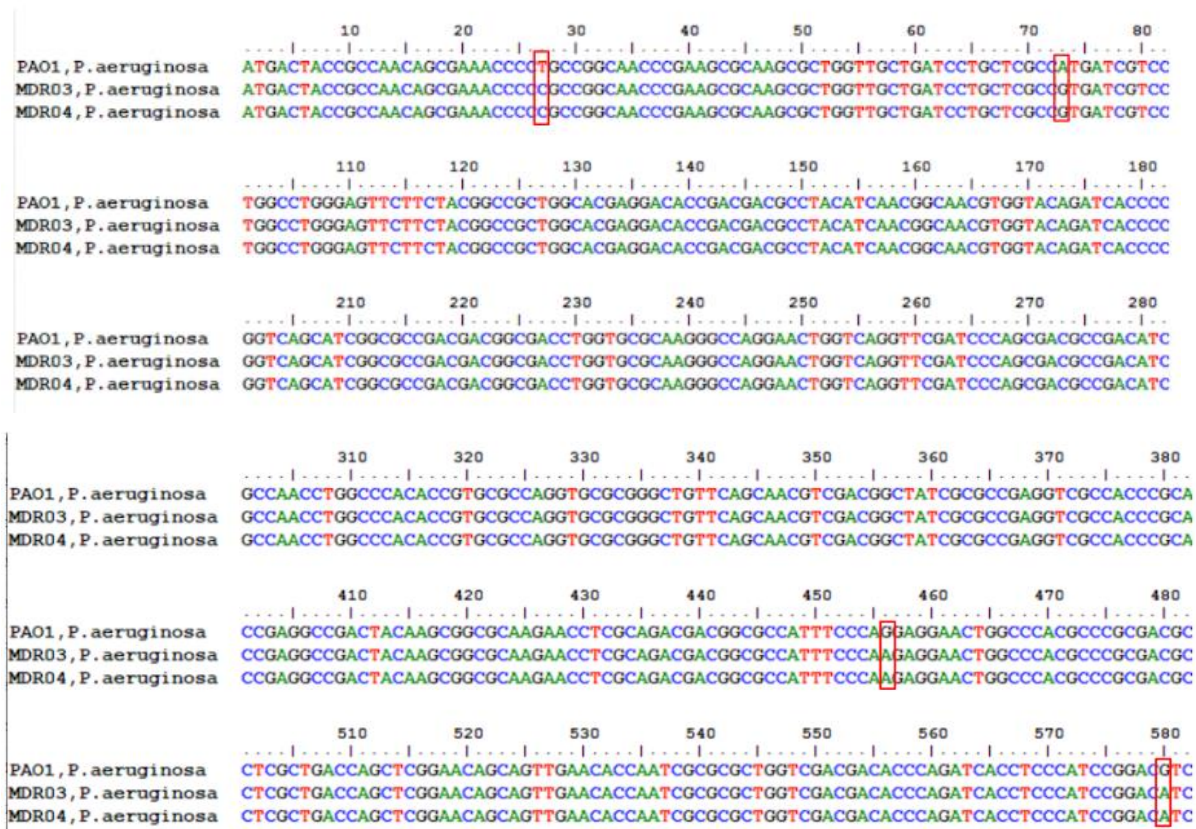
4.2 Comparación de secuencias de los genes *emrA*, *arnA* y *marR* para determinar mutaciones puntuales asociadas a resistencia.

En primer lugar, la identidad de las secuencias para los genes *ermA*, *arnA* y *marR* fue confirmada usando la herramienta BlastN. Posteriormente para determinar las mutaciones puntuales se comparó la cepa de referencia de cada gen con las cepas MDR 03 y 04 de la bacteria.

4.2.1. Mutaciones en la secuencia del gen *emrA*

En cuanto al alineamiento múltiple del gen *EmrA* realizado con la cepa sensible PAO1 de *P. aeruginosa* y las cepas MDR se evidenció que el gen *EmrA* presentaba una alta identidad con las secuencias estudiadas de MDR 03 y 04 (99,16 %), en comparación con *Pseudomonas aeruginosa* PAO1(Fig 1).

Adicionalmente, se encontraron 10 posiciones de cambios en los nucleótidos. Se presentaron mutaciones de tipo sustitución, donde el 80 % fueron por transición y el 20 % por transversión. Adicionalmente el 70 % fueron mutaciones silenciosas (cambio de nucleótido que genera el mismo aminoácido), 10 % mutaciones de cambio de sentido conservativas (cambio de nucleótido que genera un aminoácido con la misma naturaleza química) y, por último, el 20 % fueron mutaciones de cambio de sentido no conservativa (cambio de nucleótido que genera un aminoácido de distinta naturaleza química) (Fig 1, Tabla 2).



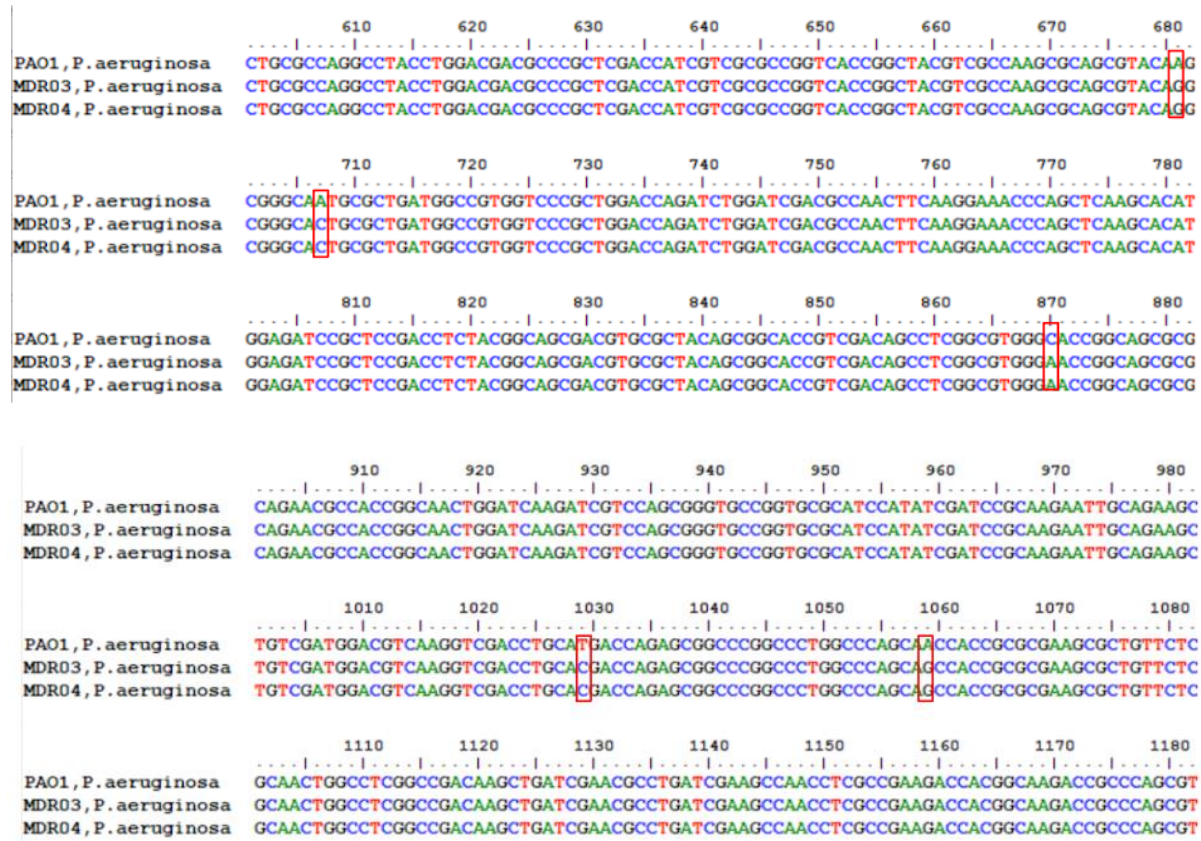


Figura 1. Alineamiento múltiple de secuencias de nucleótidos del gen EmrA en cepas de *P. aeruginosa* MDR 03, 04, y cepa de referencia o sensible *P. aeruginosa* PAO1 realizado por medio de programa Clustal Omega.

Ubicación	Cambio	DNA	RNA	A.A	Tipo de mutación
27	T-C	CCC	CCC	Pro	Mutación silenciosa
73	A-G	GTG	GUG	Val	Mutación de cambio de sentido
456	G-A	CAA	CAA	Gln	Mutación silenciosa
484	T-C	CTG	CUG	Leu	Mutación silenciosa
580	G-A	ATC	AUC	Ile	Mutación de cambio de sentido conservativa
681	A-G	CAG	CAG	Gln	Mutación silenciosa
707	A-C	ACT	ACU	Thr	Mutación de cambio de sentido
870	C-A	GGA	GGA	Gly	Mutación Silenciosa
1029	T-C	CAC	CAC	His	Mutación Silenciosa
1059	A-G	CAG	CAG	Gln	Mutación Silenciosa

Tabla 2. Mutaciones tipo sustitución encontradas en el gen *EmrA* de cepas MDR 03 y 04 en comparación con la cepa de referencia PA01 de *P. aeruginosa*.

4.2.2 Mutaciones en la secuencia del gen *ArnA*

En el alineamiento múltiple del gen *ArnA*, se obtuvo que las cepas MDR estudiadas presentaban una alta identidad (99.5 %) con la cepa de referencia PA01 de *Pseudomonas aeruginosa* (Fig 3). Se presentaron mutaciones al comparar la cepa de referencia junto con las cepas MDR 03 y 04, en donde existen 10 lugares clave de cambios de nucleótidos, de los cuales, el 60% corresponde a mutaciones silenciosas y 40% a mutaciones de cambio de sentido (Fig 3, Tabla 3). Una de estas mutaciones es no conservativa, por lo que el aminoácido resultante es de naturaleza química distinta, lo que puede conllevar a cambios en el funcionamiento del microorganismo. Asimismo, el 80% de mutaciones fueron por transición, es decir, con un cambio de nucleótido de la misma naturaleza química (purinas o pirimidinas) (Fig 3, Tabla 3).

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
PAO1  ATGACCTCGAAAGCGTTCGTCTTTCGCCTACCACGACATCGGTTGCACCGGTATCGAAGCCCTGCTCAATGCCGGCTACGAGATCGCCGCCGTCTT
MDR03 ATGACCTCGAAAGCGTTCGTCTTTCGCCTACCACGACATCGGTTGCACCGGTATCGAAGCCCTGCTCAATGCCGGCTACGAGATCGCCGCCGTCTT
MDR04 ATGACCTCGAAAGCGTTCGTCTTTCGCCTACCACGACATCGGTTGCACCGGTATCGAAGCCCTGCTCAATGCCGGCTACGAGATCGCCGCCGTCTT

      110     120     130     140     150     160     170     180     190
PAO1  ATGCCGACGACCCACGGGAAAACACCTTCTACGCCTCGGTGCACGCCTCTGTGCCGAGCGGGCATTCCGCTGCACGCGCCCAGGACGTGAAC
MDR03 ATGCCGACGACCCACGGGAAAACACCTTCTACGCCTCGGTGCACGCCTCTGTGCCGAGCGGGCATTCCGCTGCACGCGCCCAGGACGTGAAC
MDR04 ATGCCGACGACCCACGGGAAAACACCTTCTACGCCTCGGTGCACGCCTCTGTGCCGAGCGGGCATTCCGCTGCACGCGCCCAGGACGTGAAC

      210     220     230     240     250     260     270     280     290
PAO1  GCTGTGGCTGGAGCGCATCCGCCAACTGCGCCCGGACTTCCTGTTCTCCTTCTACTACCGCCGCTGCTCGGCGCCGAGCTGCTCGCCTGCGCCG
MDR03 GCTGTGGCTGGAGCGCATCCGCCAACTGCGCCCGGACTTCCTGTTCTCCTTCTACTACCGCCGCTGCTCGGCGCCGAGCTGCTCGCCTGCGCCG
MDR04 GCTGTGGCTGGAGCGCATCCGCCAACTGCGCCCGGACTTCCTGTTCTCCTTCTACTACCGCCGCTGCTCGGCGCCGAGCTGCTCGCCTGCGCCG

      310     320     330     340     350     360     370     380     390
PAO1  GGCGCCTACAACCTGCACGGTTCGCTGCTGCCGCGCTACCGCGGACGCGCCCGGGCAACTGGGTGCTGGTCAACGGCGAAACGCAGACCCGGGGT
MDR03 GGCGCCTACAACCTGCACGGTTCGCTGCTGCCGCGCTACCGCGGACGCGCCCGGGCAACTGGGTGCTGGTCAACGGCGAAACGCAGACCCGGGGT
MDR04 GGCGCCTACAACCTGCACGGTTCGCTGCTGCCGCGCTACCGCGGACGCGCCCGGGCAACTGGGTGCTGGTCAACGGCGAAACGCAGACCCGGGGT

      410     420     430     440     450     460     470     480     490
PAO1  TGCATCGCATGATCGAGCGCGCCGACGCCGGGCCGATCCTCGCCAGCAGGCCGTGCCATCGACCCCGAGGACACCCGCTGAGCCTGCACGGC
MDR03 TGCATCGCATGATCGAGCGCGCCGACGCCGGGCCGATCCTCGCCAGCAGGCCGTGCCATCGACCCCGAGGACACCCGCTGAGCCTGCACGGC
MDR04 TGCATCGCATGATCGAGCGCGCCGACGCCGGGCCGATCCTCGCCAGCAGGCCGTGCCATCGACCCCGAGGACACCCGCTGAGCCTGCACGGC

      510     520     530     540     550     560     570     580     590
PAO1  GCGCAAGGCGCCGGCGCCCTGCTGCGCGACAGCCTGCCGCTGCTCGCCCTCGGCGTGCTGCCGGAAGTCGAGCAGGACGAGAGCCAGGCCAGCC
MDR03 GCGCAAGGCGCCGGCGCCCTGCTGCGCGACAGCCTGCCGCTGCTCGCCCTCGGCGTGCTGCCGGAAGTCGAGCAGGACGAGAGCCAGGCCAGCC
MDR04 GCGCAAGGCGCCGGCGCCCTGCTGCGCGACAGCCTGCCGCTGCTCGCCCTCGGCGTGCTGCCGGAAGTCGAGCAGGACGAGAGCCAGGCCAGCC

      610     620     630     640     650     660     670     680     690
PAO1  GGCCGGCGCACCCCGGGGACGGCCTGCTCGACTGGCACAGGCCGGCACGGCAGTTGTACGACCTGGTGCAGCGGGTACCCAGCCCTACCCCTGG
MDR03 GGCCGGCGCACCCCGGGGACGGCCTGCTCGACTGGCACAGGCCGGCACGGCAGTTGTACGACCTGGTGCAGCGGGTACCCAGCCCTACCCCTGG
MDR04 GGCCGGCGCACCCCGGGGACGGCCTGCTCGACTGGCACAGGCCGGCACGGCAGTTGTACGACCTGGTGCAGCGGGTACCCAGCCCTACCCCTGG

```

```

      710      720      730      740      750      760      770      780      790
?AO1 TCTGCCAGGTCGGCGAACAGAAGCTGATCGTCTGGAGCGCCGAGGTGGTTCGCCGGCAACCACGGTCCGCGAGCCGGGCAGCGTACTGTCCCTGCGAC
MDR03 TCTGCCAGGTCGGCGAACAGAAGCTGATCGTCTGGAGCGCCGAGGTGGTTCGCCGGCAACCACGGTCCGCGAGCCGGGCAGCGTACTGTCCCTGCGAC
MDR04 TCTGCCAGGTCGGCGAACAGAAGCTGATCGTCTGGAGCGCCGAGGTGGTTCGCCGGCAACCACGGTCCGCGAGCCGGGCAGCGTACTGTCCCTGCGAC

      810      820      830      840      850      860      870      880      890
?AO1 GCGGATCGCCTGCGGCGAGGACTCGCTGGTGTCTGCGCTTCGGCCAGCGCGGCGAGCGCGGCCGTACCTGGCCGGCACGCAACTGGCCACCAGGC
MDR03 GCGGATCGCCTGCGGCGAGGACTCGCTGGTGTCTGCGCTTCGGCCAGCGCGGCGAGCGCGGCCGTACCTGGCCGGCACGCAACTGGCCACCAGGC
MDR04 GCGGATCGCCTGCGGCGAGGACTCGCTGGTGTCTGCGCTTCGGCCAGCGCGGCGAGCGCGGCCGTACCTGGCCGGCACGCAACTGGCCACCAGGC

      910      920      930      940      950      960      970      980      990
?AO1 CTGGTTCGAGGGCGCGCGCTGCGTGGCGCGGCATGCACTCCGAGCGCCGCACGCGGGTGTGATCCTCGGGGTCAACGGCTTCATCGGCAACCA
MDR03 CTGGTTCGAGGGCGCGCGCTGCGTGGCGCGGCATGCACTCCGAGCGCCGCACGCGGGTGTGATCCTCGGGGTCAACGGCTTCATCGGCAACCA
MDR04 CTGGTTCGAGGGCGCGCGCTGCGTGGCGCGGCATGCACTCCGAGCGCCGCACGCGGGTGTGATCCTCGGGGTCAACGGCTTCATCGGCAACCA

     1010     1020     1030     1040     1050     1060     1070     1080     1090
?AO1 CCGAACGCCTGCTGCGCGACGGTGGCTACGAGGTCCACGGCATGGACATCGGCTCCGACGCCATCGAACGGCTCAAGGCCGACCCGCATTTCCAC
MDR03 CCGAACGCCTGCTGCGCGACGGTGGCTACGAGGTCCACGGCATGGACATCGGCTCCGACGCCATCGAACGGCTCAAGGCCGACCCGCATTTCCAC
MDR04 CCGAACGCCTGCTGCGCGACGGTGGCTACGAGGTCCACGGCATGGACATCGGCTCCGACGCCATCGAACGGCTCAAGGCCGACCCGCATTTCCAC

     1110     1120     1130     1140     1150     1160     1170     1180     1190
PAO1 CGAAGGCGACATCGGCATCCATTCGGAGTGGCTCGAATACCATGTGAAGAAATGCGACGTGATCCTGCCGCTGGTGGCCATCGCCACGCCCATCG
MDR03 CGAAGGCGACATCGGCATCCATTCGGAGTGGCTCGAATACCATGTGAAGAAATGCGACGTGATCCTGCCGCTGGTGGCCATCGCCACGCCCATCG
MDR04 CGAAGGCGACATCGGCATCCATTCGGAGTGGCTCGAATACCATGTGAAGAAATGCGACGTGATCCTGCCGCTGGTGGCCATCGCCACGCCCATCG

     1210     1220     1230     1240     1250     1260     1270     1280     1290
PAO1 ACGCGCAACCCGCTGCGGGTGTTCGAACTGGACTTCGAGGAAAACCTGCGGATCGTCCGCTACTGCGTGAAATACGGCAAAACGCGTGGTGTTC
MDR03 ACGCGCAACCCGCTGCGGGTGTTCGAACTGGACTTCGAGGAAAACCTGCGGATCGTCCGCTACTGCGTGAAATACGGCAAAACGCGTGGTGTTC
MDR04 ACGCGCAACCCGCTGCGGGTGTTCGAACTGGACTTCGAGGAAAACCTGCGGATCGTCCGCTACTGCGTGAAATACGGCAAAACGCGTGGTGTTC

```



Figura 2. Alineamiento múltiple de secuencias de nucleótidos de cepas de *P.aeruginosa* MDR 03, MDR 04 y cepa de referencia o sensible *P.aeruginosa* PAO1 con gen *ArnA* realizado por el programa Clustal Omega.

Ubicación	Cambio	ADN	ARN	A.A.	Tipo de mutación
153	C-T	TGT	UGU	Cys	Mutación silenciosa
216	T-C	CGC	CGC	Arg	Mutación silenciosa
765	C-T	GGT	GGU	Gly	Mutación silenciosa
933	A-G	GCG	GCG	Ala	Mutación silenciosa
935	G-C	TCC	UCC	Ser	Mutación de cambio de sentido
937	A-G	GGC	GGC	Gly	Mutación de cambio de sentido
939	A-G	GGC	GGC	Gly	Mutación de cambio de sentido
1023	T-G	GGG	GGG	Gly	Mutación silenciosa
1162	A-G	GTC	GUC	Val	Mutación de cambio de sentido conservativa
1356	C-T	AAT	AAU	Asn	Mutación silenciosa

Tabla 3. Mutaciones tipo sustitución encontradas en el gen *ArnA* de cepas MDR 03 y MDR 04 en comparación con la cepa de referencia PAO1 de *P. aeruginosa*.

4.2.3 Mutaciones en la secuencia del gen *MarR*

Con respecto a la comparación entre las cepas MDR 03, MDR 04 y de referencia PAO1, del gen *MarR* se encontraron dos lugares de cambio de nucleótidos en la posición 447 y 448, las cuales son sustitución por transversión y el 100 % fueron mutaciones silenciosas. Así mismo, se evidenció que las cepas MDR03 y MDR04 presentan una alta identidad (99,58%) con la cepa PAO1. (Fig 4, Tabla 4)

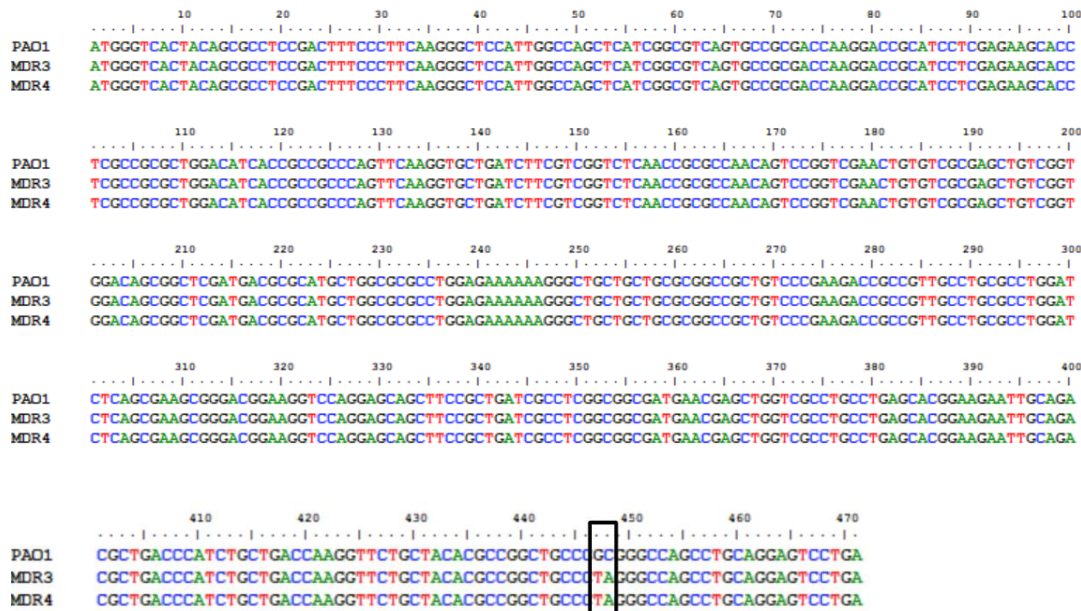


Figura 3. Alineamiento múltiple de secuencias, cepas de *P. aeruginosa* MDR 03, MDR 04 y de referencia *P. aeruginosa* PAO1 con gen MarR realizado por medio de programa Clustal Omega. En el recuadro color negro se muestra el punto de mutación evidenciado en el nucleótido 447 y 448.

Ubicación	Cambio	DNA	RNA	A.A	Tipo de mutación
447	G-T	CCT	CCU	Pro	mutación silenciosa
448	C-A	AGG	AGG	Arg	mutación silenciosa

Tabla 4. Mutaciones tipo sustitución encontradas en el gen *MarR* de cepas MDR 03 y 04 en comparación con la cepa de referencia PAO1 de *P. aeruginosa*.

4.2.4 Comparación de secuencias ortólogas del gen *emrA*, *arnA* y *marR*

4.2.4.1 Alineamiento múltiple de secuencias ortólogas del gen *emrA*

El alineamiento múltiple de las secuencias ortólogas demostró que el gen *EmrA* de *Pseudomonas aeruginosa* MDR03 y MDR04 compartía identidad con *Stenotrophomonas maltophilia* (68,37 %), *Hafnia paralvei* (54,06 %), *K.Oxytoca* (57,51 %), *E.coli* (53,63%), *Shigella sonnei*, (53,63 %),

Salmonella bongori (53,80 %), *Citrobacter youngae* (54,66 %), *Proteus mirabilis* (47,24 %) y *Morganella morganii* (55,21 %) (ver anexo 1).

4.2.4.2 Alineamiento múltiple secuencias ortólogas gen *arnA*

El alineamiento múltiple de las secuencias ortólogas demostró que el gen *ArnA* de *Pseudomonas aeruginosa* MDR03 y MDR04 comparte identidad con *Yersinia enterocolitica* (59.29 %), *Proteus mirabilis* (58.27%), *Morganella morganii* (68.23%), *Klebsiella oxytoca* (69.55%), *Enterobacter cloacae* (69.75%), *Salmonella bongori* (64.85%), *Escherichia coli* (65.60%), *Shigella sonnei* (65.76%), *Citrobacter youngae* (67.17%) y *Aeromonas hydrophila* (75.00%) (ver anexo 2)

4.2.4.3 Alineamiento múltiple secuencias ortólogas gen *MarR*

El alineamiento de las secuencias ortólogas demostró que el gen *MarR* en *Pseudomonas aeruginosa* MDR03 y MDR04 comparte identidad con *Escherichia coli* (46.53%), *Citrobacter youngae* (47.69%), *Enterobacter ludwigii* (48.84%), *Klebsiella grimontii* (48.38%) , *Cronobacter malonicus* (49.77%), *Shigella sonnei* (45.83%), *Kosakonia radicincitans* (47.45%), *Burkholderia ambifaria* (40.62%), *Klebsiella oxytoca* (48.38%) y *Salmonella bongori* (46.30%) (ver anexo 3).

Por otra parte, el alineamiento permitió identificar múltiples sustituciones de nucleótidos, entre las cuales se destaca el cambio en la posición 361 del alineamiento y 346 de la secuencia (G →T), la cual se encuentra presente en las cepas MDR03 y 04 de *P. aeruginosa* a diferencia de los ortólogos (ver anexo 3).

4.3 Análisis filogenético de los genes *EmrA*, *ArnA* y *MarR*

Se observó que el gen *EmrA* de las cepas MDR 03 y 04 de *Pseudomonas aeruginosa* presentan un distanciamiento evolutivo en comparación con los ortólogos, sin embargo, ambas cepas presentan una alta similitud con *Stenotrophomonas maltophilia* (Fig 6A). Además, se evidencia que los microorganismos más alejados evolutivamente son *E. coli* y *Shigella sonnei* (Fig 5A).

Por otro lado, el árbol filogenético muestra el acercamiento de las diversas cepas asociadas al gen *ArnA*. Con base en el estudio, se observa que *Aeromonas hydrophila* presenta una alta similitud. Asimismo, las cepas más alejadas filogenéticamente, incluyen *E. coli* y *Shigella sonnei* (Fig 5B).

En cuanto al análisis filogenético del gen *MarR*, se puede observar que *Burkholderia ambifaria* presenta mayor similitud con las cepas MDR 03 y 04 y los microorganismos más alejados evolutivamente son *E.coli* y *Shigella sonnei* (Fig 5C).

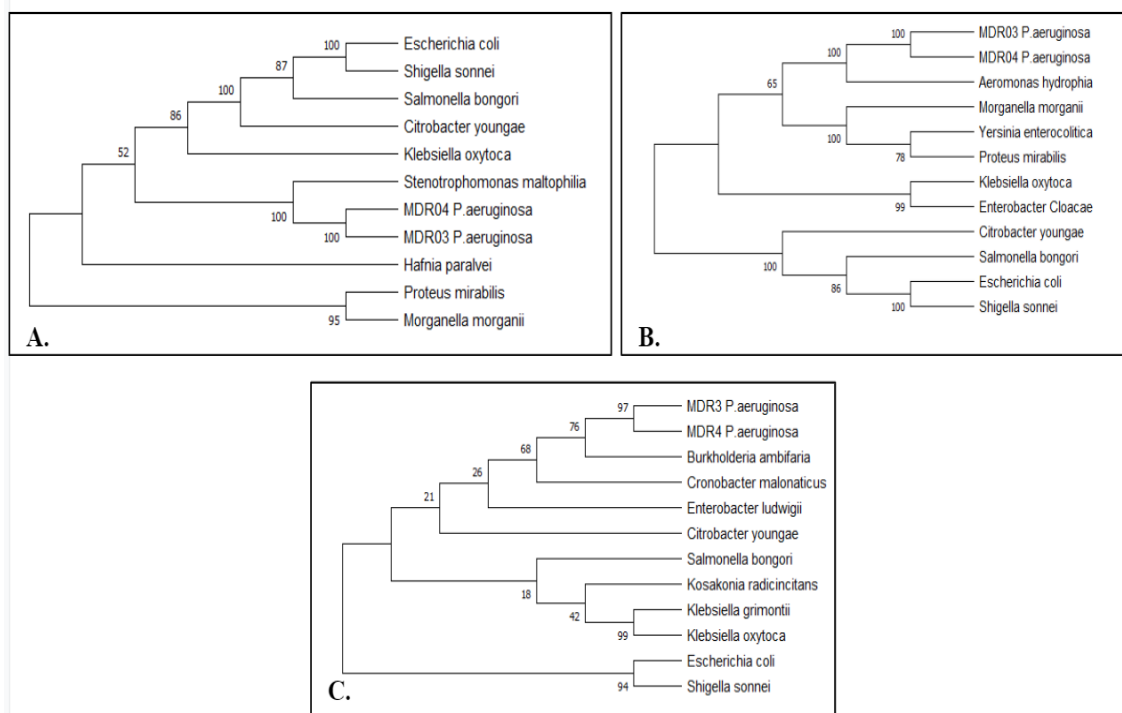


Figura 4. Árboles filogenéticos de secuencias de los genes *EmrA*, *ArnA*, *MarR* de *P. aeruginosa* con relación a otras bacterias ortólogas. Se observa el análisis para el gen *EmrA*, *ArnA* y *MarR* en los apartados A, B y C respectivamente. Se usó el método de *Neighbor-joining* para inferir la historia evolutiva de los genes y se construyó por medio del programa MEGA X.

4.4 Análisis de secuencias de proteínas codificadas por los genes *emrA*, *arnA* y *marR*

4.4.1 Predicción de los marcos abierto de lectura y secuencias aminoacídicas de las proteínas codificadas por los genes *emrA*, *arnA* y *marR*

Por medio de las herramientas ORF finder de NCBI y Expsy se obtuvo las estructuras primarias para las proteínas que codifican los genes *emrA*, *arnA* y *marR* para las cepas MDR 03 y MDR 04, a través de la búsqueda de los marcos abiertos de lectura (ORF), se escogieron los ORF teniendo en cuenta que permitieran producir las proteínas de mayor longitud y completamente funcionales. Se encontró que para el gen *EmrA* de MDR 03y MDR04 se obtuvo una proteína de 394 aminoácidos (Figura 6A). En cuanto al gen *arnA* de MDR 03 y MDR04 se obtuvo una proteína de 662 aminoácidos (Figura 6B). Por último, en cuanto al gen *MarR* se obtuvo para ambas cepas una proteína de 164 aminoácidos (a.a) (Fig 6C).

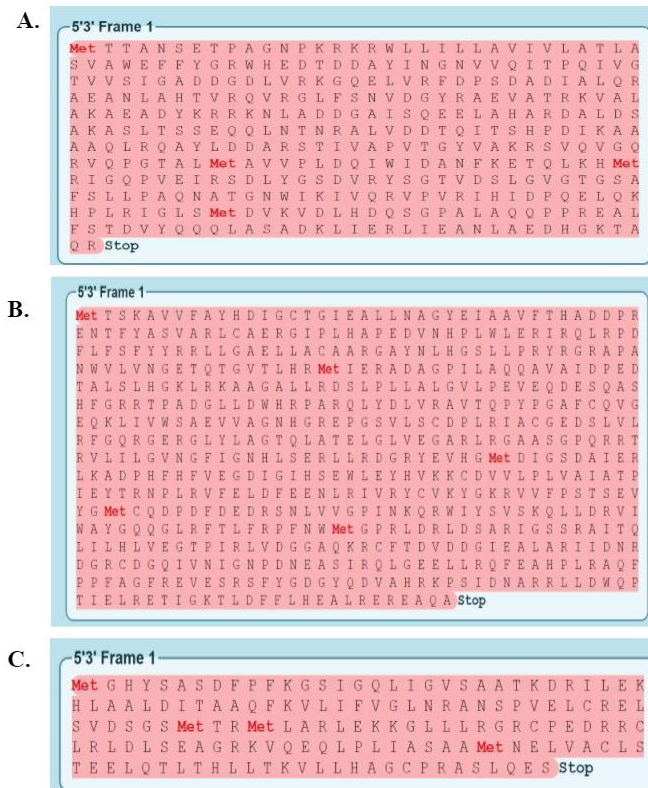


Figura 5. Marcos abiertos de lectura en el gen *emrA*, *arnA* y *marR* de *Pseudomonas aeruginosa* MDR 03 y MDR 04 obtenidos mediante Expsy. Se muestran los marcos de lectura abiertos (ORF) de los genes que codifican para las proteínas EmrA (Fig. A), ArnA (Fig. B) y MarR (Fig. C).

4.4.1 Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos codificados por los genes de interés

4.4.1.1 Alineamiento múltiple de secuencia de aminoácidos codificado por el gen *emrA*

La comparación de las secuencias de la proteína codificada por el gen *EmrA* de *P.aeruginosa* con la cepa de referencia PAO1 arrojó un porcentaje de identidad de 99,24 % para ambas cepas. Así mismo, se observó una sustitución de aminoácidos (Met 25 → Val, Val 194 → Iie, Asn 236 → Thr) tanto en MDR 03 como en MDR 04 (Fig 7).

En cuanto a los ortólogos, se obtuvo que para las cepas estudiadas los porcentajes de identidad oscilaron entre 43,78% a 58, 93%, donde el microorganismo con mayor porcentaje de identidad fue *Stenotrophomonas maltophilia* y el menor fue *Morganella morganii* (ver anexo 4).

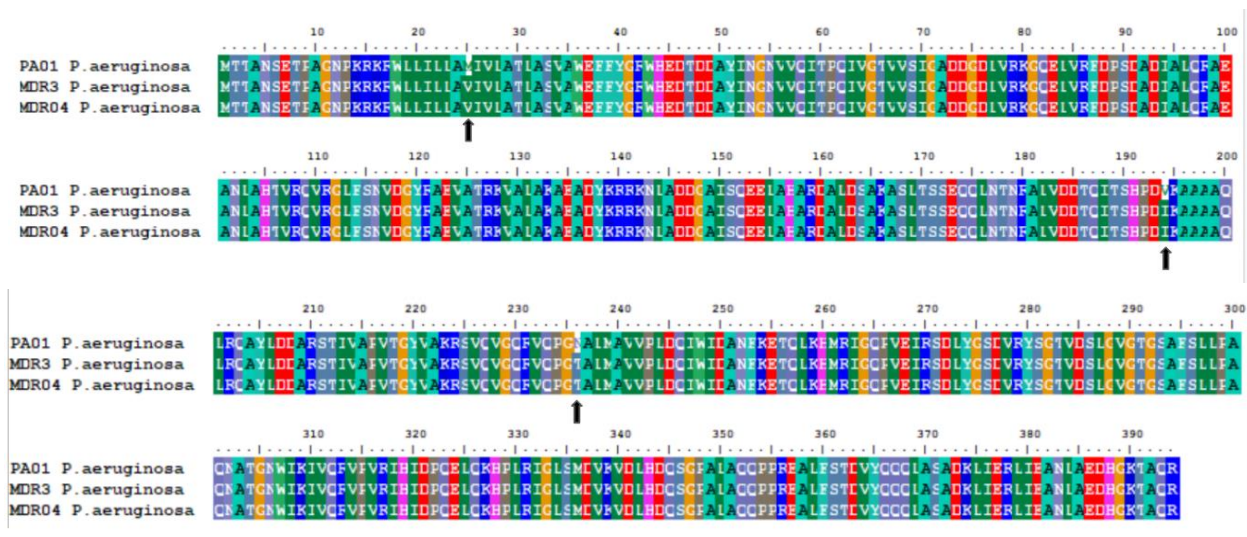


Figura 6. Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas de la proteína EmrA de cepas MDR 03 y 04 y cepa de referencia PAO1 de *P. aeruginosa* (Fenotipo sensible), realizado por el programa Clustal Omega. Se muestra la identidad con el fondo color. Las flechas de color negro indican la sustitución de aminoácidos evidenciados.

4.4.1.2 Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos codificado por el gen *arnA*

Al realizar la comparación de secuencias del *ArnA* de las cepas MDR 03 y 04, relacionadas a la cepa de referencia PAO1 de *Pseudomonas aeruginosa*, se observó que hay un porcentaje de identidad de 99.50%, donde se evidencia una sustitución de aminoácidos (Cis 312 → Ser, Ser 313→Cis, Iie 388→Val), en las cepas resistentes MDR (Fig.8).

En cuanto a los ortólogos, se observó un porcentaje de identidad entre 66.51 y 71,47 %, donde la bacteria con mayor porcentaje de identidad fue *Aeromonas hydrophila*, y la de menor porcentaje de identidad fue *Salmonella bongori* Se encontraron múltiples sustituciones de aminoácidos, en la que destaca el cambio en la posición 20 del alineamiento y 18 de la secuencia (Ser 18 → Ala), presente en la cepa MDR 03 y 04, entre otros ortólogos (ver anexo 5)

Adicionalmente, se evidencia la presencia de aminoácidos conservados ALA393, SER433, ASN492, ARG 510, GLN 514, VAL528, ASP615 y ARG 619 en todos los ortólogos y las cepas MDR (ver anexo 5)

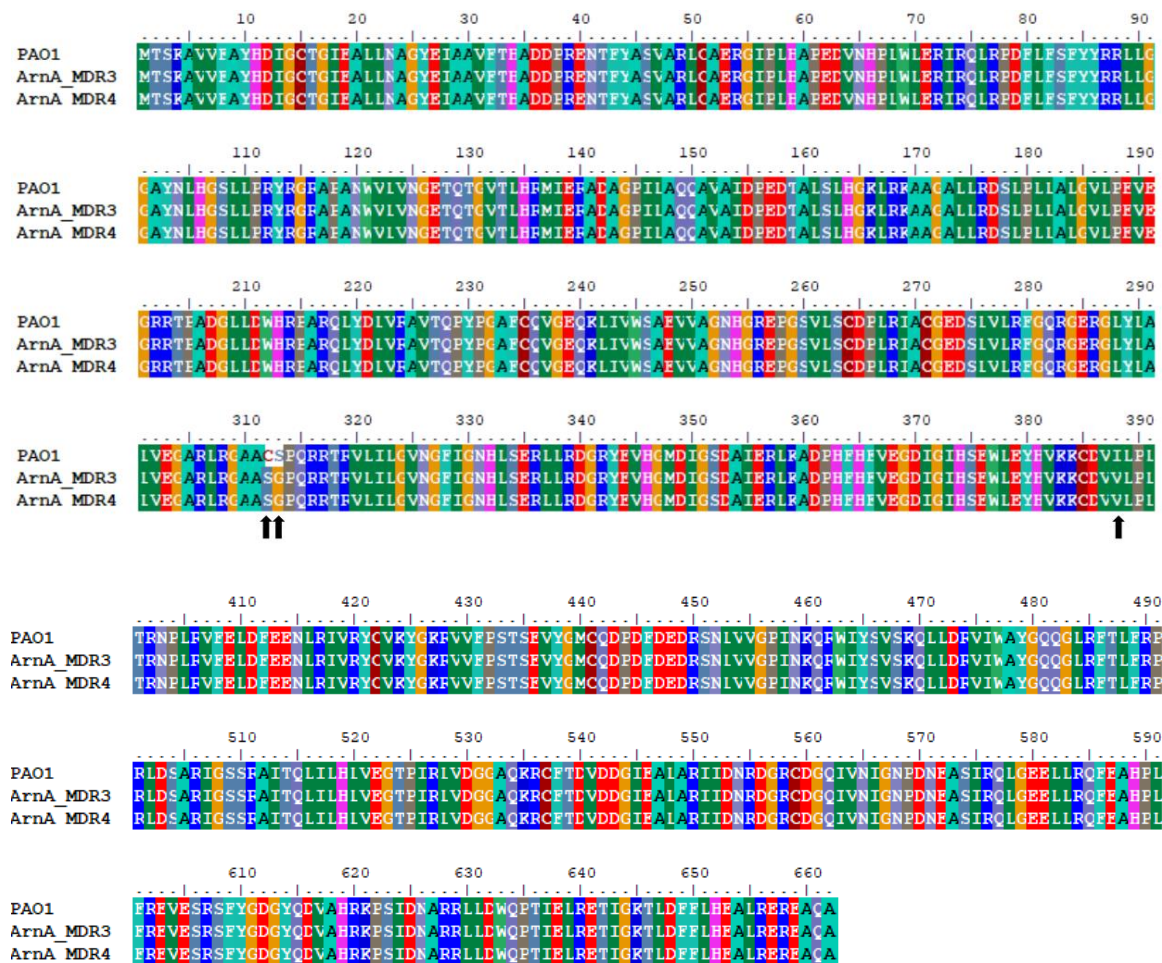


Figura 7. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de la proteína ArnA de las cepas MDR 03 y MDR 04, con respecto a la cepa de referencia de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 realizado por el programa Clustal omega. Se señala con flechas negras la sustitución de aminoácidos evidenciados.

4.4.1.3 Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos codificadas por el gen *marR*

En la comparación de secuencias del MarR de las cepas MDR 03 y 04, relacionadas a la cepa de referencia PAO1 de *Pseudomonas aeruginosa*, se observó que hay un porcentaje de identidad de 100%. (Fig 9).

En cuanto a los ortólogos, presentan un porcentaje de identidad entre el 18.60% y 42.74%, donde la bacteria con mayor porcentaje de identidad fue *Shigella sonnei* y el menor porcentaje de identidad fue *Klebsiella grimontii* y *Klebsiella oxytoca*. Adicionalmente se evidenció la presencia de la mutación (GLU40) en las cepas MDR (ver anexo 6).

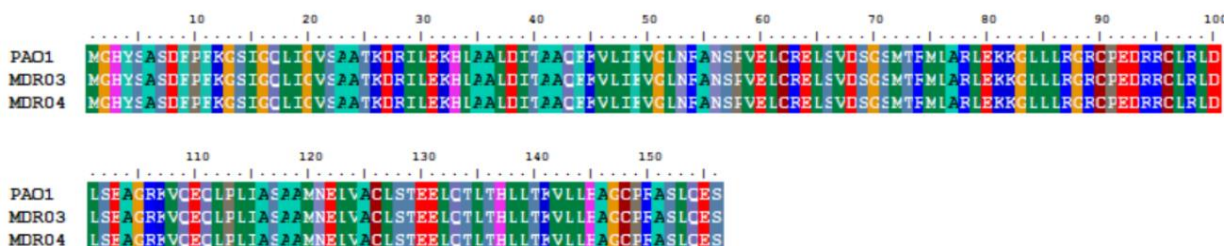


Figura 8. Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas de la proteína MarR de cepas MDR 03 y 04 y cepa de referencia PAO1 de *P. aeruginosa* (Fenotipo sensible) realizado por el programa Clustal omega. Se muestra la identidad con el fondo color.

4.5. Predicción de las estructuras secundaria y terciaria de las proteínas EmrA, ArnA y MarR de *P. aeruginosa* MDR 03 y 04

La predicción de la estructura secundaria de la proteína se realizó usando GOR IV, los resultados revelaron que la proteína EmrA de MDR 03 y 04 estaba formada un 46,19% por hélice alfa y 14,47% de cadena beta. Por otro lado, para ArnA tanto la cepa MDR 03 como MDR 04 estaban formadas en un 36,40% por Alfa hélice, y un 12,99% por Cadenas Beta. Por último, para MarR la predicción mostró un 58,33% Alfa hélice, 8,97% de cadena Beta (Figura 10).

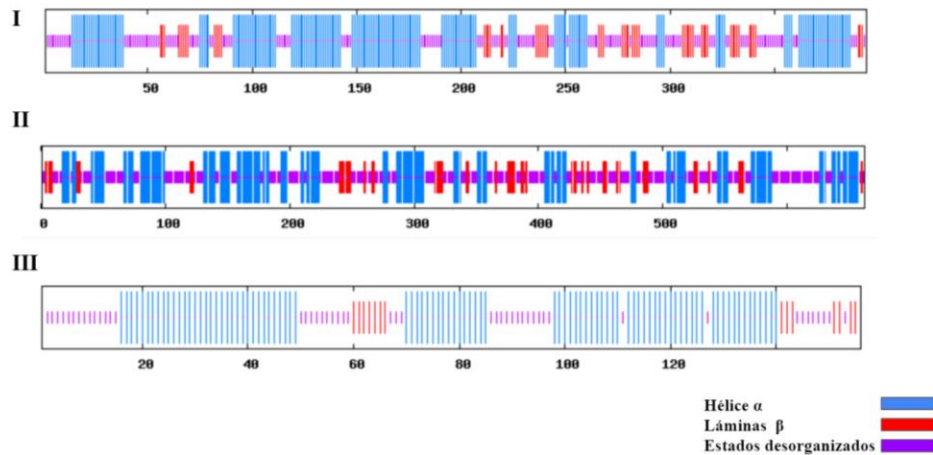


Figura 9. Método de predicción de estructura secundaria GOR IV, EmrA (I), ArnA (II), MarR(III) (visualización gráfica de la predicción); azul: hélice α ; rojo: cadena extendida (cadena β); violeta: otros estados (desorganizados) para las proteínas EmrA (I), ArnA (II), MarR(III) de *P. aeruginosa* MDR03 y MDR04.

Los modelos tridimensionales de las proteínas en estudio, se obtuvieron por medio de I-TASSER donde para el caso de todas las proteínas de interés se escogió el primer modelo presentado, debido a sus puntajes de C-Score y TM-score que aseguran un alto nivel de confianza y buena calidad.

Los puntajes para EmrA fueron C-Score: -2.22, TM-score: 0.45 ± 0.15 y RMSD: $12.1 \pm 4.4 \text{ \AA}$. Adicionalmente según los resultados del TM-align la proteína EmrA tiene una estructura similar a la proteína ErmA encontrada en *E.coli* (21,8%). (Fig 12 AI) Por otro lado, para ArnA se obtuvieron los C-Score: 1.11 TM-score: 0.87 ± 0.07 y RMSD: $5,5 \pm 3.5 \text{ \AA}$. De igual manera en el TM-align se obtuvo que tiene una estructura cercana a la proteína ArnA de *E.coli* (68,3 %) y a *E.coli* mutante R619M (77,2 %) (Fig 11 AII).

Por último, para la proteína de resistencia a múltiples fármacos MarR, el modelo seleccionado presentó un C-Score: 0.07, TM-score: 0.72 ± 0.11 y RMSD: $4.7 \pm 3.1 \text{ \AA}$. En el análisis de alineamiento estructural (TM-align) mostró que el modelo tiene una estructura similar al regulador transcripcional SlyA de *Salmonella sp* (22,9 %) y al regulador transcripcional de la familia MarR de *Pseudomonas putida* (16,8 %). (Fig 11A III)

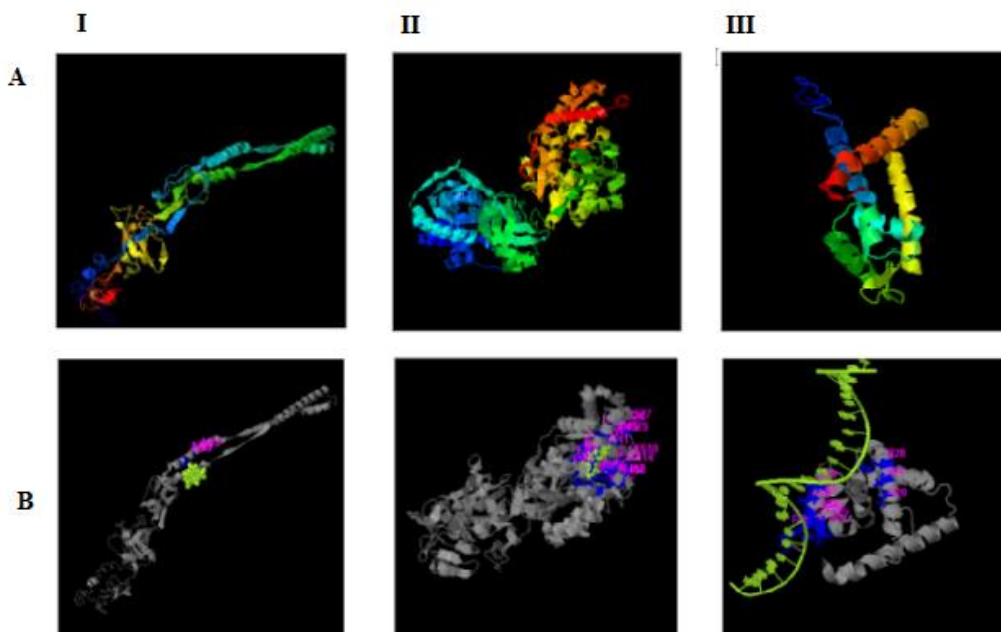


Figura 10. Modelo tridimensional de las proteínas deducidas de *emrA*, *arnA* y *marR* de *P. aeruginosa* MDR03 y MDR04 predicho por medio de la herramienta I-TASSER. I. EmrA; II. ArnA y III. MarR. A. Modelo tridimensional de la proteína. B. Sitios de unión a los ligandos.

En cuanto a la validación del modelo local, global y de estructura tridimensional de las proteínas de interés se obtuvieron puntuaciones Z de -4,69, -12,22 y -4,01 para EmrA, ArnA y MarR respectivamente, los cuales muestran que los modelos tienen una calidad razonable porque todos se encuentran dentro del rango de puntajes típicamente encontrados en proteínas nativas ya descritas en Protein Data Bank (PDB) y que poseen un tamaño similar, lo que se ve reflejado en la ubicación del punto negro en la gráfica, que puede presentarse más alejado dependiendo de la longitud de la proteína (Fig 12A). En la figura 12B se muestra los gráficos de energía de residuos de cada modelo, el cual se observa que la estructura tridimensional no tiene fracciones erróneas, ya que la mayor parte de las fluctuaciones se encuentran en la sección negativa, sin embargo, es importante recalcar que para el gráfico de energía de EmrA (Fig 12 I-B) presenta algunos picos hacia la parte positiva ubicados en extremo N-terminal y C-terminal, lo que se relaciona, con que EmrA es una proteína transmembranal. Por último, en la Figura 12C se muestra la estructura 3D visualizada en Jmol, donde se evidencia que las estructuras en los tres casos son estables ya que la mayoría de los residuos son de energía negativa (visualizados en color azul) y la cantidad de los residuos de energía positiva (visualizados en color rojo), no son representativos.

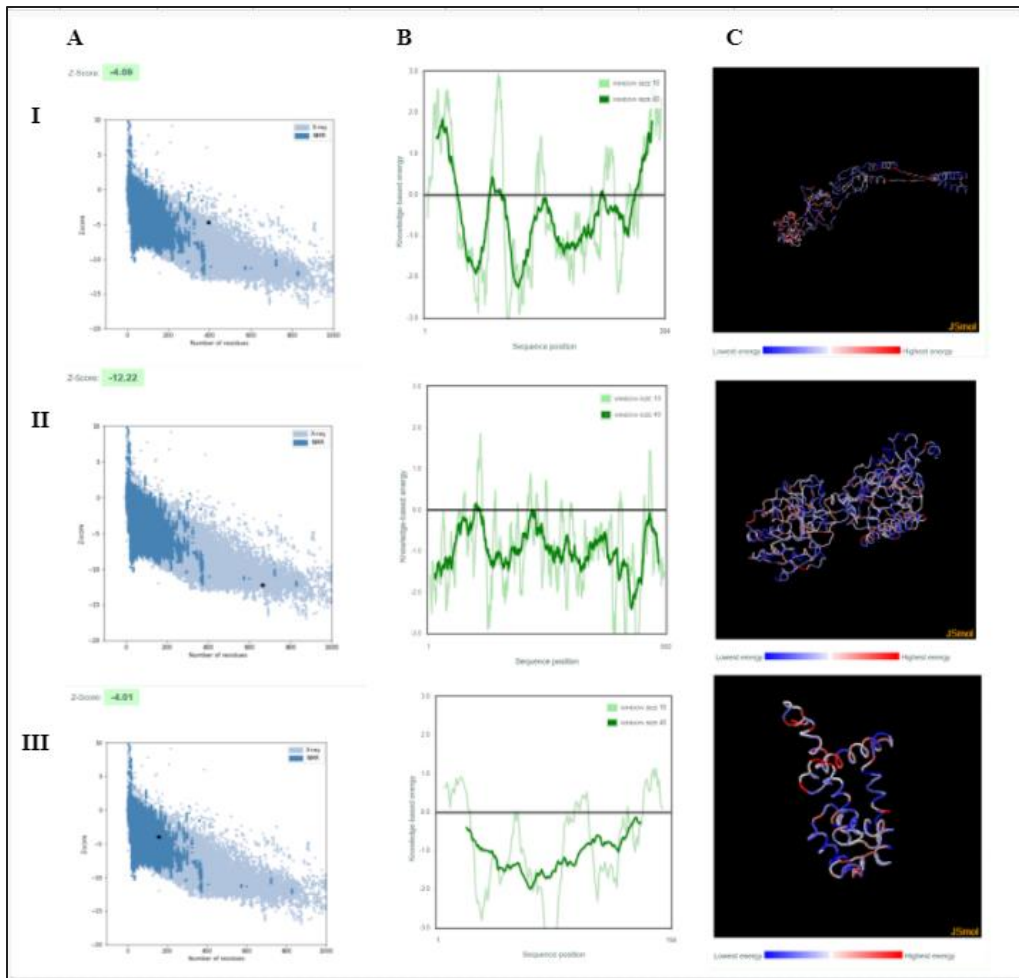


Figura 11. Validación local, global y estructural de los modelos tridimensionales de EmrA(I), ArnA (II) y MarR (III) mediante ProSA-web Gráficos de puntuación Z (A). Gráfico de energía de residuos (B). Representación visual de la energía en las estructuras tridimensionales mediante Jmol (C).

5. Discusión

El objetivo de este estudio fue la caracterización *in silico* de los genes *emrA*, *arnA* y *marR*, por medio de bases de datos y herramientas bioinformáticas que permitieron el análisis de las secuencias de los genes de interés, debido a que basados en la literatura, la función biológica de éstos es relevante para el aumento de resistencia en bacterias Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa*^{63,64,68}. En *E. coli*, por ejemplo, la sobreexpresión del *EmrA* está relacionada con un aumento en la resistencia a la nitroxolina al provocar un aumento de actividad de la bomba MDR EmrAB-TolC⁶⁸.

Con respecto al gen *ArnA*, este se ha visto involucrado en resistencia principalmente porque modifica la estructura del lípido A, uno de los principales componentes (de naturaleza hidrófoba) de los lipopolisacáridos presentes en la membrana de bacterias Gram negativas^{65,69}. Por otro lado, el gen *MarR* participa en la resistencia, ya que es un regulador transcripcional y al ser expuesto a diferentes sustancias se inactiva; esta inactivación produce la sobreexpresión de *MarA* que va a genes diana en la bacteria activando una mayor expresión de la bomba de salida AcrAB-TolC y así provocando la liberación de antibióticos^{70,71}.

Referente a lo encontrado al realizar el alineamiento múltiple de secuencias de nucleótidos en relación con la cepa de referencia PAO1, se evidenció la presencia de mutaciones de cambio de sentido en *emrA* y *arnA*, lo cual se vio reflejado en el alineamiento de secuencias aminoacídicas de las proteínas (M25V, V194I, N236T en el caso de las observadas en *emrA*) (C312S, S313C, I388V según lo encontrado en la proteína codificada por *arnA*). Estas mutaciones provocan un cambio en el marco de lectura, lo que puede alterar la funcionalidad de manera negativa o positiva en la proteína. Comúnmente se asocia con alteraciones en la longitud de ésta, cambios fisicoquímicos y en la composición de su estructura tanto secundaria como terciaria, lo que puede resultar en una proteína no funcional que interrumpe los procesos bioquímicos de la célula⁸³.

Por otro lado, al realizar la comparación de las secuencias de nucleótidos de cepas resistentes con otros organismos ortólogos se evidenció múltiples cambios en los nucleótidos, entre los cuales se

destacó el cambio en la posición 346 (G → T) en el gen *MarR* presente en MDR03 y MDR04. Esta mutación había sido registrada en *E.coli* tolerante al ciclohexano, donde se afirmó que estaba implicada en la sobreexpresión de la bomba de salida AcrAB-ToIC y por lo tanto aumentaba la resistencia a solventes orgánicos como el ciclohexano^{70,71}.

Adicionalmente, en la proteína ArnA predicha se encontró una sustitución de aminoácidos (S18A) que ya previamente ha sido reportada en *Klebsiella pneumoniae*, la cual estaba involucrada en el cambio de la ruta del lípido A-Ara4N, que provoca un aumento en la carga negativa en la membrana externa, lo que reduce su afinidad para interactuar con antibióticos catiónicos, como la colistina⁷².

Es importante resaltar que los aminoácidos en sus respectivas posiciones ALA393, SER433, ASN492, ARG 510, GLN 514, VAL528, ASP615 y ARG 619, corresponden a sitios activos de la proteína en *P. aeruginosa*, fueron descritos previamente en bacterias como *Erwinia amylovora*, *Salmonella*, *Yersinia pestis*, y *E. coli*.⁷³.

Nuestros hallazgos respecto de las mutaciones encontradas en la proteína *MarR* de las cepas de *P. aeruginosa* (GLU40) se corroboran con los reportes hechos previamente en cepas de *Enterobacter* spp. y *E. coli*⁷⁴, esta mutación en el auto represor *MarR* genera la sobreexpresión de *MarA* que es una proteína de unión al ADN y un activador transcripcional de múltiples regulones de resistencia a antibióticos y superóxido. Ya que las mutaciones en *MarR* causan que este no se logre unir al ADN objetivo, es decir al operón *MarRAB*, no se puede reprimir la expresión de *MarA*, ya que es el operón *MarRAB* quien lo codifica, entonces se genera una sobre expresión de *marA*, el cual regula positivamente las bombas de salida a múltiples fármacos AcrAB aumentando así la resistencia a los antibióticos en especial a fluoroquinolonas y carbapenémicos ^{79,80,81}.

Por medio del programa GOR IV se predijo la estructura secundaria de las proteínas deducidas de los genes, en el caso de la proteína de exportación EmrA presenta un dominio periplásmico formado por una gran hélice α , que comprende los residuos (88-210) intercalada por una estructura de hoja β en los extremos N y C en general. Lo anterior se confirma con el resultado obtenido en

el estudio anterior realizado en *E.coli* donde obtuvieron una composición similar, ya que la hélice α estaba compuesta por los residuos 96-213, también, intercalada por una estructura de hoja β en los extremos N y C.⁸² Por otro lado, la proteína represora de *MarR* en el presente estudio en *P. aeruginosa* se observó un dominio al ADN globular en los residuos (36-97) compuesto por hélice α , en comparación con resultados anteriores en *E. coli* donde los residuos (36-97) se encuentran en la unión al dominio globular de hélice α con una lisina, dicho pliegue abarca las hélices 3-4 formado un hélice - giro - hélice.⁷⁴

La estructura terciaria fue determinada por medio de la herramienta I-TASSER, los modelos obtenidos presentaron altos niveles de confianza por los puntajes de C-score obtenidos (-2.22, 1.11 y 0.07) y TM score (0.45, 0.87 y 0.72) para EmrA, ArnA y MarR respectivamente. El C-score es el valor de confianza de la predicción de la estructura, es decir, que evalúa la calidad del modelo, los puntajes normalmente oscilan entre -5 y 2 en donde entre más alto sea el puntaje mayor calidad y confianza tiene el modelo evaluado⁷⁷.

En cuanto al TM score, se afirma que debe ser >0.5 para que el modelo tenga una topología correcta y aquellos <0.17 significa que la similitud entre las estructuras es aleatoria. Los puntajes obtenidos para TM score de dos modelos están dentro del rango permitido, por lo que apoya el hecho de la buena calidad de las predicciones⁷⁷. Adicionalmente, en la validación de la estructura 3D por medio de ProSa-Web, según los puntajes obtenidos (-4,69, -12,22 y -4,0 para EmrA, ArnA y MarR respectivamente), se considera que los modelos tienen una buena calidad debido a que se encuentran dentro del rango de puntajes típicamente encontrados en proteínas nativas ya descritas en *Protein Database* (PDB) y que poseen un tamaño similar⁷⁸. Se encontró en el gráfico de energía de los residuos de la proteína deducida de *emrA* que existían fluctuaciones en la parte positiva de esta, que podrían corresponder a regiones que atraviesan la membrana, como también se presenta en la proteína transportadora ABC de multidrogas Sav1866 de *Staphylococcus aureus*⁷⁵.

Los resultados encontrados en este estudio, sirven de base fundamental para seguir en la búsqueda de alternativas terapéuticas contra la bacteria multidrogorresistente *P. aeruginosa*, ya que proporcionan información pertinente para continuar con el diseño racional de fármacos, por medio de la búsqueda de inhibidores de las proteínas codificadas por los genes de interés, con el uso de

metodologías computacionales como Docking Molecular que oriente posteriormente los ensayos de manera *in vitro*.

6. Conclusiones

Las secuencias analizadas presentan un alto porcentaje de identidad con respecto a la cepa de referencia (PAO1), sin embargo, tienen mutaciones, lo que podría justificar la resistencia presentada relacionada a los genes estudiados en la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, con excepción del gen MarR, que presenta mutaciones silenciosas, éstas cumplen la misma función, por lo que no se ve alterada.

Según el análisis de secuencias de los nucleótidos y proteínas, los genes estudiados no son conservados, ya que muestra un amplio rango de diferencia, basados en los porcentajes de identidad obtenidos en el alineamiento, entre *Pseudomonas aeruginosa* y los ortólogos estudiados en cada caso.

Finalmente, se evidencia la importancia de los estudios *in silico*, ya que basados en el análisis por medio de bases de datos y herramientas bioinformáticas, se puede predecir la estructura completa de una proteína con buena puntuación de confiabilidad, y de allí determinar los puntos clave, que podrían ser empleados como objetivos para la búsqueda de posibles compuestos inhibidores que permitan desarrollar nuevos medicamentos para contrarrestar o mitigar la resistencia bacteriana.

Referencias Bibliográficas

1. Mohammadi H, Bakhshi B, Daraei B, Fazeli H, Nasr B. Global Sequence Analysis and Expression of Azurin Gene in Different Clinical Specimens of Burn Patients with *Pseudomonas aeruginosa* Infection. *Infect Drug Resist* [online]. 2020 Jul 13; 13: 2261-2275. [Consulted 2020 Dec 16]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7367926/>
2. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos [internet]. Ginebra: Organización mundial de la salud; 2017 Feb 27. [Consultado 2020 Dec 16]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
3. Peña C, Cabot G, Gómez-Zorrilla S, Zamorano L, Ocampo-Sosa A, Murillas J et al. Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). Influence of virulence genotype and resistance profile in the mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Clin Infect Dis* [online] 2015 Feb 15;60(4):539-48. [Consulted 2020 Dec 16]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25378459/>
4. Sader, H., Castanheira, M., Duncan, L. et al. Antimicrobial Susceptibility of Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from United States Medical Centers Stratified by Infection Type: Results from the International Network for Optimal Resistance Monitoring (INFORM) Surveillance Program, 2015-2016. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, [online] 69–74. [Consulted 2020 Dec 17]. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.04.012>
5. Horcajada, J, Montero, M., Oliver, A., Sorlí, L., Luque, S., et al. Epidemiology and Treatment of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Clinical microbiology reviews*, [online] 2019 32(4), [Consulted 2020 Dec 16] Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6730496/>
6. Labarca J, Costa M, Seas C, Guzman M. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America. *Rev*

- Microbiol [online]. 2016; 42: 276-292. [Cited 2020 ago 5]. .Available in:
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/1040841X.2014.940494>.
7. Ding, C., Yang, Z., Wang, J., Liu, X., Cao, Y., Pan, Y., et al. Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* and antimicrobial-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in patients with pneumonia in mainland China: a systematic review and meta-analysis. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, [online]. 2016; 49, 119–128. [Consulted 2020 Dec 18]. Available in:
[https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712\(16\)31099-2/fulltext](https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712(16)31099-2/fulltext)
 8. Hurley JC. Worldwide variation in *Pseudomonas* associated ventilator associated pneumonia. A meta-regression. *J Crit Care*. [online]. 2019; 51: 88-93. [Consulted 2020 Dec 18]. Available in:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0883944118317866?via%3DiHub>
 9. Restrepo M, Babu B, Reyes L, Chalmers J, Soni N, et al. Burden and risk factors for *Pseudomonas aeruginosa* community-acquired pneumonia: a multinational point prevalence study of hospitalised patients. *Eur Respir J*. [online]. 2018 Aug 9; 52(2): 1701190. [Consulted 2020 Dec 18]. Available in:
<https://erj.ersjournals.com/content/52/2/1701190.long>
 10. Wongsurakiat P, Chitwarakorn N. Severe community-acquired pneumonia in general medical wards: outcomes and impact of initial antibiotic selection. *BMC Pulm Med*. [online]. 2019 Oct 16; 19(1): 179. [Consulted 2020 Dec 20]. Available in:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31619219/>
 11. Sopeña R, Medina J, Justo J et al. Healthcare-Associated Infections after Lower Urinary Tract Endoscopic Surgery: Analysis of Risk Factors, Associated Microorganisms and Patterns of Antibiotic Resistance. *Urol Int*. [online]. 2018; 100(4): 440-444. [Consulted 2020 Dec 20]. Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29649830/>
 12. Medina J., Sopeña R., Benítez R., Lara A., Alonso- M., et al. Prospective study analyzing risk factors and characteristics of healthcare-associated infections in a Urology ward. *Investigative and clinical urology*, [online]. 2017; 58(1), 61–69. [Consulted 2020 Dec 20]. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5240291/>
 13. Oliver, A., Mulet, X., López C, Juan C. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and*

- anticancer chemotherapy, [online]2015, 41–59.[Consulted 2020 Dec 20] Available in:<https://doi.org/10.1016/j.drug.2015.08.002>
14. Vega S, Dowzicky M, Antimicrobial susceptibility among Gram-positive and Gram-negative organisms collected from the Latin American region between 2004 and 2015 as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.*[online]. 2017 Jul 12;16(1):50.[Consulted 2021 April 28]. Available from:<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28701170/>
 15. Diekema D, Hsueh P, Mendes R, Pfaller M, Rolston K, Sader H et al. The Microbiology of Bloodstream Infection: 20-Year Trends from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother* [online]. 2019 Jul; 63(7): 355. [Consulted 2021 Apr 28]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6591610/>
 16. Shortridge D, Ptaller M, Streit J, Flamm D. Antimicrobial activity of ceftolozane/tazobactam tested against contemporary (2015-2017) *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a global surveillance programme. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* [online]. 2020; 21: 60- 64. [Consulted 2021 Apr 28]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31648032/>
 17. Saavedra S, Duarte C, González M, Realpe M. Characterization of isolates of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* from seven Colombian provinces.*Biomédica INS* [online]. 2014; 34:217-23. [Consulted 2021 Apr 28]. Available from: <https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/1685>
 18. Chavez M, Cabezas F, Ferauds M, Castillo J, Caicedo L. Antimicrobial resistance patterns and genotypic diversity between clinical and water systems isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Cali, Colombia. *Tropical Biomedicine* [online]. 2020; 37(3): 650–662. [Consulted 2021 Apr 28]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33612779/>
 19. García J, Appel M, Esparza G, Gales A, Levy-Hara G, Cornistein W, et al. Update on the epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. *Expert review of anti-infective therapy*, 2021; 19(2):197–213. [Consulted 2021 Apr 28]. Available from: <https://doi.org/10.1080/14787210.2020.1813023>
 20. Vanegas J, Cienfuegos A, Ocampo A, López L, Corral H, Roncancio G et al. Similar frequencies of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing KPC and VIM carbapenemases

in diverse genetic clones at tertiary-care hospitals in Medellín, Colombia. *J Clin Microbiol* [online]. 2014 Nov; 52(11): 3978-86. [Consulted 2021 Apr 28]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25210071/>

21. Ponce de Leon A, Merchant S, Raman G, Avendano E, Chan J, Hernandez, G et al Pseudomonas infections among hospitalized adults in Latin America: a systematic review and meta-analysis. *BMC infectious diseases*, [online] 2020;20(1),250. Available from: . [Consulted 2021 Jan 10]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7099820/>
22. Instituto Nacional de Salud (INS). Resultados del Programa de Vigilancia por Laboratorio de Resistencia Antimicrobiana en Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS) 2016. Disponible en: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informacin%20de%20laboratorio/Informe%20Vigilancia%20por%20Laboratorio%20Resistencia%20Antimicrobiana%20y%20Whonet%20IAAS%202016.pdf>
23. Fernández-Barat L, Ferrera M, De Rosa F, Gabarrús A, Esperatti M, Terraneo S et al. Intensive care unit-acquired pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa* with and without multidrug resistance. *Journal of infection* [online]. 2017; 74 (2): 142-152. [Consulted 2021 Jan 10]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0163445316302900>
24. Gill J, Arora S, Khanna S, Kumar H. Prevalence of Multidrug-resistant, Extensively Drug-resistant, and Pandrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from a Tertiary Level Intensive Care Unit. *J Glob Infect D* [online]. 2016; 8 (4): 155-159. [Consulted 2021 Jan 10]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5126754/>
25. Increasing Incidence of Multidrug Resistance Among Cystic Fibrosis Respiratory Bacterial Isolates. Cliff W, Burgess D, Burgess D. *Microbial drug resistance* [online]. 2017; 23 (1): 51-55. [Consulted 2021 Jan 10]. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/mdr.2016.0048>
26. Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. Pachori P, Gothwal R, Gandhi P. *Genes and diseases* [online]. 2019; 6 (2): 109-119. [Consulted 2021 Jan 10]. Available from: [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352304219300170\(16\)](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352304219300170(16))

27. Prevalence and Some Possible Mechanisms of Colistin Resistance Among Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. El-Baky R, Masoud S, Mohamed D, Waly N, Shafik E, Elkady A et al. *Infection and drug resistance* [online]. 2020; 13: 323-332. [Consulted 2021 Jan 10]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7006860/>
28. Emergence and Spread of Epidemic Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Miyoshi-Akiyama T, Tada T, Ohmagari N, Viet N, Tharavichitku P, Pokhrel B et al. *Genome biology and evolution* [online]. 2017; 9 (12): 3238-3245. [Consulted 2021 Jan 10]. Available from: <https://academic.oup.com/gbe/article/9/12/3238/4675324?login=true>
29. Multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Estonian hospitals. Laht M, Brauer A, Remm M, Kisand V, Maimets M, Tenson T et al. *BMC Infectious diseases* [online]. 2018; 18: 513. [Consulted 2021 Jan 10]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6182868/>
30. Ceftolozane-Tazobactam for the Treatment of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections: Clinical Effectiveness and Evolution of Resistance. Haidar G, Phillips N, Shields R, Snyder D, Cheng S, Potoski B et al. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2017; 65 (1): 110-120. [Consulted 2020 Jan 10]. Consulted from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5848332/>
31. Characterization of clinical extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the Hunan province of China. Dou Q, Hu Y, Wang H, Yan Q, Liu W. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* [online]. 2016; 15: 35. [Consulted 2021 Jan 10]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4877936/8>
32. Kos V, Déraspe M, MagLaughlin R, Whiteaker J, Roy P, Alm et al. The Resistome of *Pseudomonas aeruginosa* in Relationship to Phenotypic Susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2014; 59: 427–436. [Consulted 2021 Jan 10]. Available from: <https://aac.asm.org/content/59/1/427>
33. Murugan N, Malathi J, Umashankar V, Madhavan H. Unraveling genomic and phenotypic nature of multidrug-resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa* VRFPA04 isolated from keratitis patient. *Microbiological Research* [online]. 2016; 193: 140-144. [Consulted 2021 April 30]. Available

from:<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S094450131630249X?via%3Dihub#fig0020>

34. Jaillard M , Belkum A, Cady K. Correlation between phenotypic antibiotic susceptibility and the resistome in *Pseudomonas aeruginosa* . *Journal of Genetic Engineering . Clin Infect Dis* [online] 2020 Jun 15;60(4):539-48. [Consulted April 28]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857917301632>
35. Galetti R, Andrade L, Varani A, Darini A. SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST277 carries a chromosomal pack of acquired resistance genes: An example of high-risk clone associated with 'intrinsic resistome'. *J Glob Antimicrob Resist. Journal of Global Antimicrobial Resistance*. [online] 2019 March 16:183-186. [Consulted April 29 2021]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30586621/>
36. Madaha E, Mienie C, Gonsu HK, Bughe RN, Fonkoua MC, Mbacham WF, Alayande KA, Bezuidenhout CC, Ateba CN. Whole-genome sequence of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains UY1PSABAL and UY1PSABAL2 isolated from human broncho-alveolar lavage, Yaoundé, Cameroon. *PLoS One*. [online] 2020 Sep 4;15 [Consulted 2020 Dec 27]. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7473557/>
37. Sedighi M, Moghoofei M, Kouhsari E, Pournajaf A, Emadi B, Tohidfar M, Gholami M. In silico analysis and molecular modeling of RNA polymerase, sigma S (RpoS) protein in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Rep Biochem Mol Biol*. [online] 2015 Oct;4(1):32-42 [Consulted 2021 Jan 12]. Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26989748/>
38. Dash R, Hosen S, Sultana T, Junaid M, Majumder M, Ishaq IA, et al. Computational Analysis and Binding Site Identification of Type III Secretion System ATPase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Interdiscip Sci*. [online] 2016 Dec;8(4):403-411. [Consulted 2021 April 12]. Available in: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12539-015-0121-z#Bib1>
39. Pramanik K, Kumar P, Ray S, Sarkar A, Mitra S, Kanti T. An in silico structural, functional and phylogenetic analysis with three dimensional protein modeling of alkaline phosphatase enzyme of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* [online]. 2017; 15: 527-537. [Consulted 2021 April 12]. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1687157X17300288>

40. Burrows LL. The Therapeutic Pipeline for *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *ACS Infect Dis.*[online] 2018 Jul 13;4(7):1041-1047. [Consulted 2020 Dec 20]. Available in:<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfectis.8b00112>
41. So A, Yu X, Robbie G, et al. Phase 1 study of MEDI3902, an investigational anti-*Pseudomonas aeruginosa* PcrV and Psl bispecific human monoclonal antibody, in healthy adults. *Clin Microbiol Infect.* [online] 2019 May 29; 25:629.e1-629.e6. [Consulted 2021 April 27]. Available in: [clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(18\)30576-7/fulltext](http://clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(18)30576-7/fulltext)
42. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv.*[online] 2019 Jan-Feb;37(1):177-192. [Consulted 2020 Dec 20]. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975018301976?via%3Dihub>
43. Xu Z, Li Y, Yan A. Repurposing the Native Type I-F CRISPR-Cas System in *Pseudomonas aeruginosa* for Genome Editing. *STAR protocols* [online]. 2020; 1 (1). [Consulted 2021 Apr 1]. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666166720300265#!>
44. Alexandre L, Juliette S, Léna F. Combined Bacteriophage and Antibiotic Treatment Prevents *Pseudomonas aeruginosa* Infection of Wild Type and cfr- Epithelial Cells. *frontiers in Microbiology. Clin Infect Dis* [online] 2020 Agos 27. [Consulted 2020 Feb 05]. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.01947/full>
45. Broniewski J, Chisnall M, Høyland-Kroghsbo N, Buckling A, Westre E. The effect of Quorum sensing inhibitors on the evolution of CRISPRbased phage immunity in *Pseudomonas aeruginosa*. *The ISME Journal* [online]. 2021. [Consulted 2021 Apr 28]. Available in: <https://www.nature.com/articles/s41396-021-00946-6>
46. Dumont M, Luke C, Deng Y, Frezel P. Classification of pmoA amplicon pyrosequences using BLAST and the lowest common ancestor method in MEGAN. *Frontiers in microbiology* [online]. 2014 Feb; 5 (34). [Consulted 2021 Mar 11]. Available from: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00034>
47. Schmidt A, Forne I, Imhof A. Bioinformatic analysis of proteomics data. *BMC Systems Biology* [online]. 2014 Mar; 8 (2). [Consulted 2021 Mar 11]. Available from: <https://bmcsystbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1752-0509-8-S2-S3>

48. Pal A, Saha B, Saha, J. Comparative in silico analysis of ftsZ gene from different bacteria reveals the preference for core set of codons in coding sequence structuring and secondary structural elements determination. PloS One. [online] 2019 Dec;14(12)[Consulted 2020 Feb 28]. Available in: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219231>
49. Srivastava V, Kaushik S, Jyoti A. A comparative in silico analysis of Rab5 proteins from pathogenic species to find its role in the pathogenesis. J Mol Recognit. 2019 Dec;32(12) [Consulted 2020 Mar 8] Available in: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jmr.2808>
50. Kalpesh A, Sagar P, Hetalkumar P. DNA Sequence analysis by ORF FINDER & GENOMATIX Tool: Bioinformatics Analysis of some tree species of Leguminosae Family [online]. 2015 Mar;6.[Consulted 2021 Mar 9]. Available from: <https://sci-hub.se/10.1109/BIBMW.2012.6470265>
51. Panu A, Manohar J, Konstantin A, Delphine. B.ExPASy: SIB bioinformatics resource portal, Nucleic Acids Research [online].2012 July;1(40).[Consulted 2021 Mar 11]. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article/40/W1/W597/1073688?login=true>
52. Lima W, Gasteiger E, Marcatili P, Duek P, Bairoch A, Cosson P. The ABCD database: a repository for chemically defined antibodies. Nucleic acids research [online]. 2019 Aug; 48 (1): 261-264. [Consulted 2021 Mar 11]. Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz714>
53. Andrew B, Shapor N, Jie L.CASTp: Computed Atlas of Surface Topography of proteins. Nucleic Acids Research [online].2003 July;17(31).[Consulted 2021 Mar 10]. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article/31/13/3352/2904134?login=true>
54. Fernando P, Ana M, Lilian F. Pseudomonas aeruginosa-neumonía adquirida en la comunidad en un hombre previamente sano expuesto ocupacionalmente a fluidos metalúrgicos.[online].2003 Agos;17.[Consulted 2021 Mayo 20]. Available <https://www.revistas.usp.br/autopsy/article/view/98475>
55. Sara A, Ochoa F, Gerardo E. Pathogenic characteristics of Pseudomonas aeruginosa strains resistant to carbapenems associated with biofilm formation [online].2018 April;27.[Consulted 2021 Mayo 20]. Available

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-11462013000200010

56. Laura B, Resistencia antibiótica en *Pseudomonas* situación epidemiológica en España y alternativas de tratamiento.[online].2018 Feb;17.[Consulted 2021 Jun 20]. Available <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/LAURA%20BRAVO-BURGUILLOS%20ROS.pdf>
57. Dianny V, Betalactamasas tipo AmpC: Generalidades y métodos para detección fenotípica Research[online].2020 July; 20.[Consulted 2021 Agost 24]. Available http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562009000200003
58. Gonçalves IR, Cavalcanti RC, Ferreira ML, Fonseca DJ, Gontijo-Filho P P, Marques R. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: association with virulence genes and biofilm formation. nt. J. Med. Microbiol. [online]. 2017; 48. [Cited 2021 Jun 5]. Available in: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-83822017000200211&script=sci_arttext
59. Valderrama SS, González PF, Caro MA, Ardila N, Ariza B, Gil F, et al. Factores de riesgo para bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos adquirida en un hospital colombiano. Rev. Biomédica [Internet]. 2016; 36 [Consultado 2021 may 5]. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572016000500010
60. Breazeale S, Ribeiro A, McClerren A. A Formyltransferase Required for Polymyxin Resistance in *Escherichia coli* and the Modification of Lipid A with 4-Amino-4-deoxy-L-arabinose. J. Int. Soc. Burn Inj. [online]. 2016; 43 [Cited 2020 sep 5]. Available in: <https://www.jbc.org/content/280/14/14154.short>
61. Choudhury D, Paul D, Ghosh A, Talukdar A, Choudhury D, Maurya A, et al. Effect of single-dose carbapenem exposure on transcriptional expression of blaNDM-1 and mexA in *Pseudomonas aeruginosa*. J Glob Antimicrob Resist [online]. 2016; 7: 72-77 [Cited 2020 4 sep]. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S221371651630087X?via%3Dihub>
62. Sharma A, Sharma R, Bhattacharyya T. Fosfomicin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by efflux through a major facilitator superfamily (MFS)

- transporter—AbaF. *Journal of microbiology* [online]. 2016. [Cited 2020 oct 12]. Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27650185/>
63. Yousefian N, Ornik-Cha A, Poussard S, et al. Structural characterization of the EmrAB-TolC efflux complex from *E. coli*. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* [online]. 2021. [Cited 2021 sep 12]. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S000527362030331X?via%3Dihub>
64. Heacock-Kang Y, Sun Z, Zarzycki-Siek J, et al. Two Regulators, PA3898 and PA2100, Modulate the *Pseudomonas aeruginosa* Multidrug Resistance MexAB-OprM and EmrAB Efflux Pumps and Biofilm Formation. *Antimicrob Agents Chemother.* [online]. 2016. [Cited 2021 Aug 23]. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6256797/>
65. Gatzeva-Topalova P, May A, Sousa M. Crystal structure of *Escherichia coli* ArnA (PmrI) decarboxylase domain. A key enzyme for lipid A modification with 4-amino-4-deoxy-L-arabinose and polymyxin resistance. *Biochemistry* [online]. 2004 Oct 26; 43(42): 13370-9. [Cited 2021 Aug 23]. Available in: doi: 10.1021/bi048551f
66. Maristela Previato M, Diogo de Abreu M, Luis Eduardo S, et al. Global Transcriptional Response to Organic Hydroperoxide and the Role of OhrR in the Control of Virulence Traits in *Chromobacterium violaceum*. [online]. 2017. [Cited 2021 April 13]. Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28507067/>
67. Rhoda Nsen B, Marie Christine F, Wilfred Fon M. Whole-genome sequence of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains UY1PSABAL and UY1PSABAL2 isolated from human broncho-alveolar lavage, Yaoundé, Cameroon [online]. 2020. [Cited 2021 Jul 19]. Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32886694/>
68. Mutations that increase expression of the EmrAB-TolC efflux pump confer increased resistance to nitroxoline in *Escherichia coli*. Puértolas-Balint F, Warsi O, Linkevicius M, Tang P, Andersson D. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. 2020; 75 (2): 300–308. [Consulted 2022 Jan 02]. Available from: <https://doi.org/10.1093/jac/dkz434>
69. Gatzeva-Topalova PZ, May AP, Sousa MC. Structure and mechanism of ArnA: conformational change implies ordered dehydrogenase mechanism in key enzyme for polymyxin resistance. *Structure* [online]. 2005 Jun; 13(6): 929-42. [Cited 2021 Jul 19].

Available in: doi: 10.1016/j.str.2005.03.018. PMID: 15939024; PMCID: PMC2997725.

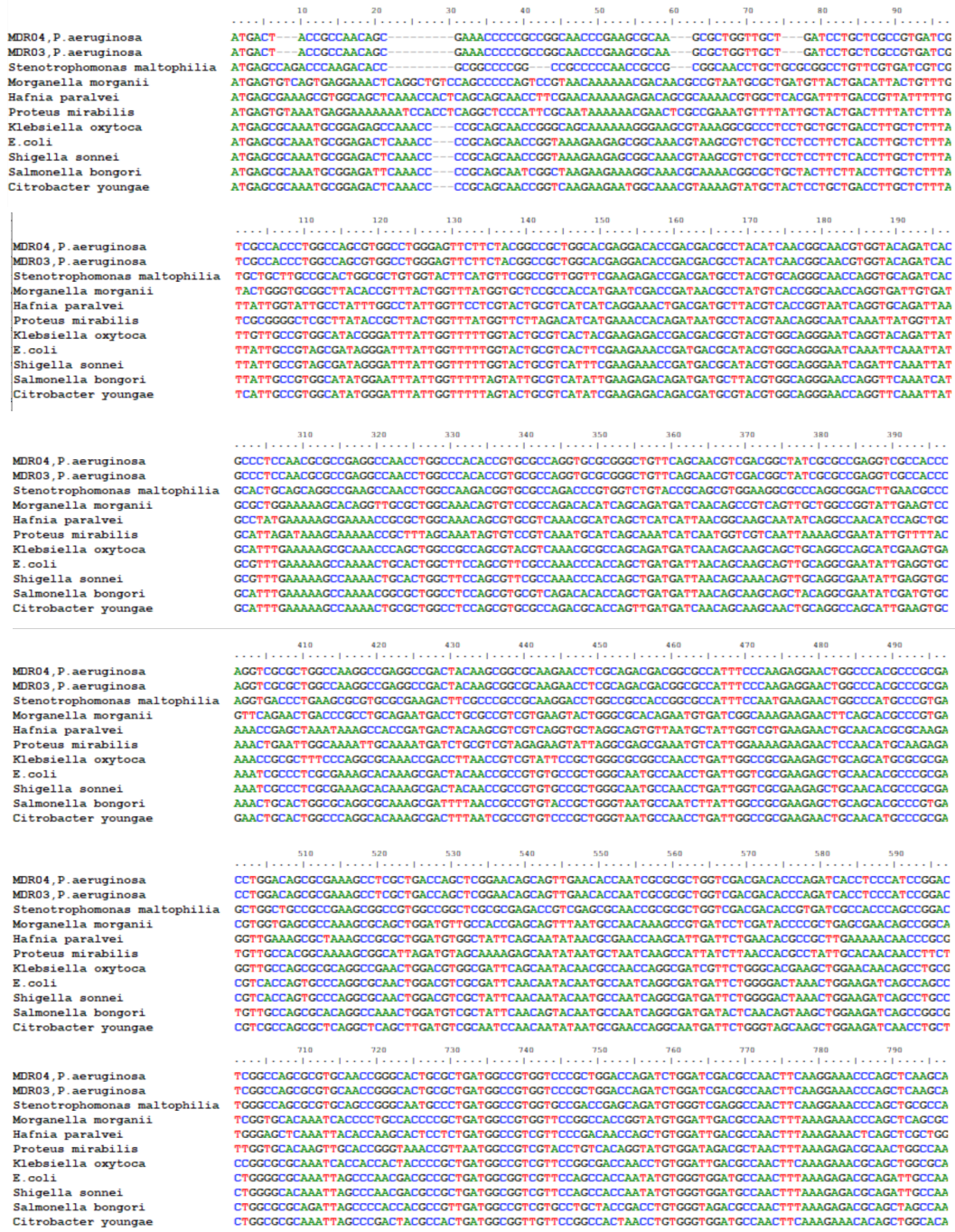
70. Yaron S, White D, Matthews K. Characterization of an *Escherichia coli* O157:H7 *marR* mutant. *International Journal of Food Microbiology* [online].2003;85(3):281-291. [Consulted 2022 Jan 02]. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00547-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00547-0)
71. Contributions of mutations in *acrR* and *marR* genes to organic solvent tolerance in *Escherichia coli*. Watanabe R, Doukyu N. *AMB Expr* [online]. 2012; 58. [Consulted 2022 Jan 02]. Available from: <https://doi.org/10.1186/2191-0855-2-58>
72. Masood K, Umar S, Hasan Z et al. Lipid A-Ara4N as an alternate pathway for (colistin) resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates in Pakistan. *BMC Res Notes* [online]. 2021; 449 (14). [Consulted 2022 Jan 02]. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13104-021-05867-3>
73. Sonwane K, Parulekar R, Malkar R, Nimbalkar P, Barage S, Jadhav D. Homology modeling and molecular docking studies of ArnA protein from *Erwinia amylovora*: role in polymyxin antibiotic resistance. *J. Plant Biochem. Biotechnol* [online]. 2015; 24: 225-232. [Consulted 2022 Jan 02]. Available from: <https://doi.org/10.1007/s13562-014-0293-3>
74. Warner D, Yang Q, Duvai V, Chen M, Xu Y, Levy S. Involvement of *MarR* and *YedS* in Carbapenem Resistance in a Clinical Isolate of *Escherichia coli* from China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2013; 57(4): 1935-1937. [Consulted 2022 Jan 02]. Available from:<https://doi.org/10.1128/AAC.02445-12>
75. Wiederstein M, Sippl MJ. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res* [online]. 2007 Jul; 35: 407-10. [Consulted 2022 Jan 02]. Available from: doi: 10.1093/nar/gkm290
76. Ligand-responsive transcriptional regulation by members of the *MarR* family of winged helix protein. Steven Wilkinson, Anne Grove.*Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online].2008;54–55. [Consulted 2022 Jan 03]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/7322964_Ligand-responsive_transcriptional_regulation_by_members_of_the_MarR_family_of_winged_helix_protein
77. Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang, Y. A Protocol for Computer-Based Protein Structure and Function Prediction.*J. Vis. Exp.*[online].2011;57. [Consulted 2021 Sep 02]. Available

from: <https://www.jove.com/es/t/3259/a-protocol-for-computer-based-protein-structure-function>

78. Wiederstein M, Manfred J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins, *Nucleic Acids Research* Cristian Ruiz, Stuart Levy. Many Chromosomal Genes Modulate MarA-Mediated Multidrug Resistance in *Escherichia coli* <https://doi.org/10.1093/nar/gkm290>
79. Annette Lin, Henry Gerken, LilyTan. Alcohol tolerance of *Escherichia coli* *acrR* and *marR* regulatory mutants ,[online].2012.[Consulted 2022 Feb 13]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S138117711002943>
80. Cristian Ruiz, Stuart Levy. Many Chromosomal Genes Modulate MarA-Mediated Multidrug Resistance in *Escherichia coli* ,[online].2010.[Consulted 2022 Feb 14]. Available from: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AAC.01420-09>
81. Lisa Alzrigat ,Douglas Huseby,Gerrit Brandis. Resistance/fitness trade-off is a barrier to the evolution of MarR inactivation mutants in *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. 2010; 76 (1). [Consulted 2022 Feb 4]. Available from: <https://academic.oup.com/jac/article/76/1/77/5934855?login=false>
82. Borges W,Beauchamp J,, Walmsley et al. Identification of Oligomerization and Drug-binding Domains of the Membrane Fusion Protein EmrA*,*Journal of Biological Chemistry*,[online]. 2003; 24. [Consulted 2021 Dic 13]. Available from:[https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021-9258\(19\)64662-4](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021-9258(19)64662-4)
83. Khademi F, Maarofi K, Arzanlou M, Peeri H, Sahebkar A. Which missense mutations associated with DNA gyrase and topoisomerase IV are involved in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates resistance to ciprofloxacin in Ardabil?. *Gene Reports* [online]. 2021; 24. [Consulted 2022 May 18]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2452014421001965?via%3Dihub>

Anexos

1. Alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas del gen *EmrA* con los organismos ortólogos *Stenotrophomonas maltophilia*, *Hafnia paralvei*, *Klebsiella oxytoca*, *E.coli*, *Shigella sonnei*, *Salmonella bongori*, *Citrobacter youngae*, *Proteus mirabilis* y *Morganella morganii*.



```

      810      820      830      840      850      860      870      880      890
MDR04, P. aeruginosa      CGCTATCGCCAGCCGGTGGAGATCCGCTCCGACCTCTACGGCAGCGACTGCCCTACAGCCGCAACCGTCCGACGCCCTGGCCCTGGGAACCGGCAGC
MDR03, P. aeruginosa      CGCTATCGCCAGCCGGTGGAGATCCGCTCCGACCTCTACGGCAGCGACTGCCCTACAGCCGCAACCGTCCGACGCCCTGGCCCTGGGAACCGGCAGC
Stenotrophomonas maltophilia      CGCCCTGGCCAGGAAAGTGGAGTGAAGTCCGACCTGTACGGCCTGACGCTGAAGTACAGGGCCGCAACCGACGCCCTGGCCCTGGCCAGCCGGTCC
Morganella morganii      CGCTATCGCCAGCCGGCCAAAGTGAATCACTGATTTCTACGGTGAACAAGTGGTCTTACCCGGTACCGTTCACCGGGTGGACATGGCCACCGGCTAGC
Hafnia paralvei          CGCTATTTGGCAACCGCCACCGTTATCAGTGAATGTACGGCGATGATGCTGTTTAAAGGCAAAAGTTGTCGGCTTAGACATGGGGACCGGCTAGT
Proteus mirabilis        CGCTATCGGACGCCCGGAAAATAACCACTGATTTTTATGGTAAAAAAGTTATTTACCAATGGTGGTACAGGGATAGATATGGGACAGGCAGT
Klebsiella oxytoca       CGCTATTTGGTACGCCCTCCACCGTGTACAGCGAATTTATGGTGAATGTGAAAATACACCGGTAAAGTGGTGGCTGTGATATGGGGACCGGGAGC
E. coli                   CGCTATCGGTACGCCGTCACTATCACCAACGGATTTTACGGCGATGATGTAAGTACACCGGTAAAGTGGTGGTGGTATGGGACAGGTAGC
Shigella sonnei          CGCTATCGGTACGCCGTCACTATCACCAACGGATTTTACGGCGATGATGTAAGTACACCGGTAAAGTGGTGGTGGTATGGGACAGGTAGC
Salmonella bongori       CGCCATTTGGCCAGCCGGTCAAGTATCACCGAATTTTATGGCGGACGCTCAAAATACACCGGTAAAGTGGTGGTGGTATGGGACAGGTAGC
Citrobacter youngae      CGCTATTTGGCCAAACCGCCACCGTTATCAGTGAATTTTACGGCGATGACGTAAGTACACCGGAAAGTGGTGGCCCTGGATATGGTACCGGCAGC

      910      920      930      940      950      960      970      980      990
MDR04, P. aeruginosa      TTCTCCCTGCTGCCGGCAGAAACGCCACCGCAACTGGATCAAGATCGTCCAGCGGGTGGCGGTGCCATCCATATCGATCCGCAAGAAATTCAGAA
MDR03, P. aeruginosa      TTCTCCCTGCTGCCGGCAGAAACGCCACCGCAACTGGATCAAGATCGTCCAGCGGGTGGCGGTGCCATCCATATCGATCCGCAAGAAATTCAGAA
Stenotrophomonas maltophilia      TTCTCCCTGCTGCCGGCAGAAACGCCACCGCAACTGGATCAAGATCGTCCAGCGGGTGGCGGTGCCATCCATATCGATCCGCAAGAAATTCAGAA
Morganella morganii      TTCTCCCTGCTGCCGGCAGAAACGCCACCGCAACTGGATCAAGATCGTCCAGCGGGTGGCGGTGCCATCCATATCGATCCGCAAGAAATTCAGAA
Hafnia paralvei          TTCTCCCTGCTGCCGGCAGAAACGCCACCGCAACTGGATCAAGATCGTCCAGCGGGTGGCGGTGCCATCCATATCGATCCGCAAGAAATTCAGAA
Proteus mirabilis        TTCTCCCTGCTGCCGGCAGAAACGCCACCGCAACTGGATCAAGATCGTCCAGCGGGTGGCGGTGCCATCCATATCGATCCGCAAGAAATTCAGAA
Klebsiella oxytoca       TTCTCCCTGCTGCCGGCAGAAACGCCACCGCAACTGGATCAAGATCGTCCAGCGGGTGGCGGTGCCATCCATATCGATCCGCAAGAAATTCAGAA
E. coli                   TTCTCCCTGCTGCCGGCAGAAACGCCACCGCAACTGGATCAAGATCGTCCAGCGGGTGGCGGTGCCATCCATATCGATCCGCAAGAAATTCAGAA
Shigella sonnei          TTCTCCCTGCTGCCGGCAGAAACGCCACCGCAACTGGATCAAGATCGTCCAGCGGGTGGCGGTGCCATCCATATCGATCCGCAAGAAATTCAGAA
Salmonella bongori       TTTTCCCTGTTCCGGCCAAAACGCCACCGGTAACCTGGATCAAAAGTGGTCCAGCGCTGCCGTGGTGGTGGTATCGAATCGGATGCCCGGAGTTCAGAC
Citrobacter youngae      TTCTCCCTGCTGCCGGCAGAAACGCCACCGGTAACCTGGATCAAAAGTGGTCCAGCGCTGCCGTGGTGGTGGTATCGAATCGGATGCCCGGAGTTCAGAC

      1010     1020     1030     1040     1050     1060     1070     1080     1090
MDR04, P. aeruginosa      ATCCGCTGGCATCGCCCTGTGATGGACGTCAAGGTGACCTGCACGACCAGAGCGGGCCGGCCCTGGCCAGCAGCCACCGGGGAAGCGCTGTT
MDR03, P. aeruginosa      ATCCGCTGGCATCGCCCTGTGATGGACGTCAAGGTGACCTGCACGACCAGAGCGGGCCGGCCCTGGCCAGCAGCCACCGGGGAAGCGCTGTT
Stenotrophomonas maltophilia      ACCCGCTGGCATCGCCCTGTGATGAAGCTGAAGTGAAGTGCACGCTGCACGACCAGAGGGCGAAGTGGTGGCAGACCTCCGGCCAAAGGCACCGTGT
Morganella morganii      ACCCGCTGGCATCGCCCTTTCCGGTGAATGTCAAGTGGACGACGACGAAATCTGACGGCCCGGCTGGTGGAAAGCGTGGCCACCGTCCCGGCTA
Hafnia paralvei          ATCCGCTGGCATCGCTTTGCTACGCTGGTACGGTGAATACCGCAATGCCGACGGTTTATGCTGGTAAACAACCTACCGAAAACCGCTGCATA
Proteus mirabilis        AACCGCTACGATCGCTTTACCACTGAAGTGAATGGATACCGTAACTTTGATGGAAAATATATCACAGAGCGAACCTCAAGCACCGGCTTA
Klebsiella oxytoca       ACCCGCTGGCATCGCCCTTTCCAGCCTGGTGAAGTGAATACCAACCGACCGCCGGCCGGCAGATGCTGGCAAGCAGGTACCTAGCCCTCCGGTTA
E. coli                   ATCCGCTGGCATCGCTTTCCAGCCTGGTGAAGTGAATACCACTAACCTGACGGTCAAGTACTGGCAAAATAAGTACCTTCCACTCCGGTAGC
Shigella sonnei          ACCCGCTGGCATCGCTTTCCAGCCTGGTGAAGTGAATACCACTAACCTGACGGTCAAGTACTGGCAAAATAAGTACCTTCCAAACCCGGTAGC
Salmonella bongori       ATCCGCTGGCATAGCTTTACCACTGGTGAAGTGAATACCGTAACTGCTAACCGCAGCGTCAAGTACTGGCAAGCAGGTACCAAGCAGCCAGTTC
Citrobacter youngae      ATCCACTGCGTATGCTTTCAACACTGGTTACGGTGAATACCGCTAACTGTCAGCGGCAGATCCTGGCAAGCAGGTCCCGCACCCAGCCAGTATC

      1110     1120     1130     1140     1150     1160     1170     1180     1190
MDR04, P. aeruginosa      CACCGATGCTACCAGCAGCAACTGGCCCTCGGCCGACAAGCTGATCGAACCCCTGATCGAAGCCAACTCGCCGAAGACCAACCGCAAGACCGCCACG
MDR03, P. aeruginosa      CACCGATGCTACCAGCAGCAACTGGCCCTCGGCCGACAAGCTGATCGAACCCCTGATCGAAGCCAACTCGCCGAAGACCAACCGCAAGACCGCCACG
Stenotrophomonas maltophilia      CACCGACGTGATGCCAAGCAGCTGCAATGATGCCAGCAGCTGATCCACAGATCATCCAGGGCAACTGCCGACGACAGCCAGCGAAGTGGGCTGA
Morganella morganii      TACCAGTGGCCTGAGCATGATATGCAACCGCGGATCAGATGATCCCTGAGATATCAGCCGCAATGCCGGTCACTAA
Hafnia paralvei          AAGTAATGCTCCTGACGTTGAACTTTGAAACCGTGAATCAGCTGATTCGGGATCATTGAGCTAACGCAAGCTAA
Proteus mirabilis        TACTAATGCACTCACTATGATATGTGAGAAATCAATCAATTAATGAAATCATTGAACAAAATGCAGGATGA
Klebsiella oxytoca       AAGCAATGCCCGTGAATCGGCCCTTGAGCCGCTCAATAAGCTGATAAAGCAGATCATCCAGGCCAAACGCCGGATAA
E. coli                   AAGCACCGCGGTGAATCAGCCCTGGCAGCTGTCAATAAAGCTGATGACGATATCTGTAAGGCTAACGCTGGCTAA
Shigella sonnei          AAGTACCGCGGTGAATCAGCCCTGGCAGCTGTCAATAAAGCTGATGACGATATCTGTAAGGCTAACGCTGGCTAA
Salmonella bongori       AAGTAAACCGCAGCGAAATTAATCTCGCCCGGTCAATAAAGCTGATGACGATATCTGTAAGGCTAACGCTGGCTAA
Citrobacter youngae      AAGTAAACCGCAGTGAATCAACCTTGAATCCGGTCAATAAGATGATCGAAGAGATCTGCAAGGCAACCGCGCTAA

      ...
MDR04, P. aeruginosa      TGA
MDR03, P. aeruginosa      TGA
Stenotrophomonas maltophilia      ---
Morganella morganii      ---
Hafnia paralvei          ---
Proteus mirabilis        ---
Klebsiella oxytoca       ---
E. coli                   ---
Shigella sonnei          ---
Salmonella bongori       ---
Citrobacter youngae      ---

```

2. Alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas del gen *ArnA* de cepas de *P. aeruginosa* MDR 03, MDR 04, *Escherichia coli*, *Citrobacter youngae*, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus mirabilis*, *Shigella sonnei*, *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella bongori*, *Enterobacter cloacae*, *Aeromonas hydrophila*, *Morganella morganii*.

```

      10      20      30      40      50      60      70
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
ArnA MDR3  ATGACCTCGAAAGCCGTCGTCTTGCCTACCACGACATCGGTTGCACCGGTATCGAAGCCCTGCTCAATG
ArnA MDR4  ATGACCTCGAAAGCCGTCGTCTTGCCTACCACGACATCGGTTGCACCGGTATCGAAGCCCTGCTCAATG
Escherichia coli str. K-12 sub  -----ATGAAAACCGTCGTCTTGCCTACCACGATATGGGATGCCCTGGTATTGAAGCCCTGCTGGCTG
Citrobacter youngae ATCC 29220 -----ATGAAAACCGTCGTCTTGCCTACCACGATATGGGATGCCCTGGTATTGAAGCCCTGCTGGATG
Yersinia enterocolitica strain -----ATGAAAACCGTCGTCTTGCCTACCACGATATGGCTGTGTGGCTGAAAGCCTCTTGTGAAG
Proteus mirabilis HI4320, comp -----ATGAAAACCGTCGTCTTGCCTACCACGATATGGCTGTGTGGCTGAAAGCCTCTTGTGAAG
Shigella sonnei strain ECH+12 -----ATGAAAACCGTCGTCTTGCCTACCACGATATGGATGCCCTGGTATTGAAGCCTCTGCTGGCTG
Klebsiella oxytoea 10-5243 str -----ATGAAAACCGTCGTCTTGCCTACCACGATATGGTGTGCGAGGATTCAGTCTCTGCTGGATG
Salmonella bongori strain 85-0 -----ATGAAAACCGTCGTCTTGCCTACCACGATATGGGATGCCAGGCGTCCAGGCGCTACTGGATG
Enterobacter cloacae strain GG -----ATGAAAACCGTCGTCTTGCCTACCACGATATGGGATGCCAGGCGTCCAGGCGCTACTGGATG
Aeromonas hydrophila strain On -----ATGAAAACCGTCGTCTTGCCTACCACGATATGGTGTGCGAGGATTCAGGCGCTCTCGAAG
Morganella morganii strain szy -----ATGAAAACCGTCGTCTTGCCTACCACGATATGGTGTGCGGATTCAGGCGCTGAAAAAAG

```

```

      110     120     130     140     150     160     170
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
ArnA MDR3  ATGCCGACGCCACGGGAAACACCTTCTACGCCCTGGTCGACGCCCTCTGCCGAGCCGGCATTCC
ArnA MDR4  ATGCCGACGCCACGGGAAACACCTTCTACGCCCTGGTCGACGCCCTCTGCCGAGCCGGCATTCC
Escherichia coli str. K-12 sub  ATACTGACTCACCAATGAGAATCGCTTTTCTCTCTGTAGCCAGAGTGGCTCGGATTTAGATTGACC
Citrobacter youngae ATCC 29220  ATACTGACTCACCAATGAGAATCGCTTTTCTCTCTGTAGCCAGAGTGGCTCGGATTTAGATTGACC
Yersinia enterocolitica strain  ATACTGACTCACCAATGAGAATCGCTTTTCTCTCTGTAGCCAGAGTGGCTCGGATTTAGATTGACC
Proteus mirabilis HI4320, comp  ATACTGACTCACCAATGAGAATCGCTTTTCTCTCTGTAGCCAGAGTGGCTCGGATTTAGATTGACC
Shigella sonnei strain ECH+12  ATACTGACTCACCAATGAGAATCGCTTTTCTCTCTGTAGCCAGAGTGGCTCGGATTTAGATTGACC
Klebsiella oxytoea 10-5243 str  ATACTGACTCACCAATGAGAATCGCTTTTCTCTCTGTAGCCAGAGTGGCTCGGATTTAGATTGACC
Salmonella bongori strain 85-0  ATACTGACTCACCAATGAGAATCGCTTTTCTCTCTGTAGCCAGAGTGGCTCGGATTTAGATTGACC
Enterobacter cloacae strain GG  ATACTGACTCACCAATGAGAATCGCTTTTCTCTCTGTAGCCAGAGTGGCTCGGATTTAGATTGACC
Aeromonas hydrophila strain On  ATACTGACTCACCAATGAGAATCGCTTTTCTCTCTGTAGCCAGAGTGGCTCGGATTTAGATTGACC
Morganella morganii strain szy  ATACTGACTCACCAATGAGAATCGCTTTTCTCTCTGTAGCCAGAGTGGCTCGGATTTAGATTGACC

```

```

      210     220     230     240     250     260     270
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
ArnA MDR3  GCTGTGGCTGAGCGCATCCGCCAATCGCCCGGACTCTCTGTTCTCTTCTACTACCGCCGCTGCTC
ArnA MDR4  GCTGTGGCTGAGCGCATCCGCCAATCGCCCGGACTCTCTGTTCTCTTCTACTACCGCCGCTGCTC
Escherichia coli str. K-12 sub  GCTGTGGCTGAGCGCATCCGCCAATCGCCCGGACTCTCTGTTCTCTTCTACTACCGCCGCTGCTC
Citrobacter youngae ATCC 29220  GCTGTGGCTGAGCGCATCCGCCAATCGCCCGGACTCTCTGTTCTCTTCTACTACCGCCGCTGCTC
Yersinia enterocolitica strain  GCTGTGGCTGAGCGCATCCGCCAATCGCCCGGACTCTCTGTTCTCTTCTACTACCGCCGCTGCTC
Proteus mirabilis HI4320, comp  GCTGTGGCTGAGCGCATCCGCCAATCGCCCGGACTCTCTGTTCTCTTCTACTACCGCCGCTGCTC
Shigella sonnei strain ECH+12  GCTGTGGCTGAGCGCATCCGCCAATCGCCCGGACTCTCTGTTCTCTTCTACTACCGCCGCTGCTC
Klebsiella oxytoea 10-5243 str  GCTGTGGCTGAGCGCATCCGCCAATCGCCCGGACTCTCTGTTCTCTTCTACTACCGCCGCTGCTC
Salmonella bongori strain 85-0  GCTGTGGCTGAGCGCATCCGCCAATCGCCCGGACTCTCTGTTCTCTTCTACTACCGCCGCTGCTC
Enterobacter cloacae strain GG  GCTGTGGCTGAGCGCATCCGCCAATCGCCCGGACTCTCTGTTCTCTTCTACTACCGCCGCTGCTC
Aeromonas hydrophila strain On  GCTGTGGCTGAGCGCATCCGCCAATCGCCCGGACTCTCTGTTCTCTTCTACTACCGCCGCTGCTC
Morganella morganii strain szy  GCTGTGGCTGAGCGCATCCGCCAATCGCCCGGACTCTCTGTTCTCTTCTACTACCGCCGCTGCTC

```

```

      310     320     330     340     350     360     370
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
ArnA MDR3  GGCGCTACAACTGCAAGTTGCTGCTGCCGGCTACCGGGAGCGGCCCGGGAATGGGTGCTGG
ArnA MDR4  GGCGCTACAACTGCAAGTTGCTGCTGCCGGCTACCGGGAGCGGCCCGGGAATGGGTGCTGG
Escherichia coli str. K-12 sub  TTTAATCTGCATGGTTGCTGTACCAAAATATCGTGGTCCGCGCCGCTGAACTGGGTGCTGGTCAACG
Citrobacter youngae ATCC 29220  TTTAATCTGCATGGTTGCTGTACCAAAATATCGTGGTCCGCGCCGCTGAACTGGGTGCTGGTCAACG
Yersinia enterocolitica strain  TTTAATCTGCATGGTTGCTGTACCAAAATATCGTGGTCCGCGCCGCTGAACTGGGTGCTGGTCAACG
Proteus mirabilis HI4320, comp  TTTAATCTGCATGGTTGCTGTACCAAAATATCGTGGTCCGCGCCGCTGAACTGGGTGCTGGTCAACG
Shigella sonnei strain ECH+12  TTTAATCTGCATGGTTGCTGTACCAAAATATCGTGGTCCGCGCCGCTGAACTGGGTGCTGGTCAACG
Klebsiella oxytoea 10-5243 str  TTTAATCTGCATGGTTGCTGTACCAAAATATCGTGGTCCGCGCCGCTGAACTGGGTGCTGGTCAACG
Salmonella bongori strain 85-0  TTTAATCTGCATGGTTGCTGTACCAAAATATCGTGGTCCGCGCCGCTGAACTGGGTGCTGGTCAACG
Enterobacter cloacae strain GG  TTTAATCTGCATGGTTGCTGTACCAAAATATCGTGGTCCGCGCCGCTGAACTGGGTGCTGGTCAACG
Aeromonas hydrophila strain On  TTTAATCTGCATGGTTGCTGTACCAAAATATCGTGGTCCGCGCCGCTGAACTGGGTGCTGGTCAACG
Morganella morganii strain szy  TTTAATCTGCATGGTTGCTGTACCAAAATATCGTGGTCCGCGCCGCTGAACTGGGTGCTGGTCAACG

```

```

      410     420     430     440     450     460     470
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
ArnA MDR3  TGCAATCGCATGATCGAGCGCGCGGACGCGGGCCGATCTCGCCAGCAGGCCGTCGCCATCGACCCCGA
ArnA MDR4  TGCAATCGCATGATCGAGCGCGCGGACGCGGGCCGATCTCGCCAGCAGGCCGTCGCCATCGACCCCGA
Escherichia coli str. K-12 sub  GAATGGTGAACCGTCCGATGCCGGGGCCATTTGGCCCACTCGCCATTTGCCATTCGCCAGACGATAT
Citrobacter youngae ATCC 29220  GAATGGTGAACCGTCCGATGCCGGGGCCATTTGGCCCACTCGCCATTTGCCATTCGCCAGACGATAT
Yersinia enterocolitica strain  AGATGGTGAACCGTCCGATGCCGGGGCCATTTGGCCCACTCGCCATTTGCCATTCGCCAGACGATAT
Proteus mirabilis HI4320, comp  AAATGACGGCTAAAGCAGATGCTGGTGAATCGTTGCCAAGAAAAGTAAAGATTGAAGATCTGATAC
Shigella sonnei strain ECH+12  GAATGGTGAACCGTCCGATGCCGGGGCCATTTGGCCCACTCGCCATTTGCCATTCGCCAGACGATAT
Klebsiella oxytoea 10-5243 str  GAATGGTGAACCGTCCGATGCCGGGGCCATTTGGCCCACTCGCCATTTGCCATTCGCCAGACGATAT
Salmonella bongori strain 85-0  GAATGGTGAACCGTCCGATGCCGGGGCCATTTGGCCCACTCGCCATTTGCCATTCGCCAGACGATAT
Enterobacter cloacae strain GG  GAATGGTGAACCGTCCGATGCCGGGGCCATTTGGCCCACTCGCCATTTGCCATTCGCCAGACGATAT
Aeromonas hydrophila strain On  GAATGGTGAACCGTCCGATGCCGGGGCCATTTGGCCCACTCGCCATTTGCCATTCGCCAGACGATAT
Morganella morganii strain szy  AAATGGTGAACCGTCCGATGCCGGGGCCATTTGGCCCACTCGCCATTTGCCATTCGCCAGACGATAT

```

510 520 530 540 550 560 57

ArnA MDR3
 ArnA MDR4
 Escherichia coli str. K-12 sub
 Citrobacter youngae ATCC 29220
 Yersinia enterocolitica strain
 Proteus mirabilis HI4320, comp
 Shigella sonnei strain ECH+12
 Klebsiella oxytoca 10-5243 str
 Salmonella bongori strain 85-0
 Enterobacter cloacae strain GG
 Aeromonas hydrophila strain On
 Morganella morganii strain szy

GGCCAGGGCCGCGCGCCCTGCTGCGGACAGCCTGCCGCTGCTCGCCCTCGGCGTGTGCCGGAAGTC
 GGCCAGGGCCGCGCGCCCTGCTGCGGACAGCCTGCCGCTGCTCGCCCTCGGCGTGTGCCGGAAGTC
 TCCCGCGCCAGCTACTGGAACAGACATTAACCGCCATTAACACGGTAAATTTCTGGAAATCGCCAG
 GGACGCGCTCAGCTGCTGGAACAGGCGCTGCCCGCATTAACACGGTAAATTTCTGGAAATCGCCAG
 TCTGCCAATGAATGCTGCGTGAATTTGTTGCCAAAAATGAAAAATGCGTCATTGCCACTGGTGCCCAA
 AGCTGCGGCGAAATTAATGGCTCATAGCTTACCGCATATCGCCCTCAGGTAACATATTCAACAACAGCGCAA
 TCCCGCGCCAGCTACTGGAACAGACATTAACCGCCATTAACACGGTAAATTTCTGGAAATCGCCAG
 TCCCGCTCGGACCTGCTGCTCAGGCGCTGCCCGCATCGCGATGCGAAAAATCGAAGAGCGCGCAG
 GGCCCGCCCGCAGATGCTTGCATTTTCCAGCCATGAAATGCGGTGATATATCTCCGTTCCCGCAG
 GGTGGCACAAAGCTGCTGCGATGCCCCGCCAACCTCTGAACGGACCTTCAGCGAAGACCGCTCAG
 CGCCCGCCGGCGCTGCTGGAGCAGGAGCTGCCAAGCTGCGCGCGCGGACATCCGCTCACCOCGCGAG
 AGCCCGAGAACACTGCTGAACAAAACTTACCCTGATTGAGGCGGTACTTATAAAACACCGCTCAG

510 520 530 540 550 560 57

ArnA MDR3
 ArnA MDR4
 Escherichia coli str. K-12 sub
 Citrobacter youngae ATCC 29220
 Yersinia enterocolitica strain
 Proteus mirabilis HI4320, comp
 Shigella sonnei strain ECH+12
 Klebsiella oxytoca 10-5243 str
 Salmonella bongori strain 85-0
 Enterobacter cloacae strain GG
 Aeromonas hydrophila strain On
 Morganella morganii strain szy

GGCCCGCACCCCGCGGACCGCCCTGCTGACTGGCACAGCCCGCACGGCACTTGTACGACCTGGTGC
 GGCCCGCGCACCCCGCGGACCGCCCTGCTGACTGGCACAGCCCGCACGGCACTTGTACGACCTGGTGC
 AGAACCGCGGATGACAGTTTCTTGAATGGCATAAACCGGCATCCGTAAGTGCACAACATGGTACGTGCCG
 CGCACCGGGAGGATAGCTTCTGACTGGAAACAAACCGGGCAGAACTGCATAACAGGTCCGGCGCG
 CGTACCGCAGATGATGGTGCATTTGACTGGAAATCAGCATCAGCAATCAATAATCTGGTCCGCGCTG
 CGTTGCTGATGACGCTTAAATGACTGGAAATCAGCATGCTAAAAAGGTTTATAATTTAGTTCCGCGCG
 AGAACCGCGGATGACAGTTTCTTGAATGGCATAAACCGGCATCCGTAAGTGCACAACATGGTACGTGCCG
 CGCACCGGGAGGATAGCTTCTGACTGGAAACAAACCGGGCAGAACTGCATAACAGGTCCGGCGCG
 CGCAGCCCGAAGACGCTGCTGACTGGAAACAAACCGGTTTCCACGGCGCATAACTGGTGGCTGGCG
 CGCACCGGAGACGCGCTGCTGACTGGAAACAAACCGCCCGCCAGCTGCACAACCTGGTCCGCGCG
 CGCACCCCGCGGATGGCGAATTTGACTGGCACCGCCCGCCCGGAACTGCACAACCTGGTCCGCGCG
 CGTTGTGCGGAAGATGGCTGATGACTGGAAATCAGCCGGCTGCACAGATCCACAACCTGGTCCGCTGGG

710 720 730 740 750 760 77

ArnA MDR3
 ArnA MDR4
 Escherichia coli str. K-12 sub
 Citrobacter youngae ATCC 29220
 Yersinia enterocolitica strain
 Proteus mirabilis HI4320, comp
 Shigella sonnei strain ECH+12
 Klebsiella oxytoca 10-5243 str
 Salmonella bongori strain 85-0
 Enterobacter cloacae strain GG
 Aeromonas hydrophila strain On
 Morganella morganii strain szy

TCTGCCAGGTCCGGCAACAGAAAGCTGATCGTCTGGAGCGCGAGGTGGTCCCGGCAACCCAGGTCCCGA
 TCTGCCAGGTCCGGCAACAGAAAGCTGATCGTCTGGAGCGCGAGGTGGTCCCGGCAACCCAGGTCCCGA
 ATGTTGGCAATCAGAAATTAACCGCTGGTCTGCGGTGTTCACTCTCATGCCAGCAAGCACAGCGCGG
 ATGTTGGCAATCAGAAATTAACCGCTGGTCTGCGGTGTTCACTCTCATGCCAGCAAGCACAGCGCGG
 ATGCGCGCGCAACAAATTTACTGCTGGAAATCCCGGTACGTGACGATCTACCCGCGCCAAAGCGGG
 ATAGCGGCTCACAGAAATTTACTACTGCTGGTCTCCCGTATATGTCGGATGCTCCGCGCGCTTCCCG
 TTCCCGCGCTCAGCAAAATTAATCGTCTGGAAATCCCGGTGCGCGATGATGTCGCGCGCGCAACCGGG
 TCCCGCGCTCAGCAAGCTGACGCTGGAAGATGCACTGCTGCCAGCAGAGCGCAAGCTCCCGGG
 TCTTGGTGAOCGCAAAATGATCATCTGGCGCACCGCGCTGCTGCCGATAACAAAGCAACACTCCGG

810 820 830 840 850 860 87

ArnA MDR3
 ArnA MDR4
 Escherichia coli str. K-12 sub
 Citrobacter youngae ATCC 29220
 Yersinia enterocolitica strain
 Proteus mirabilis HI4320, comp
 Shigella sonnei strain ECH+12
 Klebsiella oxytoca 10-5243 str
 Salmonella bongori strain 85-0
 Enterobacter cloacae strain GG
 Aeromonas hydrophila strain On
 Morganella morganii strain szy

GGGATCGCTGCGGCGAGGACTGCTGGTGTGCGCTTCCGCGAGCGCGCGAGCGCGGCTGTACTG
 GCGGATCGCTGCGGCGAGGACTGCTGGTGTGCGCTTCCGCGAGCGCGCGAGCGCGGCTGTACTG
 TGCTGTGGCGATGGCGGCTGGAAATCGTACCAGGACAGCGGGCGACGGCATTACTATGACGGGCTCG
 CGCTGCACTGATGGCGGCTGGAGATTAACCGGACAGCTGGCGATGATATTGCCATGACGGGCTCA
 TGCAATGCTGACGCTGCGCTGGAAATTAACAGGCAAGCGAGGAGGGCTATATGTTCAAAGGAGC
 CGCATGTGCGAAAGGTGCAATGGAATTAACAGGCTCAAAGTGAATAATGGTCTTTATGTTCAAAGGAGC
 TGCTGTGGCGATGGCGGCTGGAAATCGTACCAGGACAGCGGGCGAGCGGATTAATGCAAGGCTCG
 CGCTGTGAGGAAGGGCATTAAGAAATCGTACCAGGACAGCGGGCGAGGAGGGCTATATGTTCAAAGGAGC
 AGCTGCGCGGATGGCGGCTGGAGATTAACCGGCTCAGGCGGAGATGGCATTACGGTACAGGGTTCC
 CAGCTGCGCGGACAGCGGCTGGAGATCGTACCAGGCTCAGACGCAACCGGCTTATGTTCAAAGGAGC
 CGCTGCGGTGAAAGGGTCTGGAGATCGTGGCGGCTCAGGCGAAGGCGGACTATGTTGCGCGCGCGC
 TCCCTGCGAAACGGCGCTGGAAGTATCAGCGGACAGGGGAAATCCGGCTGTATGTCAGGGTGC

910 920 930 940 950 960 97

ArnA MDR3
 ArnA MDR4
 Escherichia coli str. K-12 sub
 Citrobacter youngae ATCC 29220
 Yersinia enterocolitica strain
 Proteus mirabilis HI4320, comp
 Shigella sonnei strain ECH+12
 Klebsiella oxytoca 10-5243 str
 Salmonella bongori strain 85-0
 Enterobacter cloacae strain GG
 Aeromonas hydrophila strain On
 Morganella morganii strain szy

CTGGTCCAGGGCGCGCGCTGCTGGCGCGCGTCCGGCCCGCAGCGCGGACGCGGGTGTGATCTCTCG
 CTGGTCCAGGGCGCGCGCTGCTGGCGCGCGTCCGGCCCGCAGCGCGGACGCGGGTGTGATCTCTCG
 GGTTCACGCTTGAATAGCCAGCTGCTGCACCGCCGACGCGCTACCCGGTACTCATCTCGGGGTGA
 GGTTCGCTGACAGCGGCTGAGTACCACAGCAAAACCGGCTACTCGCTGCTGATCTCGCGCTCA
 GGTATCGCTAGGCAATAAAGCAAGTAAAAATTAAGAAAGCAGAACCGGCTATTAATCTGGCGTAA
 GATGACCGGTTGACCAAAAGCAACAGCAAGTGAAGCTGTCACAGTGTACTGATTTAGGTTGTA
 GGTTCACGCTTGAATAGCCAGCTGCTGCACCCCGCAGCGCTACCCGGTACTCATCTCGGGTAA
 GGAGCGGTGCTGAGCAGCAAAACCGTCTGGCGATTAAGCGCGTACCCCGTGTGATCTCGGGTGA
 GGCGCGGTTAAACCGTCCGTGAGAGCTGGCACTAAACGTGCAATTCGGGTTCTCATCTCGCGGTA
 GGCGCGTGTGATCACCAGCCCGGCTGGTGGCAATTAAGCGCGCAGCCCGGCTGATCTCGCGGTA
 GGAGTGAAGATCGGCGCAAGCGGCAATGCCCTGCGCAAGCGCGGCTGACCCGGTGTGATCTCTCG
 GATGTCGCGGTCCGCGCAAGCGACTGCGCAGGTTGCCCGCGTAAAGCTGTGCTGATCTGGGTGTA

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070
|
 ArnA MDR3 CCGAACCCCTGCTGCCGACGGGCGCTACGAGGTCACGGCATGGACATCGGCTCCGACGCCATCGAACG
 ArnA MDR4 CCGAACCCCTGCTGCCGACGGGCGCTACGAGGTCACGGCATGGACATCGGCTCCGACGCCATCGAACG
 Escherichia coli str. K-12 sub GCCTGCTGCCGGAAGATCAATTAAGATTTACGGTCTGGATATTTGGCAGCGATGCGATAAGCCGTTTTCT
 Citrobacter youngae ATCC 29220 GGCTGCTGCAAGAAGATAATTAAGATTTACGGTCTGGATATTTGGCAGCGATGCCATCGGACGTTTCT
 Yersinia enterocolitica strain GTTTGTTACCGGATAATCGCTAAGATTTAGGTTAGATATTTGGTCTGATGCCATCTGCCGTTTTCT
 Proteus mirabilis HI4320, comp GTTTATTAAGATGGTAACATGATATCTACGGTATGGATATCGGTTTCATCAGCAATGAACGCTTTAT
 Shigella sonnei strain ECH+12 GCCTGCTGCCGGAAGATCAATTAAGATTTACGGTCTGGATATTTGGCAGCGATGCGATAAGCCGTTTTCT
 Klebsiella oxytoca 10-5243 str GTCTGCTCCAGGACGCAACTACGAGATTTACGGTCTGGACATTTGGCTCAGACCCATCAGCCGCTTCTCT
 Salmonella bongori strain 85-0 GGCTGTTAAATGAAGAGAAATACGAGGTTTACGGTATGGATATCGGCAATACCGGATTTGGCAGATTTCT
 Enterobacter cloacae strain GG GTCTGCTGAAAGACGATAACTACGAAATTTAGGCTCGACATTTGGCTCCGATGCCATCAGCCGTTTTCT
 Aeromonas hydrophila strain On CCGAGCCCTGCTCCAGGATGGCGGCTACGAGGTTATGGCTCGACATCGGCTCCAGCCGGTGGACCG
 Morganella morganii strain szy GTCTGCTGGAAGACGGCAACTACGATATCTATGGTATGGATATCAGCTCTTCCGCGATTTGATCGTTTCAT

1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170
|
 ArnA MDR3 CGAAGCCGACATCGGCATCCATTCGAGTGGCTCGAATACCATGTGAAGAAATCGACGTGGTCTGCCG
 ArnA MDR4 CGAAGCCGACATCGGCATCCATTCGAGTGGCTCGAATACCATGTGAAGAAATCGACGTGGTCTGCCG
 Escherichia coli str. K-12 sub CGATATCAGTATTCATTCCGAAATGGATGGATATCATGTCAAAAATGTGATGTCCTTCCGCGTGGTG
 Citrobacter youngae ATCC 29220 CGACATCAGTATTCATTCCGAAATGGATGGATATCATGTCAAAAATGTGATGTCCTTCCGCGTGGTG
 Yersinia enterocolitica strain GGACATCAGTATTCATTCCGAAATGGATGGATATCACATCAAGAAATGTGATGTCCTTCCGCGTGGTG
 Proteus mirabilis HI4320, comp TGATGTCAGCATTCATACAGAAATGGATGGATATCACATCAAGAAATGTGATGTCCTTCCGCGTGGTG
 Shigella sonnei strain ECH+12 CGATATCAGTATTCATTCCGAAATGGATGGATATCACATCAAGAAATGTGATGTCCTTCCGCGTGGTG
 Klebsiella oxytoca 10-5243 str CGATATCAGCATCCACTCCGAAATGGATGGATATCATGTCAAAAATGTGATGTCCTTCCGCGTGGTG
 Salmonella bongori strain 85-0 GGATATCAGCATCCACTCCGAGTGGATGGATACCAATCAAAAATGTGATGTCCTTCCGCGTGGTG
 Enterobacter cloacae strain GG GGAAGGGGACATCAGCATCCACACCGAGTGGATCGAGTATCACAATCAAGAAATGTGATGTCCTTCCGCG
 Aeromonas hydrophila strain On CGATGTCAGCATTCACACCGAGTGGATGGATATCACATCAAAAATGTGATGTCCTTCCGCGTGGTG
 Morganella morganii strain szy

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270
|
 ArnA MDR3 ACCCGCAACCCGCTGCCGCTGTTGAACTGGACTTCGAGGAAAACCTGCCGATCGTCCGCTACTGCGTGA
 ArnA MDR4 ACCCGCAACCCGCTGCCGCTGTTGAACTGGACTTCGAGGAAAACCTGCCGATCGTCCGCTACTGCGTGA
 Escherichia coli str. K-12 sub AACCCGCTGCCGCTGTTGAACTGGACTTCGAGGAAAACCTGCCGATTCGCGCTACTGCGTGAAGTACC
 Citrobacter youngae ATCC 29220 AACCCACTGCCGCTGTTGAGCTCGATTTTGAAGAGAACCTGAAATCATTGCTACTGCGTGAAGTACC
 Yersinia enterocolitica strain AATCCACTGCCGCTGTTGAAATGGATTTTGAAGAAAACCTAAAAATGTTCTGATTTGTTAAATACA
 Proteus mirabilis HI4320, comp AATCCATTACGTGATTTGAAATAGATTTTGAAGAGAACCTAAAAATGTTCTGATTTGTTAAATACA
 Shigella sonnei strain ECH+12 AACCCGCTGCCGCTGTTGAACTGGATTTTGAAGAGAACCTGCCGATTCGCGCTACTGCGTGAAGTACC
 Klebsiella oxytoca 10-5243 str AACCCGCTGCCGCTGTTGAGCTGGATTTTGAAGAGAACCTGAAAGTATCCGCGACTGCGTGAAGTACC
 Salmonella bongori strain 85-0 AACCCGCTGCCGCTGTTGAACTGGATTTTGAAGAGAACCTGCCGATTCGCGTACTGCGTGAAGTACC
 Enterobacter cloacae strain GG AACCCGCTGCCGCTGTTGAGCTGGACTTCGAGGAAAACCTGAAAGTATCCGCGACTGCGTGAAGTACC
 Aeromonas hydrophila strain On ACCCGCAACCCGCTGCCGCTGTTGAGCTGGACTTCGAGGAAAACCTCAAGATCGTCCGCTACTGCGTGA
 Morganella morganii strain szy AACCCGCTGCCGCTGTTGAGCTGGACTTCGAGGAAAACCTGAAAATGTTCCGTTACTGCGCGAAAATACA

1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370
|
 ArnA MDR3 CCTCCGAGGCTACCGCATGTGCCAGGACCCGGACTTCGACGAAGACCCCTCGAATCTGGTGGTCCGGCC
 ArnA MDR4 CCTCCGAGGCTACCGCATGTGCCAGGACCCGGACTTCGACGAAGACCCCTCGAATCTGGTGGTCCGGCC
 Escherichia coli str. K-12 sub AAGTTTATGGGATGTGTAGCGATAAATACCTCGATGAGGACCAATTCATATTTAATCGTCCGCGCGGTGAA
 Citrobacter youngae ATCC 29220 AAGTCTACGGCATGTGTACCGACAAAGTCTTCGATGAGGACAGTTCGAAATCTGATCGTCCGTCGGTGAA
 Yersinia enterocolitica strain AAGTATAAGGATGTGTGATGATAAAGAAATTCGATGAGGATAGTTCGCGGCTTATTTGGGCAATCAA
 Proteus mirabilis HI4320, comp AAGTATAAGGATGTGTGATGATAAAGAGTTTCGATGAGGATAAATTCACGCTTAAATCGTCCGTCCTATTTAA
 Shigella sonnei strain ECH+12 AAGTTTATGGGATGTGTAGCGATAAATACCTCGATGAGGACCAATTCATATTTAATCGTCCGCGCGGTGAA
 Klebsiella oxytoca 10-5243 str AAGTGTACGGCATGTGTACCGACCAACAATTCGATGAGGATGCGCTCAATCTGGTCTGCGGCAATTTAA
 Salmonella bongori strain 85-0 AAGTGTACGGCATGTGTACCGATACCTCTTTTGTGAGGATAAATCGAATCTGATCGTCCGACCGGTGAA
 Enterobacter cloacae strain GG AAGTGTACGGCATGTGTACTGATAAAAACCTTCGATGAGGATACCTCAACCTGGTGGTCCGGCCGATCAA
 Aeromonas hydrophila strain On CCTCCGAGGCTACGGGATGTGCCAGATCACAGCTTCGATGAGGACCAATCCGCGCTCAATCGTCCGGCC
 Morganella morganii strain szy AAGTGTACGGTATGTGTGATGATAAAGATTTTGAAGAGATAATTCACGCGTATTTGTCGGCCGAGTAA

1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470
|
 ArnA MDR3 GTCCAAGCAGTTGCTCGACCCGGTGTCTGGGCTACGGCCAGCAGGGGCTGCGCTCACCCCTGTTCCGT
 ArnA MDR4 GTCCAAGCAGTTGCTCGACCCGGTGTCTGGGCTACGGCCAGCAGGGGCTGCGCTCACCCCTGTTCCGT
 Escherichia coli str. K-12 sub ACAATTAATGATCGGGTGTCTGGGCTATGGCGAAAAGAGGGTTTACAGTTCAACCTCTTCCGCGCG
 Citrobacter youngae ATCC 29220 GCAAGTCTGGACCCGCTTATCTGGGCATACGGCGAAAAGAGGGCTGCGCTTCAACCTGTTCCGTCG
 Yersinia enterocolitica strain ACAATTTGTTAGACCGTGTATTTGGGCTTATGGCGAAAAGAGAAATCTGAAATTTACATTTTCCGTC
 Proteus mirabilis HI4320, comp ACAGTATTAGACCGAGTATTTGGGCTTATGGTCTAAAGAAAGGGCTGAAATTTACATTTTCCGTC
 Shigella sonnei strain ECH+12 ACAATTAATGATCGGGTGTCTGGGCTATGGCGAAAAGAGGGTTTACAGTTCAACCTCTTCCGCGCG
 Klebsiella oxytoca 10-5243 str GCAGTTGCTGGATCGCGTGTCTGGGCTACGGCGAATGAAGACCGCTGAAGTTTACCTGTTCCGTCG
 Salmonella bongori strain 85-0 ACAGCTTCTGACCCGGTAAATTTGGGCTATGGCGAAAAGAGGGGCTACGTTTACGCTTTTCCGTC
 Enterobacter cloacae strain GG ACAGCTGCTGACCCGCTGATTTGGGCTACGGCGAAAAGAGGGGCTGCGCTTACCTGTTCCGCGCA
 Aeromonas hydrophila strain On CTCCAAGCAGCTGCTGGATCGGGTCACTGGGCTACGGCAAGAAAGAGGGGCTCAACTTACACTGTTCC
 Morganella morganii strain szy ACAGCTGCTGACCCGGTATCTGGGCATATGGTGGAAAGAGGGTCTGAAATTCACGCTGTTCCGTCG

1510 1520 1530 1540 1550 1560 157

-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|

ArnA MDR3
 ArnA MDR4
 Escherichia coli str. K-12 sub
 Citrobacter youngae ATCC 29220
 Yersinia enterocolitica strain
 Proteus mirabilis HI4320, comp
 Shigella sonnei strain ECH+12
 Klebsiella oxytoca 10-5243 str
 Salmonella bongori strain 85-0
 Enterobacter cloacae strain GG
 Aeromonas hydrophila strain On
 Morganella morganii strain szy

CGCCTGGATTCCGCGCGGATCGGCAGCTCCGCGCGGATCACCCAGCTCATCTCCACCTGGTCCGAAAGCCA
 CGCCTGGATTCCGCGCGGATCGGCAGCTCCGCGCGGATCACCCAGCTCATCTCCACCTGGTCCGAAAGCCA
 CTTAATGCAGCGCGAATTCGCGAGCTCCGCGCGGATTTACCGCAACTCATTCTCAATCTGGTGAAGGTTCC
 CTTAATGCAGCGCGGATTCGCGAGCTCCGCGCGGATTTACCGCAACTCATTCTCAATCTGGTGAAGGTTCC
 CTTAATGCAGCGCGGATTCGCGAGCTCCGCGCGGATTTACCGCAACTCATTCTCAATCTGGTGAAGGTTCC
 TTAATTCAGCGCGGATTCGCGAGCTCCGCGCGGATTTACCGCAACTCATTCTCAATCTGGTGAAGGTTCC
 CTTAATGCAGCGCGAATTCGCGAGCTCCGCGCGGATTTACCGCAACTCATTCTCAATCTGGTGAAGGTTCC
 CTGAACCGCGCGGATTCGCGAGCTCCGCGCGGATTTACCGCAACTCATTCTCAATCTGGTGAAGGTTCC
 CTGAACCGCGCGGATTCGCGAGCTCCGCGCGGATTTACCGCAACTCATTCTCAATCTGGTGAAGGTTCC
 GACAGCCTGGACTCCGCGCGGATTCGCGAGCTCCGCGCGGATTTACCGCAACTCATTCTCAATCTGGTGAAGGTTCC
 CTGAACCTCCGCGCGGATTCGCGAGCTCCGCGCGGATTTACCGCAACTCATTCTCAATCTGGTGAAGGTTCC

1410 1420 1430 1440 1450 1460 147

-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|

ArnA MDR3
 ArnA MDR4
 Escherichia coli str. K-12 sub
 Citrobacter youngae ATCC 29220
 Yersinia enterocolitica strain
 Proteus mirabilis HI4320, comp
 Shigella sonnei strain ECH+12
 Klebsiella oxytoca 10-5243 str
 Salmonella bongori strain 85-0
 Enterobacter cloacae strain GG
 Aeromonas hydrophila strain On
 Morganella morganii strain szy

AGAAGCGTCTTCCAGCAGCTCGACGAGCGCATCGAGGCCCTCCGCGGATCATCGACAAACCGGACGG
 AGAAGCGTCTTCCAGCAGCTCGACGAGCGCATCGAGGCCCTCCGCGGATCATCGACAAACCGGACGG
 AAGCGTCTTCCAGCAGCTCGACGAGCGCATCGAGGCCCTCCGCGGATCATCGACAAACCGGACGG
 AGCGCTCTTCCAGCAGCTCGACGAGCGCATCGAGGCCCTCCGCGGATCATCGACAAACCGGACGG
 AGCGCTCTTCCAGCAGCTCGACGAGCGCATCGAGGCCCTCCGCGGATCATCGACAAACCGGACGG
 AAGCGTCTTCCAGCAGCTCGACGAGCGCATCGAGGCCCTCCGCGGATCATCGACAAACCGGACGG
 AAGCGTCTTCCAGCAGCTCGACGAGCGCATCGAGGCCCTCCGCGGATCATCGACAAACCGGACGG
 AAGCGTCTTCCAGCAGCTCGACGAGCGCATCGAGGCCCTCCGCGGATCATCGACAAACCGGACGG
 AAGCGTCTTCCAGCAGCTCGACGAGCGCATCGAGGCCCTCCGCGGATCATCGACAAACCGGACGG
 AAGCGTCTTCCAGCAGCTCGACGAGCGCATCGAGGCCCTCCGCGGATCATCGACAAACCGGACGG
 AAGCGTCTTCCAGCAGCTCGACGAGCGCATCGAGGCCCTCCGCGGATCATCGACAAACCGGACGG
 AAGCGTCTTCCAGCAGCTCGACGAGCGCATCGAGGCCCTCCGCGGATCATCGACAAACCGGACGG

1710 1720 1730 1740 1750 1760 177

-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|

ArnA MDR3
 ArnA MDR4
 Escherichia coli str. K-12 sub
 Citrobacter youngae ATCC 29220
 Yersinia enterocolitica strain
 Proteus mirabilis HI4320, comp
 Shigella sonnei strain ECH+12
 Klebsiella oxytoca 10-5243 str
 Salmonella bongori strain 85-0
 Enterobacter cloacae strain GG
 Aeromonas hydrophila strain On
 Morganella morganii strain szy

CAACCCGACAAACGAGCGGAGCATCCGCGAGCTCCGCGGAGGAACTGCTCCGCGAGTTCCGAGGCCACCCG
 CAACCCGACAAACGAGCGGAGCATCCGCGAGCTCCGCGGAGGAACTGCTCCGCGAGTTCCGAGGCCACCCG
 TCCCTGAGAAACGAGCGGAGCATCCGCGAGCTCCGCGGAGGAACTGCTCCGCGAGTTCCGAGGCCACCCG
 TCCCTGAGAAACGAGCGGAGCATCCGCGAGCTCCGCGGAGGAACTGCTCCGCGAGTTCCGAGGCCACCCG
 CCGGATTAACGAGCGGAGCATCCGCGAGCTCCGCGGAGGAACTGCTCCGCGAGTTCCGAGGCCACCCG
 CCGGATTAACGAGCGGAGCATCCGCGAGCTCCGCGGAGGAACTGCTCCGCGAGTTCCGAGGCCACCCG
 CCGGATTAACGAGCGGAGCATCCGCGAGCTCCGCGGAGGAACTGCTCCGCGAGTTCCGAGGCCACCCG
 CCGGATTAACGAGCGGAGCATCCGCGAGCTCCGCGGAGGAACTGCTCCGCGAGTTCCGAGGCCACCCG
 CCGGATTAACGAGCGGAGCATCCGCGAGCTCCGCGGAGGAACTGCTCCGCGAGTTCCGAGGCCACCCG
 CCGGATTAACGAGCGGAGCATCCGCGAGCTCCGCGGAGGAACTGCTCCGCGAGTTCCGAGGCCACCCG
 CCGGATTAACGAGCGGAGCATCCGCGAGCTCCGCGGAGGAACTGCTCCGCGAGTTCCGAGGCCACCCG
 CCGGATTAACGAGCGGAGCATCCGCGAGCTCCGCGGAGGAACTGCTCCGCGAGTTCCGAGGCCACCCG

1810 1820 1830 1840 1850 1860 187

-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|

ArnA MDR3
 ArnA MDR4
 Escherichia coli str. K-12 sub
 Citrobacter youngae ATCC 29220
 Yersinia enterocolitica strain
 Proteus mirabilis HI4320, comp
 Shigella sonnei strain ECH+12
 Klebsiella oxytoca 10-5243 str
 Salmonella bongori strain 85-0
 Enterobacter cloacae strain GG
 Aeromonas hydrophila strain On
 Morganella morganii strain szy

TTCCCGAGGTGGAGAGCGCAGCTTCTACGGCGAGCGCTACCAGGACGTGGCCCAACCGAAGCCGAGCA
 TTCCCGAGGTGGAGAGCGCAGCTTCTACGGCGAGCGCTACCAGGACGTGGCCCAACCGAAGCCGAGCA
 CGCGTTGTCGAAAGTAGCAGCTACTACGGCAAGGATATCAGGACGTAGAGCATCGTAAACCGGAGCATCC
 CGAAACGTGAAAGTAGCAGCTACTACGGCAAGGATATCAGGACGTAGAGCATCGTAAACCGGAGCATCC
 AAGATATTGAAAGTAGCAGCTACTACGGCAAGGATATCAGGACGTAGAGCATCGTAAACCGGAGCATCC
 AAGAAATCGAAAGTAGCAGCTACTACGGCAAGGATATCAGGACGTAGAGCATCGTAAACCGGAGCATCC
 CGCGTTGTCGAAAGTAGCAGCTACTACGGCAAGGATATCAGGACGTAGAGCATCGTAAACCGGAGCATCC
 CGCGAAGTGGAAAGTAGCAGCTACTACGGCAAGGATATCAGGACGTAGAGCATCGTAAACCGGAGCATCC
 CAGATCGTGGAAAGCGGTAGCTATTACGGCAAGGATATCAGGACGTAGAGCATCGTAAACCGGAGCATCC
 CGCGAAGTGGAAAGTAGCAGCTACTACGGCAAGGATATCAGGACGTAGAGCATCGTAAACCGGAGCATCC
 CGCTTCAAGCTGGTGGAGAGCAAGTCTTCTACGGTACGGCTATCAGGACGTCTCCCAACCGGAGCATCC
 CGTAAATCGAAAGTAGCAGCTACTACGGTAAAGGTACCAGGACGTGGAGCACCGTAAACCGGAGCATCC

1510 1520 1530 1540 1550 1560 157

-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|

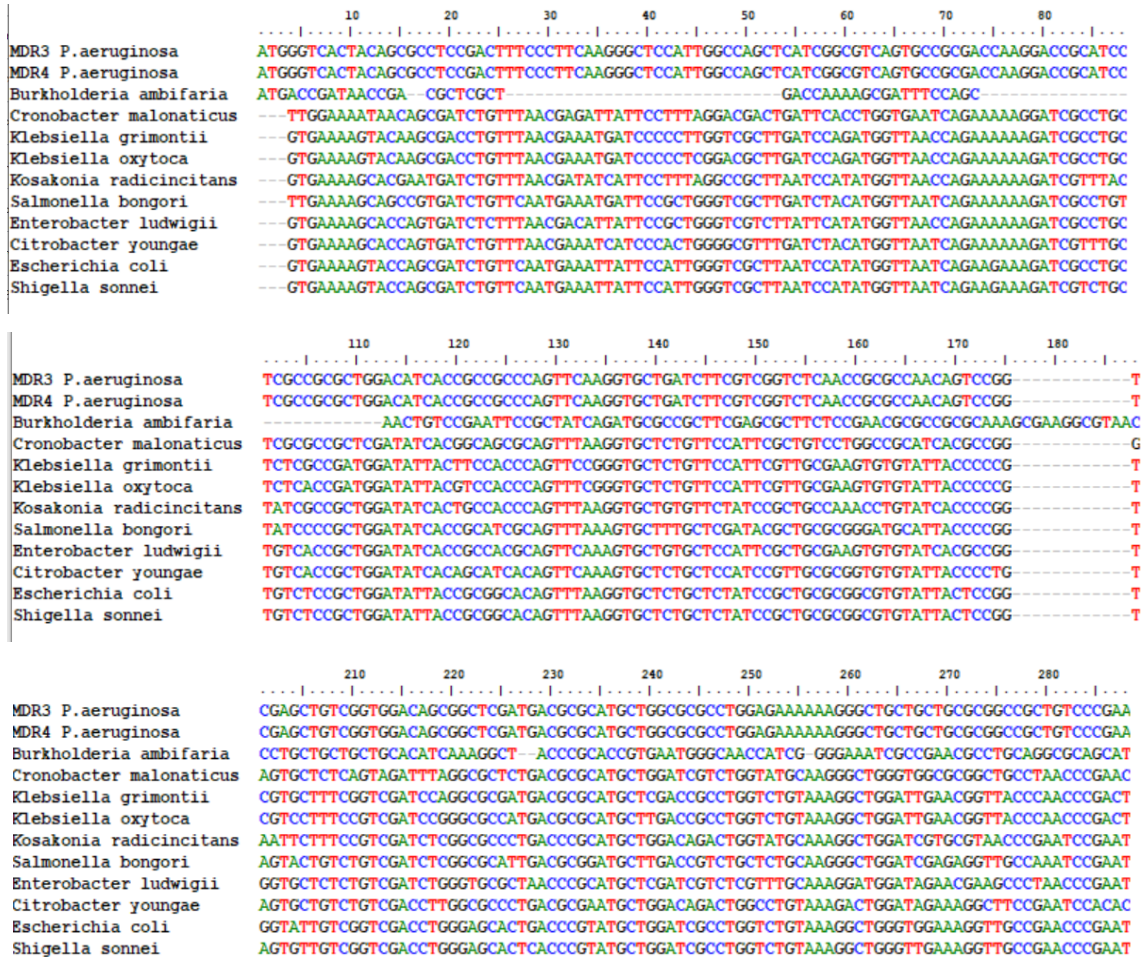
ArnA MDR3
 ArnA MDR4
 Escherichia coli str. K-12 sub
 Citrobacter youngae ATCC 29220
 Yersinia enterocolitica strain
 Proteus mirabilis HI4320, comp
 Shigella sonnei strain ECH+12
 Klebsiella oxytoca 10-5243 str
 Salmonella bongori strain 85-0
 Enterobacter cloacae strain GG
 Aeromonas hydrophila strain On
 Morganella morganii strain szy

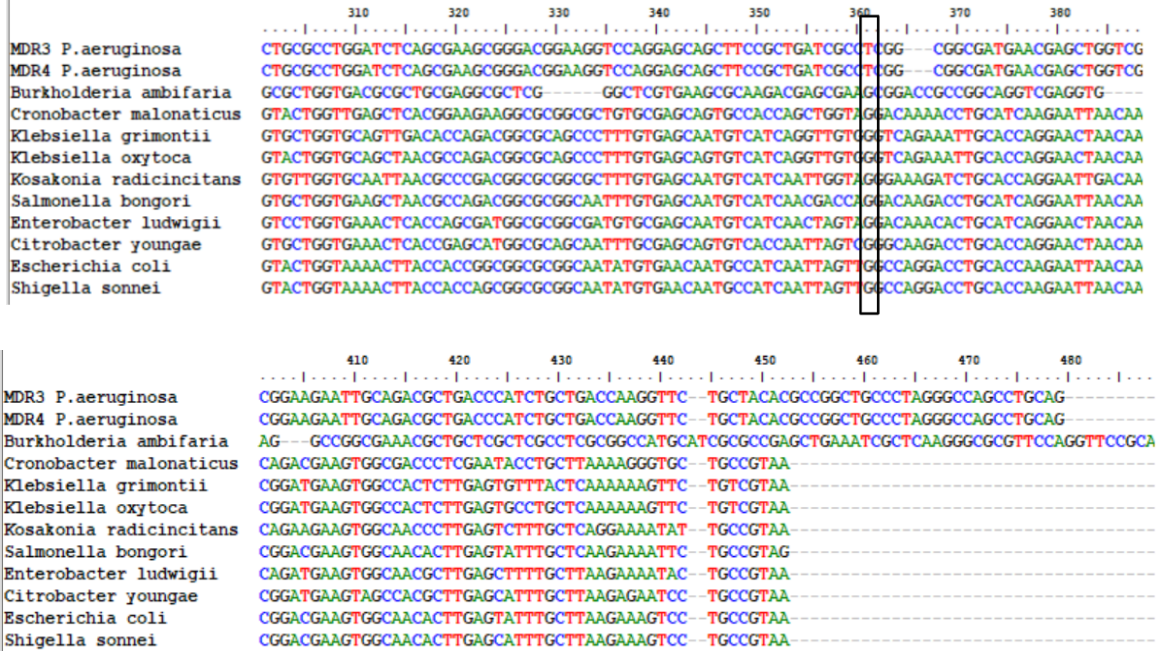
AGCCACCATCGAACTGGCGAGACCATCGGCAAGACCTCGACTTCTTCTCCACGAAAGCGCTCCGGA
 AGCCACCATCGAACTGGCGAGACCATCGGCAAGACCTCGACTTCTTCTCCACGAAAGCGCTCCGGA
 CGAAATGATATGCAAGAAACCATCGACGAAACCGTGGATTTCTTCTGGCACCGTTGATCTTACGGA
 CCACCATGATATGCAAGAAACCATCGACGAAACCGTGGATTTCTTCTGGCACCGTTGATCTTACGGA
 CAGAAATGCTTTAGAGCAACCGTCACTGGAAACATGGACTTCTTCTACGTGGCGTCTACTTGAACA
 CAACTCGAAACACCGCAACCGTGAAGAGACATTAAGACTTCTTCTACGTGGTGCAGTTGAAGAGTT
 CGAAATGATATGCAAGAAACCATCGACGAAACCGTGGATTTCTTCTGGCACCGTTGATCTTACGGA
 CGACGGTGGAAAGAGACCGTGGAAACATACCTGGACTTCTTCTGGCACCGTTGAAATGACGGA
 CGTCTTACAACTCCGCGATACCGTTGAAGAGACCGTGGATTTCTTCTGGCACCGTTGATCTTACGGA
 CAACGGTGAAGTAGGACAAACCATGATGAGACCGTGGATTTCTTCTGGCACCGTTGAGCTGTGGA
 GGAACCGACCATCGAGATGGAAGAGACCATCGGCAACACCGTGGACTTCTTCTGGCACCGGCGGTTAC
 CGACTATGATACCCGCGAGCTGTGGAAGAGACTCTCGACTTCTTCTGGCGGTGGGTTGAAGAGCT

2010
|.....|.....|.....|.....
 ArnA MDR3
 ArnA MDR4
 Escherichia coli str. K-12 sub
 Citrobacter youngae ATCC 29220
 Yersinia enterocolitica strain
 Proteus mirabilis HI4320, comp
 Shigella sonnei strain ECH12
 Klebsiella oxytoca 10-5243 str
 Salmonella bongori strain 85-0
 Enterobacter cloacae strain GG
 Aeromonas hydrophila strain On
 Morganelia morganii strain szy

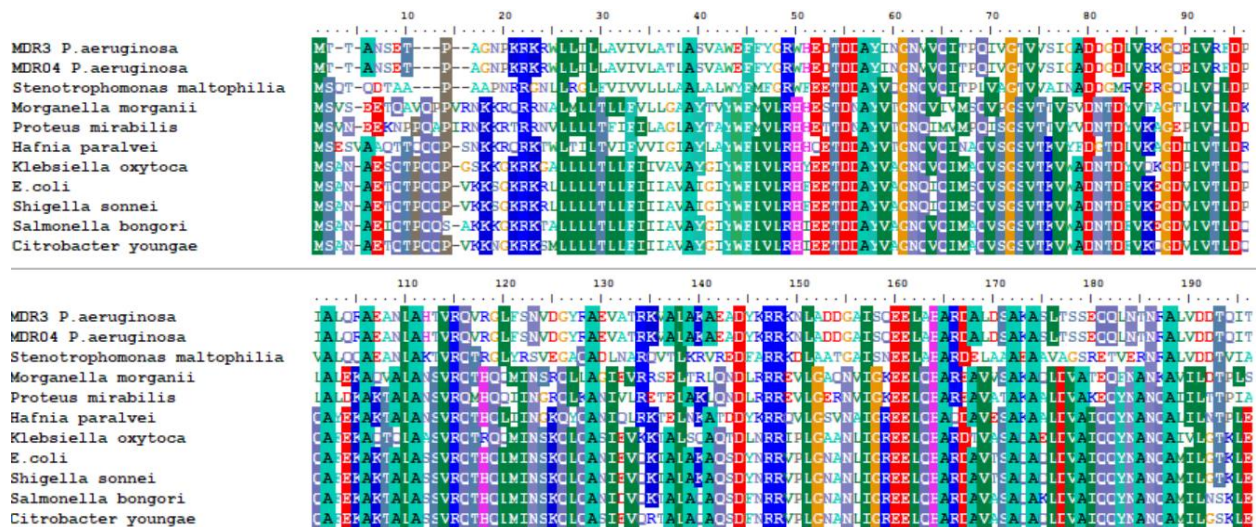
GGATGAGCATCACGTATGA

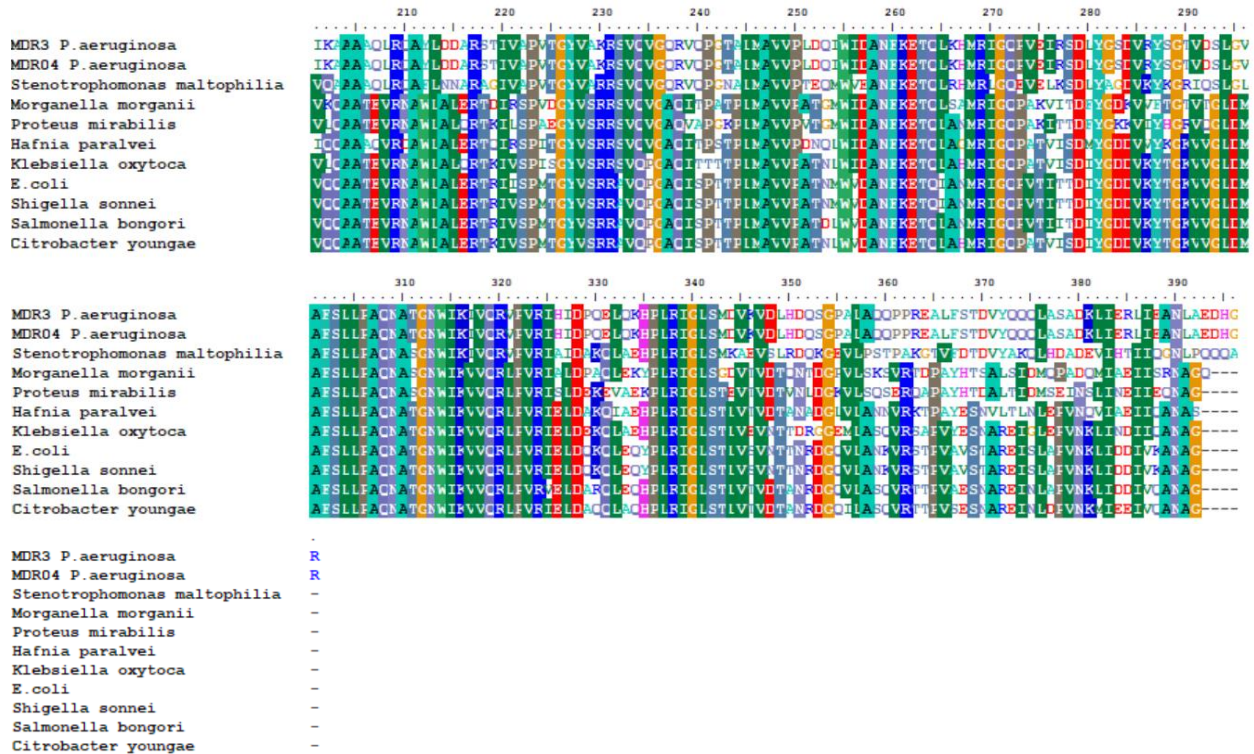
3. Alineamiento múltiple de secuencias de nucleótidos de cepas de *P.aeruginosa* MDR 03, MDR 04, *Escherichia coli*, *Citrobacter youngae*, *Enterobacter ludwigii*, *Klebsiella grimontii*, *Cronobacter malonaticus*, *Shigella sonnei*, *Kosakonia radicincitans*, *Burkholderia ambifaria*, *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella bongori* en *MarR*. Se observa en el recuadro negro la sustitucion de nucleótidos presente en la posición 361 del alineamiento.





4. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos deducidas de *ErmA* de *Pseudomonas aeruginosa*, MDR03 y 04 y otros organismos ortólogos. Se muestra la identidad fondo color.





5. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos deducidas de gen *ArnA* de *Pseudomonas aeruginosa* (MDR 03 y 04 y organismos ortólogos. En el recuadro negro se señala el cambio de aminoácidos (S18A) en la posición 20 del alineamiento. Con flechas negras se señalan los aminoácidos conservados.

10 20 30 40 50 60 70

ArnA_MDR3
 ArnA_MDR4
 Escherichia coli
 Citrobacter youngae
 Yersinia enterocolitica
 Proteus mirabilis
 Shigella sonnei
 Klebsiella oxytoca
 Salmonella bongori
 Enterobacter cloacae
 Aeromonas hydrophila
 Morganella morgani

```

MTSKAVVEAYHDIGCGIFALLAGYEIAAVFTHDDPRENTFYASVARLCAERGITELFAEEDVNHFWLERIRQL
--MKLVVEAYHDMGCGIFALLAGYEISAIFTHDNDPEGCIFYGSVARIAAERGITVYADNVNHFWLWVERIRQL
--MRAVVEAYBDMGCGVALLAGYEIAAIFTHDPEGCIFYGSVSRILAAAGIEVYAEDEVNHFWLWIERISQL
--MRAIVEAYHDIGCGIFALVEAGDIIAVFTHDSDPEENFFSVAFAADLLLEVEAEEDVNHFWLWIERISQL
--MRAIVEAYHDIGCGIFALVEAGDIIAVFTHDSDPEENFFSVAFAVSAEMGLVEAEEDVNHFWLWIERIREM
--MKLVVEAYHDMGCGIFALLAGYEISAIFTHDNDPEGCIFYGSVARIAAERGITVYAEDEVNHFWLWVERIRQL
--MRAVVEAYBDMGCGVALLAGYEIAAIFTHDNDPEENFFSVAFAVSAEMGLVEAEEDVNHFWLWIERIREM
--MRAIVEAYBDMGCGVALLAGYEIAAIFTHDNDPEENFFSVAFAVSAEMGLVEAEEDVNHFWLWIERIREM
--MKLVVEAYHDMGCGIFALLAGYEISAIFTHDNDPEENFFSVAFAVSAEMGLVEAEEDVNHFWLWIERIREM
--MRAVVEAYBDMGCGVALLAGYEIAAIFTHDNDPEENFFSVAFAVSAEMGLVEAEEDVNHFWLWIERIREM
--MRAIVEAYBDMGCGVALLAGYEIAAIFTHDNDPEENFFSVAFAVSAEMGLVEAEEDVNHFWLWIERIREM

```

110 120 130 140 150 160 170

ArnA_MDR3
 ArnA_MDR4
 Escherichia coli
 Citrobacter youngae
 Yersinia enterocolitica
 Proteus mirabilis
 Shigella sonnei
 Klebsiella oxytoca
 Salmonella bongori
 Enterobacter cloacae
 Aeromonas hydrophila
 Morganella morgani

```

CAYNLHGSLLPRYRGAFLNVLVNGETETCVTLHFMIERADAGEIIAQQVAIDDEEDTALSILHKLRAAGALLR
CAYNLHGSLLPRYRGAFLNVLVNGETETCVTLHFMIERADAGEIIAQQVAIDDEEDTALSILHKLRAAGALLR
CAFNLHGSLLPRYRGAFLNVLVNGETETCVTLHFVRRADAGIIVAQIRIATADDITILHRLCAARQLLE
CAFNLHGSLLPRYRGAFLNVLVNGETETCVTLHFVRRADAGIIVAQIRIATADDITILHRLCAARQLLE
CAFNLHGSLLPRYRGAFLNVLVNGETETCVTLHFVRRADAGIIVAQIRIATADDITILHRLCAARQLLE
CAFNLHGSLLPRYRGAFLNVLVNGESETCVTLHFVRRADAGIIVAQIRIATADDITILHRLCAARQLLE
CAFNLHGSLLPRYRGAFLNVLVNGESETCVTLHFVRRADAGIIVAQIRIATADDITILHRLCAARQLLE
CAFNLHGSLLPRYRGAFLNVLVNGESETCVTLHFVRRADAGIIVAQIRIATADDITILHRLCAARQLLE
CAFNLHGSLLPRYRGAFLNVLVNGESETCVTLHFVRRADAGIIVAQIRIATADDITILHRLCAARQLLE
CAFNLHGSLLPRYRGAFLNVLVNGESETCVTLHFVRRADAGIIVAQIRIATADDITILHRLCAARQLLE
CAFNLHGSLLPRYRGAFLNVLVNGESETCVTLHFVRRADAGIIVAQIRIATADDITILHRLCAARQLLE
CAFNLHGSLLPRYRGAFLNVLVNGESETCVTLHFVRRADAGIIVAQIRIATADDITILHRLCAARQLLE
CAFNLHGSLLPRYRGAFLNVLVNGESETCVTLHFVRRADAGIIVAQIRIATADDITILHRLCAARQLLE
CAFNLHGSLLPRYRGAFLNVLVNGESETCVTLHFVRRADAGIIVAQIRIATADDITILHRLCAARQLLE
CAFNLHGSLLPRYRGAFLNVLVNGESETCVTLHFVRRADAGIIVAQIRIATADDITILHRLCAARQLLE
CAFNLHGSLLPRYRGAFLNVLVNGESETCVTLHFVRRADAGIIVAQIRIATADDITILHRLCAARQLLE

```

210 220 230 240 250 260 270

ArnA_MDR3
 ArnA_MDR4
 Escherichia coli
 Citrobacter youngae
 Yersinia enterocolitica
 Proteus mirabilis
 Shigella sonnei
 Klebsiella oxytoca
 Salmonella bongori
 Enterobacter cloacae
 Aeromonas hydrophila
 Morganella morgani

```

GRRTPADGLLWVHREARQLYDIVRVTQYPCAFCCVGGQRLLVWSAEVVAAGNHGREFPGSVLSCDPLRACGESSI
GRRTPADGLLWVHREARQLYDIVRVTQYPCAFCCVGGQRLLVWSAEVVAAGNHGREFPGSVLSCDPLRACGESSI
GRRTEDDSELEWHREASVLNHNVFVVDWEPCAFSYVGGQRFIVWSSVFPHASFAQPGSVISVAPLLIACGDGAL
GRRTEDDSELEWHREAEELHNVFVVDWEPCAFSYVGGQRFIVWSSVFCNDLAAQGTIVISVAPLLIACGDGAL
GRRTEDDSELEWHREAEELHNVFVVDWEPCAFSYVGGQRFIVWSSVFCNDLAAQGTIVISVAPLLIACGDGAL
GRRTEDDSELEWHREAEELHNVFVVDWEPCAFSYVGGQRFIVWSSVFCNDLAAQGTIVISVAPLLIACGDGAL
GRRTEDDSELEWHREAEELHNVFVVDWEPCAFSYVGGQRFIVWSSVFCNDLAAQGTIVISVAPLLIACGDGAL
GRRTEDDSELEWHREAEELHNVFVVDWEPCAFSYVGGQRFIVWSSVFCNDLAAQGTIVISVAPLLIACGDGAL
GRRTEDDSELEWHREAEELHNVFVVDWEPCAFSYVGGQRFIVWSSVFCNDLAAQGTIVISVAPLLIACGDGAL
GRRTEDDSELEWHREAEELHNVFVVDWEPCAFSYVGGQRFIVWSSVFCNDLAAQGTIVISVAPLLIACGDGAL
GRRTEDDSELEWHREAEELHNVFVVDWEPCAFSYVGGQRFIVWSSVFCNDLAAQGTIVISVAPLLIACGDGAL
GRRTEDDSELEWHREAEELHNVFVVDWEPCAFSYVGGQRFIVWSSVFCNDLAAQGTIVISVAPLLIACGDGAL
GRRTEDDSELEWHREAEELHNVFVVDWEPCAFSYVGGQRFIVWSSVFCNDLAAQGTIVISVAPLLIACGDGAL
GRRTEDDSELEWHREAEELHNVFVVDWEPCAFSYVGGQRFIVWSSVFCNDLAAQGTIVISVAPLLIACGDGAL
GRRTEDDSELEWHREAEELHNVFVVDWEPCAFSYVGGQRFIVWSSVFCNDLAAQGTIVISVAPLLIACGDGAL
GRRTEDDSELEWHREAEELHNVFVVDWEPCAFSYVGGQRFIVWSSVFCNDLAAQGTIVISVAPLLIACGDGAL

```

310 320 330 340 350 360 370

ArnA_MDR3
 ArnA_MDR4
 Escherichia coli
 Citrobacter youngae
 Yersinia enterocolitica
 Proteus mirabilis
 Shigella sonnei
 Klebsiella oxytoca
 Salmonella bongori
 Enterobacter cloacae
 Aeromonas hydrophila
 Morganella morgani

```

LVGRLRGAASGECRR--TFVLLCVNGFIGNHLSERLLRDSRYEVHGMDIGSDATSRFLNHPHFHVEGDISI
LVGRLRGAASGECRR--TFVLLCVNGFIGNHLSERLLRDSRYEVHGMDIGSDATSRFLNHPHFHVEGDISI
LVGSRLSQSACTARRR--TFVLLCVNGFIGNHLSERLLREDHYEVYGLDIGSDATSRFLNHPHFHVEGDISI
LVGSRLSQSACTARRR--TFVLLCVNGFIGNHLSERLLREDHYEVYGLDIGSDATSRFLNHPHFHVEGDISI
LVGSRLSQSACTARRR--TFVLLCVNGFIGNHLSERLLREDHYEVYGLDIGSDATSRFLNHPHFHVEGDISI
LVGSRLSQSACTARRR--TFVLLCVNGFIGNHLSERLLREDHYEVYGLDIGSDATSRFLNHPHFHVEGDISI
LVGSRLSQSACTARRR--TFVLLCVNGFIGNHLSERLLREDHYEVYGLDIGSDATSRFLNHPHFHVEGDISI
LVGSRLSQSACTARRR--TFVLLCVNGFIGNHLSERLLREDHYEVYGLDIGSDATSRFLNHPHFHVEGDISI
LVGSRLSQSACTARRR--TFVLLCVNGFIGNHLSERLLREDHYEVYGLDIGSDATSRFLNHPHFHVEGDISI
LVGSRLSQSACTARRR--TFVLLCVNGFIGNHLSERLLREDHYEVYGLDIGSDATSRFLNHPHFHVEGDISI
LVGSRLSQSACTARRR--TFVLLCVNGFIGNHLSERLLREDHYEVYGLDIGSDATSRFLNHPHFHVEGDISI
LVGSRLSQSACTARRR--TFVLLCVNGFIGNHLSERLLREDHYEVYGLDIGSDATSRFLNHPHFHVEGDISI
LVGSRLSQSACTARRR--TFVLLCVNGFIGNHLSERLLREDHYEVYGLDIGSDATSRFLNHPHFHVEGDISI
LVGSRLSQSACTARRR--TFVLLCVNGFIGNHLSERLLREDHYEVYGLDIGSDATSRFLNHPHFHVEGDISI
LVGSRLSQSACTARRR--TFVLLCVNGFIGNHLSERLLREDHYEVYGLDIGSDATSRFLNHPHFHVEGDISI

```

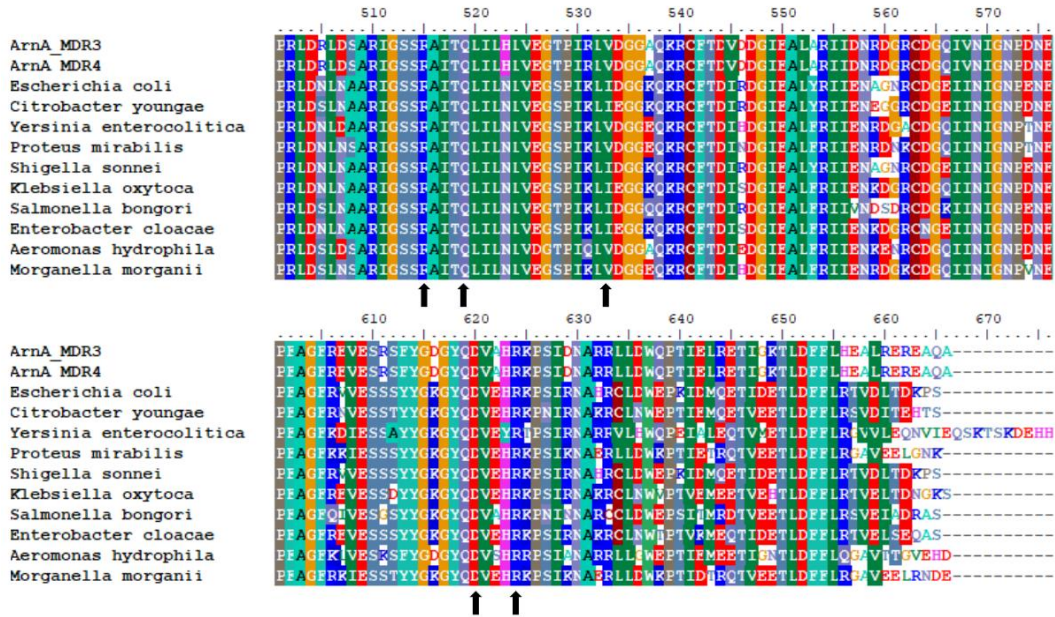
410 420 430 440 450 460 470

ArnA_MDR3
 ArnA_MDR4
 Escherichia coli
 Citrobacter youngae
 Yersinia enterocolitica
 Proteus mirabilis
 Shigella sonnei
 Klebsiella oxytoca
 Salmonella bongori
 Enterobacter cloacae
 Aeromonas hydrophila
 Morganella morgani

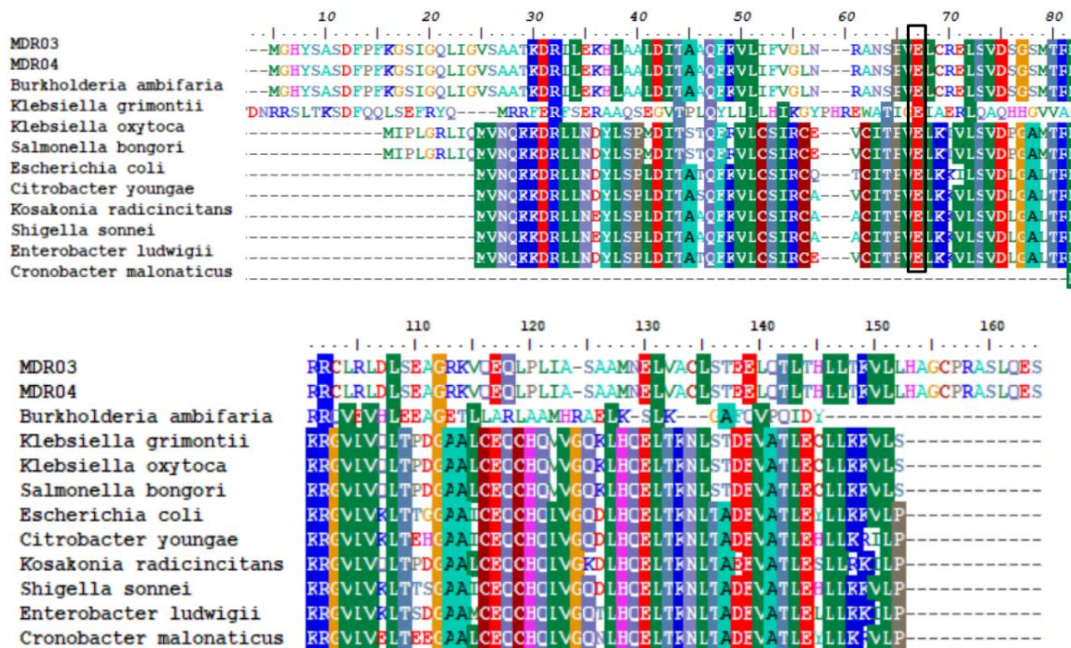
```

IEYTRNPLFVEELDDEENLRIVRVCVRYRFRVFPSTSEVYCMCDDEDEDNSNLIIVGFINRQFWIYSVSRQLLD
IEYTRNPLFVEELDDEENLRIVRVCVRYRFRVFPSTSEVYCMCDDEDEDNSNLIIVGFINRQFWIYSVSRQLLD
IEYTRNPLFVEELDDEENLRIVRVCVRYRFRVFPSTSEVYCMCDDEDEDNSNLIIVGFINRQFWIYSVSRQLLD
IEYTRNPLFVEELDDEENLRIVRVCVRYRFRVFPSTSEVYCMCDDEDEDNSNLIIVGFINRQFWIYSVSRQLLD
IEYTRNPLFVEELDDEENLRIVRVCVRYRFRVFPSTSEVYCMCDDEDEDNSNLIIVGFINRQFWIYSVSRQLLD
IEYTRNPLFVEELDDEENLRIVRVCVRYRFRVFPSTSEVYCMCDDEDEDNSNLIIVGFINRQFWIYSVSRQLLD
IEYTRNPLFVEELDDEENLRIVRVCVRYRFRVFPSTSEVYCMCDDEDEDNSNLIIVGFINRQFWIYSVSRQLLD
IEYTRNPLFVEELDDEENLRIVRVCVRYRFRVFPSTSEVYCMCDDEDEDNSNLIIVGFINRQFWIYSVSRQLLD
IEYTRNPLFVEELDDEENLRIVRVCVRYRFRVFPSTSEVYCMCDDEDEDNSNLIIVGFINRQFWIYSVSRQLLD
IEYTRNPLFVEELDDEENLRIVRVCVRYRFRVFPSTSEVYCMCDDEDEDNSNLIIVGFINRQFWIYSVSRQLLD
IEYTRNPLFVEELDDEENLRIVRVCVRYRFRVFPSTSEVYCMCDDEDEDNSNLIIVGFINRQFWIYSVSRQLLD
IEYTRNPLFVEELDDEENLRIVRVCVRYRFRVFPSTSEVYCMCDDEDEDNSNLIIVGFINRQFWIYSVSRQLLD
IEYTRNPLFVEELDDEENLRIVRVCVRYRFRVFPSTSEVYCMCDDEDEDNSNLIIVGFINRQFWIYSVSRQLLD
IEYTRNPLFVEELDDEENLRIVRVCVRYRFRVFPSTSEVYCMCDDEDEDNSNLIIVGFINRQFWIYSVSRQLLD
IEYTRNPLFVEELDDEENLRIVRVCVRYRFRVFPSTSEVYCMCDDEDEDNSNLIIVGFINRQFWIYSVSRQLLD

```



6. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos deducidas de gen *MarR* de *Pseudomonas aeruginosa* (MDR 03 y 04) y otros organismos ortólogos. En el recuadro negro, se señalan el cambio de aminoácidos en la posición 63 del alineamiento.



7. Número de acceso del Genbank de cada ortólogo seleccionado para cada gen de interés (*emrA*, *arnA*, *marR* de *Pseudomonas aeruginosa* MDR)

7.1 Ortólogos seleccionados para el gen *emrA*

Nombre del Ortólogo	Número de Acceso
<i>Escherichia coli</i>	NC_000913.3
<i>Citrobacter youngae</i>	NZ_GG730299.1
<i>Yersinia enterocolitica</i>	NZ_CP011118.1
<i>Proteus mirabilis</i>	NC_010554.1
<i>Shigella sonnei</i>	NZ_NQBD01000046.1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	NZ_JH603143.1
<i>Salmonella bongori</i>	NZ_CP053416.1
<i>Enterobacter cloacae</i>	NZ_CP009756.1
<i>Aeromonas hydrophila</i>	NZ_CP050851.1
<i>Morganella morganii</i>	NZ_JACOMH010000001.1

7.2 Ortólogos seleccionados para el gen *arnA*

Nombre del Ortólogo	Número de Acceso
<i>Escherichia coli</i>	<u>NC_000913.3</u>
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	NZ_LS483377.1
<i>Shigella sonnei</i>	NZ_NQBD01000045.1
<i>Proteus mirabilis</i>	NC_010554.1
<i>Salmonella bongori</i>	NZ_CP053416.1
<i>Hafnia paralvei</i>	NZ_JAAQVO010000001.1
<i>Citrobacter youngae</i>	NZ_JADVFS010000011.1
<i>Morganella morganii</i>	NZ_JACOMH010000004.1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	NZ_JH603143.1

7.2 Ortólogos seleccionados para el gen *marR*

Nombre del Ortólogo	Número de Acceso
<i>Escherichia coli</i>	<u>NC_000913.3</u>
<i>Shigella sonnei</i>	NZ_CP055292.1
<i>Kosakonia radicincitans</i>	NZ_CP040392.1
<i>Salmonella bongori</i>	NC_021870.1
<i>Citrobacter youngae</i>	NZ_JADVFS010000011.1
<i>Burkholderia ambifaria</i>	NZ_CP066038.1
<i>Cronobacter malonaticus</i>	NZ_CP013940.1
<i>Enterobacter ludwigii</i>	NZ_CP017279.1
<i>Klebsiella grimontii</i>	<u>NZ_CP044527.1</u>
<i>Klebsiella oxytoca</i>	NZ_CP033844.1