

Accepted Manuscript / Manuscrito Aceptado

Title Paper/Título del artículo:

Identificación de genes de resistencia a carbapenémicos en *Pseudomonas aeruginosa*

Identification of carbapenem resistance genes in *Pseudomonas aeruginosa*

Authors/Autores: Rodríguez-Ocampo, A.N., Ramos-Ramírez P.E., Arvizu-Gómez, J.L., Ramos-Ramírez, L.C., González-Reyes, C.

ID: e1829

DOI: <https://doi.org/10.15741/revbio.12.e1829>

Received/Fecha de recepción: November 09th 2024

Accepted /Fecha de aceptación: July 15th 2025

Available online/Fecha de publicación: July 18th 2025

Please cite this article as/Como citar este artículo: Rodríguez-Ocampo, A.N., Ramos-Ramírez P.E., Arvizu-Gómez, J.L., Ramos-Ramírez, L.C., González-Reyes, C. (2025). Identification of carbapenem resistance genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista Bio Ciencias*, 12, e1829. <https://doi.org/10.15741/revbio.12.e1829>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Este archivo PDF es un manuscrito no editado que ha sido aceptado para publicación. Esto es parte de un servicio de Revista Bio Ciencias para proveer a los autores de una versión rápida del manuscrito. Sin embargo, el manuscrito ingresará a proceso de edición y corrección de estilo antes de publicar la versión final. Por favor note que la versión actual puede contener errores de forma.

Artículo original

Identificación de genes de resistencia a carbapenémicos en *Pseudomonas aeruginosa*.

Identification of carbapenem resistance genes in *Pseudomonas aeruginosa*.

Carbapenemasas en *P. aeruginosa*

Carbapenemases in *P. aeruginosa*

Rodríguez-Ocampo, A.N.¹⁺, Ramos-Ramírez P.E. ¹⁺, Arvizu-Gómez, J.L.², Ramos-Ramírez, L.C.¹, González-Reyes, C^{1*}.

¹Unidad Académica de Ciencias Químico Biológico y Farmacéuticas, Universidad Autónoma de Nayarit, Tepic 63000, Mexico.

²Secretaría de Investigación y Posgrado, Centro Nayarita de Innovación y Transferencia de Tecnología (CENITT), Universidad Autónoma de Nayarit, Tepic 63000, Mexico.

+ Estas autoras contribuyeron igualmente a este trabajo.

*Corresponding Author:

Christian González-Reyes. Unidad Académica de Ciencias Químico Biológico y Farmacéuticas, Universidad Autónoma de Nayarit, Tepic 63000, Mexico. E-mail: christian.gonzalez@uan.edu.mx

ORCID ANRO: 0000-0003-0192-9789

ORCID PERR: -----

ORCID JLAG: 0000-0001-7514-6256

ORCID LCRR: 0000-0002-9234-6177

ORCID CGR: 0000-0003-1605-4962

RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista capaz de ocasionar diferentes infecciones nosocomiales. Se ha reportado que la bacteria presenta resistencia intrínseca y adquirida a antibióticos, debido a la baja permeabilidad de su membrana externa, la sobreexpresión de bombas de eflujo y la producción de enzimas que degradan el antibiótico. El objetivo del presente estudio fue identificar genes de resistencia a carbapenémicos (Metallo-β-lactamasas VIM e IMP) en 50 aislados de *P. aeruginosa*. La identificación y susceptibilidad antimicrobiana se realizó mediante el sistema automatizado VITEK-2. Posteriormente se realizó la búsqueda de los genes *rpoB*, *bla_{VIM}* y

*bla*_{IMP} por reacción en cadena de la polimerasa; la determinación fenotípica de Metallo-β-lactamasas se llevó a cabo por la prueba de sinergia de doble disco. Los resultados obtenidos corroboran que el 100 % de los aislados analizadas corresponden a *P. aeruginosa*. El perfil de sensibilidad mostró que 82 % de los aislados presentaron resistencia al imipenem, mientras que el 46 % mostraron sensibilidad a la amikacina; se evidenció la presencia del gen *bla*_{IMP} en 90 % de los aislados siendo el más frecuente, seguido de *bla*_{VIM} con el 32 % de los casos. Fenotípicamente, se obtuvo un resultado positivo en el 88 % de los aislados de *P. aeruginosa*.

PALABRAS CLAVE:

Pseudomonas aeruginosa, *rpoB*, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, resistencia a antibióticos.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen capable of causing a series of nosocomial infections, mainly in immunocompromised patients. Currently, it has been reported that the bacteria present intrinsic and acquired resistance to antibiotics, due to the low permeability of its outer membrane, the overexpression of efflux pumps, and the production of enzymes that degrade the antibiotic. The latter is a resistance mechanism presented by bacteria through the acquisition of a transmissible gene that produces a specific enzyme for the hydrolysis of carbapenems, called Metallo-β-lactamases. The objective of the present study was to identify carbapenem resistance genes (VIM and IMP metallo-β-lactamases) in 50 isolates of *P. aeruginosa*. The identification and antimicrobial susceptibility were performed using the VITEK-2 automated system. Subsequently, the *rpoB*, *bla*_{VIM}, and *bla*_{IMP} genes were searched by polymerase chain reaction; for the phenotypic determination of Metallo-β-lactamases, the double disk synergy test was performed. The results obtained corroborate that 100 % of the analyzed isolates correspond to *P. aeruginosa*. The sensitivity profile revealed that 82 % of the isolates were resistant to imipenem, while 46 % were sensitive to amikacin. The presence of the *bla*_{IMP} gene was evident in 90 % of the isolates, being the most frequent, followed by *bla*_{VIM} in 32% of the cases. Phenotypically, a positive result was obtained in 88 % of the *P. aeruginosa* isolates.

KEY WORDS:

Pseudomonas aeruginosa, *rpoB*, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, antibiotic resistance.

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo Gram negativo, aerobia facultativa, no fermenta lactosa, glucosa y tiene la capacidad de usar diversas moléculas orgánicas como fuente de energía (Diggle y Whiteley, 2020). Produce una serie de pigmentos solubles, como la piocianina, pioverdina y piomelanina; tiene un aroma particular, similar a la uva o tortilla de maíz (Martínez-Zavaleta et al., 2023). *P. aeruginosa* es considerado como un patógeno ubicuo, ya que tiene la capacidad de adaptarse y resistir ambientes húmedos, tanto en el agua como en el suelo con un mínimo de requerimientos nutricionales y tolerando diferentes condiciones, ya que puede crecer a temperaturas desde 4 °C hasta 42 °C, destacando de las demás *Pseudomonas* por su capacidad de desarrollarse a altas temperaturas (Solórzano y Parrales, 2021; Liao et al., 2022).

P. aeruginosa es un patógeno oportunista que está generando un impacto a nivel global, ya que puede ocasionar una serie de infecciones nosocomiales principalmente en pacientes inmunocomprometidos y es poco frecuente que pueda causar infecciones en personas sanas (Diggle y Whiteley, 2020; Solórzano y Parrales, 2021). Las infecciones producidas por esta bacteria pueden comprometer la piel, tejidos subcutáneos, huesos, oídos, ojos, vías urinarias, pulmones, corazón, el sistema nervioso central, incluso el torrente sanguíneo; pero, el lugar afectado varía según la vía de acceso y las deficiencias inmunológicas de la persona (Bolívar-Vargas et al., 2021; Radhika et al., 2022).

Durante los últimos años, *P. aeruginosa* ha adquirido una alta resistencia a los antibióticos. En 2017, la Organización Mundial de la Salud (WHO) reportó a *P. aeruginosa* como uno de los patógenos multi-resistentes de prioridad crítica, que ha demostrado una mayor resistencia a los carbapenémicos (antibióticos betalactámicos bactericidas que tienen un espectro de actividad extremadamente amplio), con elevada mortalidad y, por ende, afecta la salud de la población (Tacconelli et al., 2017; Fernández-Billón et al., 2023). La producción de metalo- β -lactamasas (MBLs) es uno de los principales mecanismos de resistencia debido a su capacidad de transferencia horizontal. Las MBLs pertenecen a la clase B de la clasificación de Ambler, y dentro del sistema de clasificación de Bush-Jacoby-

Medieros, se encuentran en el grupo 3, requieren iones de zinc para su actividad y son capaces de hidrolizar una amplia gama de antibióticos β -lactámicos, no solo las penicilinas y cefalosporinas, sino también los carbapenémicos (Radhika et al., 2022). Esta capacidad de hidrolizar prácticamente todos los β -lactámicos hace que las infecciones causadas por cepas de *P. aeruginosa* productoras de MBLs sean particularmente difíciles de tratar. Se ha descrito la presencia de varios tipos de MBLs en *Pseudomonas*, metalo- β -lactamasa codificada por el integrón Verona (VIM), imipenemasa (IMP), imipenemasa de Seúl (SIM), imipenemasa de Alemania (GIM), metalo- β -lactamasa de São Paulo (SPM), metalo- β -lactamasa de Nueva Delhi (NDM). De estos, VIM e IMP son los tipos más prevalentes y reportados a nivel mundial, asociándose con diferentes brotes (Nicolau y Oliver, 2010; Wang & Wang, 2020). Por tal motivo, el objetivo del presente trabajo fue aislar cepas de *P. aeruginosa* de muestras clínicas e identificar la presencia genes de resistencia a carbapenémicos (Metallo- β -lactamasas VIM e IMP).

Material y Métodos

Material biológico

Se incluyeron 50 cepas que presentan características morfológicas de *Pseudomonas aeruginosa*, aisladas de pacientes con infecciones asociadas a los cuidados de la salud, presentes en diferentes servicios y remitidos al departamento de Microbiología del Hospital General “Dr. Aquiles Calles Ramírez” de la Ciudad de Tepic, Nayarit, durante el periodo diciembre de 2022 a agosto de 2023. Los aislados provenían mayoritariamente de urocultivos, secreciones y aspirado bronquial. También se obtuvieron muestras de úlceras, líquido peritoneal, líquido pleural, tubo endometrial, líquido de diálisis y líquido cefalorraquídeo. Las cepas se mantuvieron en crio-conservación en caldo Luria Bertani (LB) con glicerol al 20 %, a -20 °C.

Identificación fenotípica y pruebas de sensibilidad a antibióticos

Las características del cultivo se estudiaron mediante el diagnóstico inicial de las colonias bacterianas en los medios de agar sangre, cetrimida y MacConkey.

Posteriormente, la identificación y susceptibilidad antimicrobiana de las cepas aisladas se realizó mediante el sistema automatizado VITEK 2 (BioMerieux, Francia), que es un sistema automatizado de identificación bacteriana y estudio de sensibilidad antimicrobiana. La identificación de las bacterias se realizó inoculando una suspensión de microorganismos en tarjetas con reactivos colorimétricos con determinados paneles de reacciones bioquímicas. La sensibilidad antimicrobiana se determinó en forma similar, utilizando tarjetas que contienen diluciones estandarizadas de distintos antibióticos correspondientes a los puntos de corte de sensibilidad establecidos por el Comité Nacional para Normas de Laboratorio Clínico (NCCLS, 2018). Se probaron los siguientes antibióticos: ceftazidima, cefepima, meropenem, piperacilina-tazobactam, imipenem, ciprofloxacina, levofloxacina, amikacina, gentamicina y tobramicina.

Extracción de DNA

Para la identificación molecular de las especies de *P. aeruginosa*, primero se realizó la extracción de DNA empleando el protocolo descrito anteriormente (Varela-Rodríguez, 2023). La calidad e integridad del DNA se analizó en gel de agarosa al 1.2 % teñido con bromuro de etidio y se determinó la concentración mediante espectrofotometría.

Identificación molecular de *P. aeruginosa*

Para este procedimiento se empleó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando la metodología propuesta por Benie et al. (2017). Para la identificación de *P. aeruginosa* se buscó la presencia del gen *rpoB* (producto de 759 bp). Además, se amplificó una región cromosomal correspondiente al rRNA 16S (producto de 956 bp), que se utilizó como control interno para mejorar la fiabilidad de la técnica (Spilker et al., 2004). Como control negativo se utilizó DNA de la bacteria *Escherichia coli*. La mezcla de PCR que se utilizó fue para un volumen final de 25 μ L, que contenía 10mM de buffer Tris-HCl, 2.0 mM de $MgCl_2$, 0.15 mM de dNTP's, 0.15 μ M de cada primer, 1 U de Taq polimerasa y 2.0 μ L del producto de extracción

de DNA (50 ng). Los oligonucleótidos específicos que se utilizaron se encuentran en la tabla 1. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador con las siguientes condiciones: ciclo inicial de 94 °C/3 min, 35 ciclos de amplificación (94 °C/1 min, 58 °C/1 min, 72 °C/2 min) y extensión final de 72 °C/7min. Los amplicones se corroboraron por un corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio (0.9 µL/30 mL agarosa) sometido a 100 voltios por 50 min. Posteriormente, el gel se visualizó en un transiluminador UV de sobremesa. El tamaño del amplicón se verificó con base en el marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder.

Identificación de genes IMP y VIM

Para determinar la presencia de estos genes se utilizaron las condiciones descritas por Poirel et al. (2011). La mezcla de PCR que se utilizó contenía 10mM de buffer Tris-HCl, 2 mM de MgCl₂, 0.15 mM de dNTP's, 15 µM de cada primer, 1 U de Taq DNA polimerasa y 2.0 µL del producto de la extracción de DNA (50 ng). Los oligonucleótidos específicos que se utilizaron se describen en la Tabla 1. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador con las siguientes condiciones: ciclo inicial de 94 °C/3 min, 35 ciclos de amplificación (94 °C/1 min, 58 °C/1 min, 72 °C/2 min) y extensión final de 72 °C/7min. Los amplicones fueron corroborados por un corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio (0.9 µL/30 ml agarosa) sometido a 100 voltios por 50 min. Posteriormente, el gel se visualizó en un transiluminador UV de sobremesa. El tamaño del amplicón se verificó con base en el marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder.

Identificación fenotípica de Metallo-β-lactamasas (MBLs)

Para la determinación fenotípica se empleó la prueba de sinergia de doble disco descrito por Arakawa et al. (2000), que se basa en la propiedad de inhibición de las MBLs por agentes quelantes de metales como el EDTA. Las placas se inocularon según las recomendaciones del NCCLS y los discos de EDTA, imipenem (IMP) y meropenem (MEM) se colocaron a una distancia de 15 mm, de centro a centro, entre los discos con antibiótico y el inhibidor. Las placas se incubaron a 37°C por

24 h. Posteriormente, se realizó la lectura e interpretación de la prueba. Se consideró como prueba positiva para la producción de MBLs cuando la zona de inhibición de los carbapenémicos (IMP o MEM) que contenían la solución de EDTA era al menos 5 mm mayor que la zona de los carbapenémicos sin esta solución.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en protocolos de PCR.

Gen diana	Tamaño de Amplicón	Secuencia (5´ to 3´)	Referencia
16S rRNA	956	Fw- GGGGGATCTTCGGACCTCA Rv- TCCTTAGAGTGCCCACCCG	Spilker et al., 2004.
rpoB	759	Fw- CAGTTCATGGACCAGAACAACCCG Rv- ACGCTGGTTGATGCAGGTGTTT	Benie et al., 2017.
bla_{IMP}	232	Fw- GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC Rv- GGTTTAAAYAAAACAACCACC	Poirel et al. 2011.
bla_{VIM}	390	Fw- GATGGTGTGGTGCATA Rv- CGAATGCGCAGCACCAG	Poirel et al., 2011.

Resultados y Discusión

Aislamiento de *P. aeruginosa*

Durante el periodo de diciembre de 2022 a agosto de 2023, se recolectaron 50 aislados de *P. aeruginosa*, aisladas de pacientes con infecciones en el Hospital General “Dr. Aquiles Calles Ramírez” en la ciudad de Tepic, Nayarit; los aislados provienen en su mayoría de urocultivos 17 (34 %), secreciones 11 (22 %) y aspirado bronquial 12 (24 %). También se obtuvieron muestras de úlceras 4 (8 %), líquido peritoneal 1 (2 %), tubo endotraqueal 2 (4 %), líquido pleural 1 (2 %), líquido de diálisis 1 (2 %) y líquido cefalorraquídeo 1 (2 %) (Figura 1).

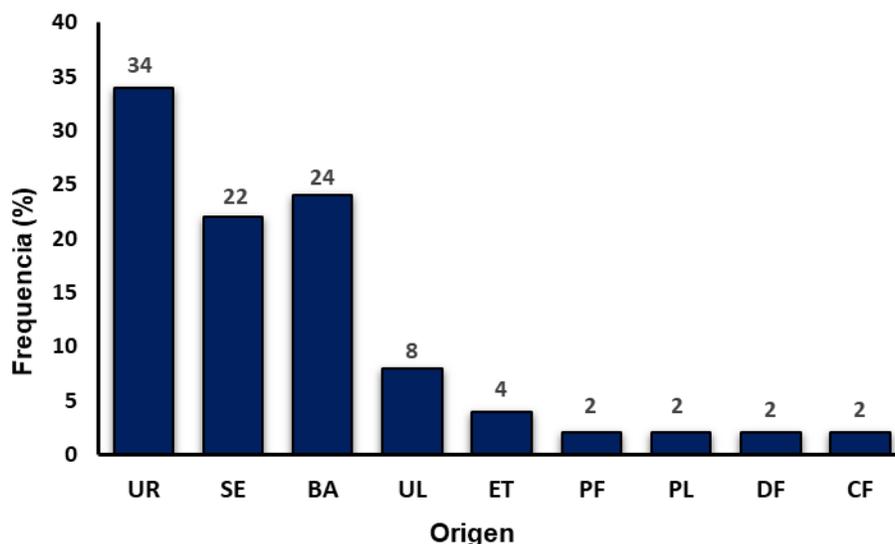


Figura 1. Origen de los aislados de *P. aeruginosa*. UR, cultivo de orina; SE, secreción; BA, aspirado bronquial; UL, úlcera; ET, tubo endotraqueal; PF, líquido peritoneal; PL, líquido pleural; DF, líquido de diálisis; CF, líquido cefalorraquídeo.

Los aislados se cultivaron en agar sangre, cetrimida y MacConkey a 37 °C en condiciones de aerobiosis por un lapso de 24 h. En agar MacConkey se observaron colonias irregulares, planas e incoloras, debido a que esta bacteria no tiene la capacidad de fermentar lactosa, incluso algunas presentaron pigmentación verde; también presentaron un olor muy característico a tortilla de maíz y al observarlas bajo el microscopio se visualizaron en forma de bacilos color rojo (Gram negativos). Por otro lado, en agar sangre se observaron colonias grises y con β -hemólisis, debido a la capacidad de lisar los eritrocitos; mientras que en agar cetrimida las colonias presentaron una pigmentación verde intensa (Figura 2). Los resultados coinciden con lo descrito por Tapia y Jaramillo (2023), los cuales mencionan que estas son algunas pruebas para identificar a esta bacteria; de igual forma, Radhika et al., (2022) también incluyeron estas pruebas en la identificación de sus aislamientos y las características obtenidas son iguales que los resultados del presente estudio.



Figura 2. Características morfológicas de *P. aeruginosa* en A. agar sangre, B. agar MacConkey y C. agar cetrimida.

Identificación fenotípica y resistencia a antibióticos

La identificación bacteriana y la susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos clínicos se realizó por medio del sistema automatizado VITEK 2, el cual es un sistema que usa paneles con pruebas bioquímicas para la identificación de la bacteria en donde se evalúan diferentes procesos metabólicos como acidificación, alcalinización, hidrólisis enzimáticas y desarrollo en presencia de sustancias inhibitoras; así como también, diferentes antibióticos para determinar la susceptibilidad antimicrobiana; el sistema indicó que todos los aislamientos pertenecen a *P. aeruginosa*. Estos resultados coinciden con lo reportado por Varela-Rodríguez et al., (2023) quienes utilizaron este sistema para la identificación de esta bacteria en 61 aislados.

Se analizaron los perfiles de resistencia y sensibilidad. Se identificó que la mayor cantidad de los aislamientos fueron resistentes a imipenem con un 82 %; en cambio, gentamicina, con el 48 %, fue el antibiótico con menor número de aislamientos resistentes. Por otro lado, la prevalencia más alta de aislamientos con sensibilidad fue a amikacina con el 46 % (Tabla 2). En el caso del imipenem se identificó una resistencia en el 82 % de los aislados, este resultado es similar al de Rada et al., (2021) quienes obtuvieron un porcentaje de resistencia del 84.8 %, también se

reportaron resultados similares por Estepa et al., (2015) con el 88 %, Martínez-Zavaleta et al., (2023) con el 89.1 % y Ali et al., (2023) del 100 %; en contraparte, otros estudios reportan una menor resistencia a imipenem a la obtenida, como el de Raouf et al., (2018) quienes reportaron una resistencia del 28.57 % y Radhika et al., (2022) del 20 %. Por otro lado, la amikacina presentó un porcentaje de sensibilidad del 46 %; Martínez-Zavaleta et al., (2023) reportaron un porcentaje del 44.3 % por lo que se puede evidenciar que los resultados son muy semejantes, a diferencia de Ali et al., (2023) quienes obtuvieron un menor porcentaje, ya que solo el 18.2 % fueron sensibles a este antibiótico. Cabe mencionar que la variación de los resultados reportados en la resistencia antimicrobiana probablemente se deba a que las bacterias han estado en contacto con otras del mismo género o diferente, pero con características muy parecidas, por medio de transferencia genética horizontal para adquirir la resistencia (Arbizú et al., 2019; Rada, et al., 2021).

Tabla 2. Resistencia de *P. aeruginosa* a los agentes antimicrobianos probados.

Antibiótico	Número de aislados resistentes	%
Ceftazidima	39	78
Cefepima	38	76
Meropenem	32	64
Amikacina	26	52
Gentamicina	24	48
Ciprofloxacino	34	68
Levofloxacino	34	68
Imipenem	41	82
Piperacilina-Tazobactam	36	72
Tobramicina	27	54

Se realizó la técnica de PCR con la finalidad de corroborar que estos aislamientos corresponden a *P. aeruginosa*. Se amplificó el gen *rpoB* que codifica para la subunidad β de la ARN polimerasa, es un gen altamente conservado, y una copia está presente en todas las bacterias debido a su papel esencial en el metabolismo celular (Ait Tayeb et al., 2005). El gen *rpoB* fue amplificado en los 50 aislados, lo que confirmó que el 100 % de las cepas corresponden a *P. aeruginosa*. El tamaño de los productos de amplificación obtenidos por PCR fueron idénticos a los predichos a partir de los cebadores *rpoB*, aproximadamente 759 bp (Figura 3). Los resultados obtenidos coinciden con lo reportado por Ali y Abdulrahman (2020), quienes utilizaron el gen *rpoB* en su estudio y confirmaron que todos sus aislamientos correspondían a *P. aeruginosa*. Este gen se puede utilizar para identificar esta bacteria a nivel de especie de forma confiable (Benie et al., 2017; Gaballa et al., 2021).

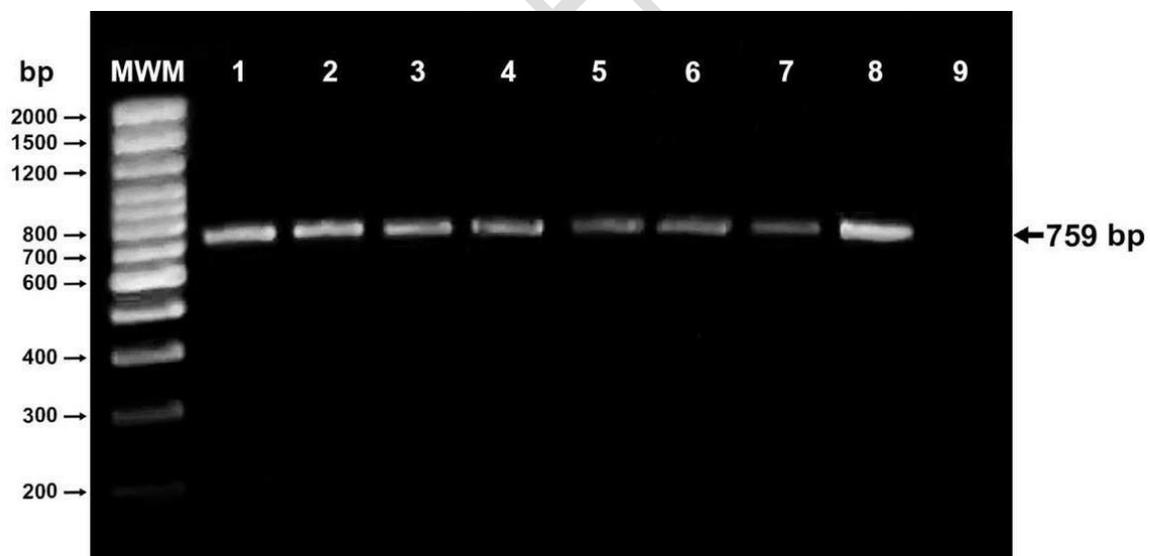


Figura 3. Identificación molecular del gen *rpoB* en aislados de *P. aeruginosa*. Los carriles 1 a 8 corresponden a aislados representativos; se observan amplicones de aproximadamente 759 bp en gel de agarosa al 1,5 %. Carril 9, control negativo de *Escherichia coli*. MWM, marcador de peso molecular.

Una vez corroborada la identidad de las cepas, se realizó la técnica de PCR para la búsqueda del gen *bla_{VIM}*, que amplifica un producto de 390 bp y el gen *bla_{IMP}* de 232 bp; estos genes codifican para las MBLs transferibles IMP y VIM. En el caso de VIM, se encontró que el 32 % (16/50) de las cepas de *P. aeruginosa* contienen el gen *bla_{VIM}* de enzimas tipo *Verona Integron-encoded Metallo-β-lactamase*, esto se evidenció por la presencia de productos de amplificación de aproximadamente 390 bp (Figura 4).

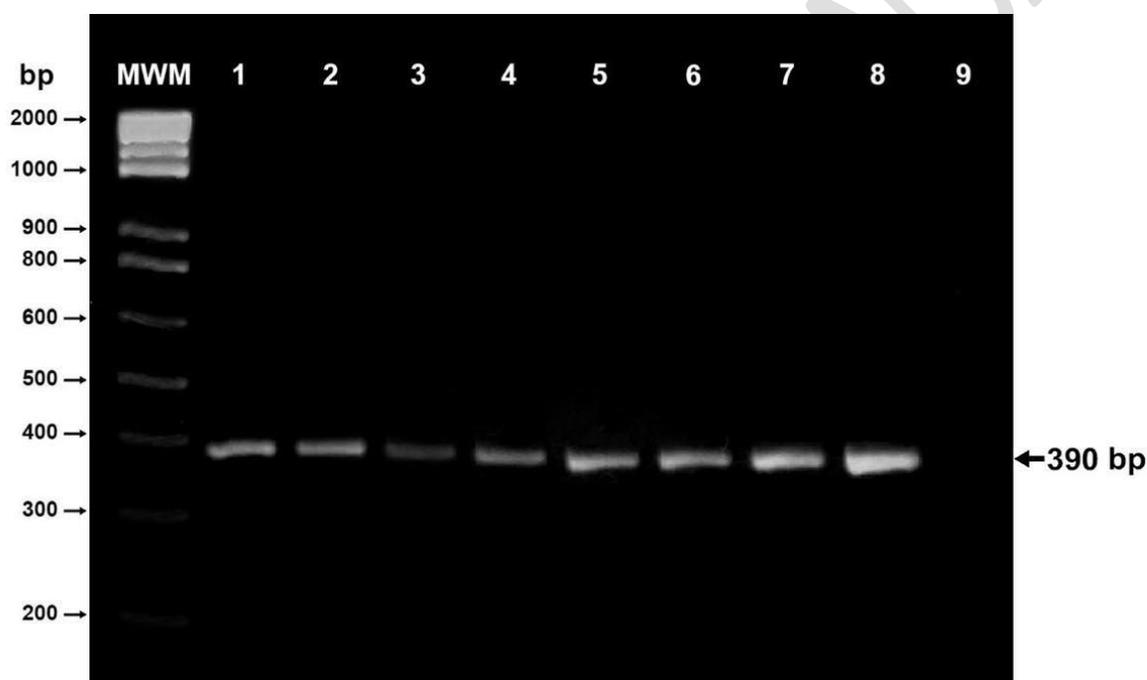


Figura 4. Amplificación por PCR del gen *bla_{VIM}* en aislados de *P. aeruginosa*. Los carriles 1 a 8 corresponden a aislados representativos; se observan amplicones de aproximadamente 390 bp en un gel de agarosa al 2 %. Carril 9, control negativo (agua estéril). MWM, marcador de peso molecular.

Los resultados obtenidos coinciden con lo reportado por Guerra-Sarmiento et al. (2021), realizaron una investigación en hospitales de Colombia durante los años 2012 a 2017 y reportaron que el gen *bla_{VIM}* se encontraba en un 32.8 % de los aislados. También son muy similares a los resultados obtenidos en Egipto, donde

reportaron la presencia de este gen en un 34 % de los aislados (Raouf et al., 2018). Por el contrario, los resultados obtenidos difieren con lo reportado por Martínez-Zavaleta et al., (2023) en un estudio realizado en un hospital de la Ciudad de México en el periodo de 2011 a 2018, donde obtuvieron que el gen *bla_{VIM}* se encontraba en el 59.6 % de las cepas y fue el gen encontrado con mayor frecuencia de las MBLs de clase B. Además, en otros países se ha reportado una prevalencia mayor en comparación con nuestros resultados, en Chile 47.5 % (Costa et al., 2021) en Nicaragua 68 % (Arbizú et al., 2019) y en Colombia 60 % en un estudio (Saavedra et al., 2014) y 47,8 % en otro estudio (Rada et al., 2021). Es importante destacar que la diferencia de los resultados puede deberse a diferentes factores, entre ellos, la distribución de las diferentes MBLs por países incluso entre regiones y hospitales del mismo país, así como también por la evolución que han presentado a lo largo del tiempo (Melgarejo-Touchet et al., 2021), ya que se han reportado nuevas variantes y genes combinados con otras clases de carbapenemasas; todo esto debido a que los genes de MBLs se transportan en elementos genéticos móviles tales como integrones, transposones o plásmidos lo que facilita su propagación (Arbizú et al., 2019; Costa et al., 2021; Harris et al., 2023; Kazmierczak et al., 2015; Rada et al., 2021; Remolina et al., 2021; Sawa et al., 2020).

En el caso de IMP, se encontró que el 90 % (45/50) de los aislados contienen el gen *bla_{IMP}* de enzimas tipo imipenemasas ya que se evidenció la presencia de productos de amplificación de aproximadamente 232 bp. Por su parte, en el 10 % (5/50) de los aislamientos no se observó la presencia de este gen (Figura 5). Los resultados obtenidos son muy similares a los reportados por Salvador-Luján et al. (2018) quienes realizaron un estudio en Perú en 2016, los cuales reportaron que el gen *bla_{IMP}* se encontró en el 95.8 % de los aislados. Por otro lado, Guajardo-Lara et al. (2021) llevaron a cabo una investigación en México, en el periodo de 2017 al 2018, donde encontraron que el 16% de los aislamientos eran de tipo IMP; de igual forma, Cho et al., (2015) reportaron en Corea que el gen *bla_{IMP}* se encontraba en el 36.1 % de los aislamientos y aunque existe una diferencia en los porcentajes en ambos

estudios con respecto a los resultados obtenidos, también fue el gen que predominó en las MBLs. En comparación, Martínez-Zavaleta et al., (2023) reportaron que el gen *bla_{IMP}* se encontraba en un 14.9% de cepas y aunque también se puede evidenciar una considerable diferencia en los porcentajes obtenidos, éstos reportaron que fue el segundo gen en incidencia después de VIM.

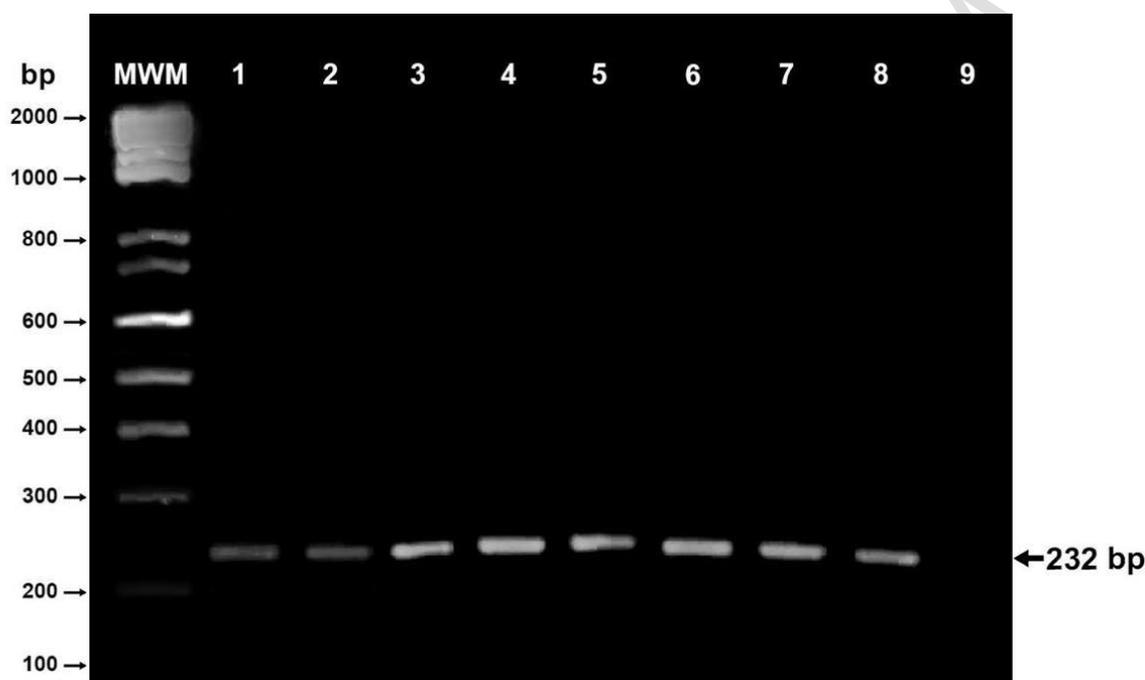


Figura 5. Amplificación por PCR del gen *bla_{IMP}* en aislados de *P. aeruginosa*. Los carriles 1 a 8 corresponden a aislados representativos; se observan amplicones de aproximadamente 232 bp en un gel de agarosa al 2 %. Carril 9, control negativo (agua estéril). MWM, marcador de peso molecular.

Posteriormente se realizó la prueba fenotípica para detectar la presencia de enzimas de tipo MBLs en *P. aeruginosa*; en esta investigación se utilizó la prueba de sinergia de doble disco, que se fundamenta en que las MBLs requieren como cofactor iones de zinc⁺⁺ que son atrapados por el agente quelante EDTA y en consecuencia inhibe la acción enzimática (Perozo et al., 2013; Salvador-Luján et al., 2018). Se realizó la prueba fenotípica a los 50 aislados de *P. aeruginosa*, se obtuvo

un resultado positivo en 44 aislamientos, ya que presentaron sinergia con el EDTA los carbapenémicos meropenem, imepenem, o ambos. La presencia de MBLs se observó en el 88 % de las cepas; mientras que en el 12 % (6/50) no se evidenció la sinergia (Figura 6). Cabe resaltar que los resultados obtenidos presentan una mayor incidencia de MBLs mediante el método de sinergia de doble disco en comparación con lo reportado en otros artículos, donde se reportó el 13.8 %, 12.9 %, 41 % y 31.6 %, respectivamente (Julca-García et al., 2020; Ophelie y Molin, 2016; Radhika et al., 2022; Salvador-Luján et al., 2018).

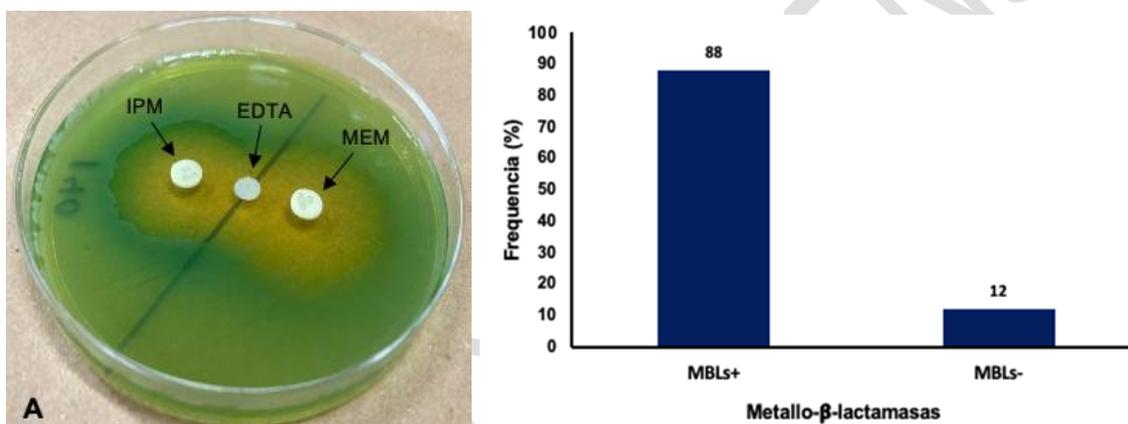


Figura 6. Identificación fenotípica de MBLs. A) Prueba de sinergia de doble disco, se observa sinergia de MEM e IMP hacia el EDTA, lo que confirma la presencia de enzimas MBLs. B) Porcentaje de aislados que presentan MBLs mediante la prueba de sinergia de doble disco.

Al realizar un análisis de los resultados, se comprobó que las enzimas MBLs se encuentran presentes en los aislados de *P. aeruginosa* y en este estudio la más frecuente fue la de tipo IMP seguida de VIM. Además, es fundamental mencionar que el 22 % (11/50) de los aislamientos clínicos presentaron ambos genes tanto *bla_{VIM}* como *bla_{IMP}*. En cambio el 6 % (3/50) de los aislamientos no contienen ningún gen en estudio, ya que se obtuvo un resultado negativo en la prueba genotípica por PCR, pero resultaron positivos por el método fenotípico. Como se mencionó anteriormente, existen otros genes que codifican para otras enzimas de tipo MBLs

en esta bacteria las cuales se encuentran distribuidas tanto en México como en otros países de América Latina y el mundo (Guajardo-Lara et al., 2021; Kazmierczak et al., 2015; Salvador-Luján et al., 2018; Tapia y Jaramillo, 2023; Tenover et al., 2022). Es importante seguir realizando pruebas para determinar la presencia de estas enzimas en esta bacteria, tanto fenotípica como genotípicamente. Debido a la alta resistencia a diferentes antibióticos que están adquiriendo las cepas de *P. aeruginosa*, es necesario el desarrollo de nuevas alternativas de tratamiento, así como la implementación de programas de vigilancia epidemiológica que regule el uso de antimicrobianos de amplio espectro.

Conclusiones

Los resultados nos indican que existe una gran variedad de aislados clínicos de *P. aeruginosa* portadores de MBLs de tipo *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}* o ambos, siendo el más frecuente *bla_{IMP}*. El diagnóstico temprano de *P. aeruginosa* productora de MBLs es crucial porque, al ser resistente a muchos antibióticos, la elección del tratamiento adecuado es fundamental para mejorar el pronóstico del paciente. Además, la detección temprana de estas cepas resistentes (tanto fenotípica como genotípicamente) ayuda a tomar medidas más específicas, como la implementación de políticas de control de infecciones hospitalarias, lo cual es clave en la prevención de brotes nosocomiales y prevenir una mayor diseminación de este patógeno resistente.

Contribución de los autores

Conceptualización del trabajo, ANRO, JLGA, CGR; desarrollo de la metodología, PERR, CGR; manejo de software, PERR, LCRR; validación experimental, PERR, ANRO, CGR; análisis de resultados, JLAG, LCRR, ANRO, CGR; Manejo de datos, PERR, LCRR, JLAG, CGR; escritura y preparación del manuscrito, PERR, ANRO, CGR; redacción, revisión y edición, ANRO, JLAG, CGR; administrador de proyectos, CGR; adquisición de fondos, CGR.

Todos los autores de este manuscrito han leído y aceptado la versión publicada del mismo.

Financiamiento

Esta investigación fue financiada por Patronato de la Universidad Autónoma de Nayarit, número de apoyo UAN-SIP-AC-PU23-02.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

REFERENCIAS

Ait Tayeb, L., Ageron, E., Grimont, F., & Grimont, P. A. (2005). Molecular phylogeny of the genus *Pseudomonas* based on *rpoB* sequences and application for the identification of isolates. *Research in Microbiology*, 156(5-6), 763-73. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.02.009>

Ali, F., Mirza, I. A., Waseem, H., & Zafar, H. (2023). Antibiotic sensitivity pattern of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Pakistan Armed Forces Medical Journal*, 73(1), 33–37. <https://doi.org/10.51253/pafmj.v73i1.6633>

Ali, M. D. Y., & Abdulrahman, Z. F. (2020). Molecular identification, susceptibility pattern, and detection of some virulence genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Plant Archives*, 20(1), 2573-2580. [http://www.plantarchives.org/SPECIAL%20ISSUE%2020-1/2573-2580%20\(399\).pdf](http://www.plantarchives.org/SPECIAL%20ISSUE%2020-1/2573-2580%20(399).pdf)

Arakawa, Y., Shibata, N., Shibayama, K., Kurokawa, H., Yagi, T., Fujiwara, H., & Goto, M. (2000). Convenient test for screening metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(1), 40-43. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.1.40-43.2000>

Arbizú-Medina, O., García-Rosales, K., Castillo-Gómez, B., Mejía-Álvares, A., & Salinas, A. (2019). Carbapenemase en *Pseudomonas aeruginosa* en los hospitales de Managua, Nicaragua. *Revista Torreón Universitario*, 8(21), 16–24. <https://doi.org/10.5377/torreon.v8i21.8851>

Benie, C. K., Dadié, A., Guessennd, N., N'gbesso-Kouadio, N. A., Kouame, N. D., N'golo, D. C., Aka, S., Dako, E., Dje, K. M., & Dosso, M. (2017). Characterization of virulence potential

of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from bovine meat, fresh fish, and smoked fish. *European Journal of Microbiology & Immunology* (Bp), 7(1), 55-64. <https://doi.org/10.1556/1886.2016.00039>

Bolívar-Vargas, A. F., Torres-Caycedo, M. I., & Sánchez-Neira, Y. (2021). Biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* como mecanismos de resistencia y tolerancia a antibióticos. Revisión narrativa. *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud Universidad del Cauca*, 23(2), 47-57. <https://doi.org/10.47373/rfcs.2021.v23.1780>

Cho, H. H., Kwon, G. C., Kim, S., & Koo, S. H. (2015). Distribution of *Pseudomonas*-derived cephalosporinase and metallo- β -lactamases in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Korea. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(7), 1154–1162. <https://doi.org/10.4014/jmb.1503.03065>

Costa, J. S. T. D., Lima, C. A., Vera-Leiva, A., San Martín Magdalena, I., Bello-Toledo, H., Domínguez Yévenes, M., Opazo-Capurro, A., Mella Montecinos, S., Quezada-Aguiluz, M., González-Rocha, G., & Grupo Colaborativo de Resistencia. (2021). Carbapenemasas en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos aisladas en hospitales de Chile. *Revista Chilena de Infectología*, 38(1), 81–87. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182021000100081>

Diggle, S. P., & Whiteley, M. (2020). Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology (Reading)*, 166(1), 30–33. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000860>

Fernández-Billón, M., Llambías-Cabot, A. E., Jordana-Lluch, E., Oliver, A., & Macià, M. D. (2023). Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Biofilm*, 5, 100129. <https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2023.100129>

Gaballa, A., Cheng, R. A., Trmcic, A., Kovac, J., Kent, D. J., Martin, N. H., & Wiedmann, M. (2021). Development of a database and standardized approach for rpoB sequence-based subtyping and identification of aerobic spore-forming Bacillales. *Journal of Microbiological Methods*, 191, Article 106350. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106350>

Guajardo-Lara, C. E., Hernández-Galván, N. N., Ayala-Gaytán, J. J., & Valdovinos-Chávez, S. B. (2021). Susceptibilidad a ceftolozano-tazobactam y ceftazidima-avibactam de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos. *Revista del Instituto de Salud Pública de Chile*, 5(1). <https://doi.org/10.34052/rispch.v1i1.108>

Guerra-Sarmiento, M., Ruíz-Martin-Leyes, F., Arzuza-Ortega, L., & Maestre-Serrano, R. (2021). Caracterización de bacilos gramnegativos multi-resistentes, aislados en pacientes hospitalizados en instituciones de salud de Barranquilla (Colombia). *Revista Chilena de Infectología*, 38(2), 189–196. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182021000200189>

Harris, M., Fasolino, T., Ivankovic, D., Davis, N. J., & Brownlee, N. (2023). Genetic factors that contribute to antibiotic resistance through intrinsic and acquired bacterial genes in urinary tract infections. *Microorganisms*, 11(6), 1407. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061407>

Julca-García, A., Zavaleta-Verde, D., Asmat-Marrufo, P., & Mercado-Martínez, P. (2020). Detección fenotípica de metalo- β -lactamasas en *Pseudomonas aeruginosa* Trujillo-Perú. *Revista Ciencia y Tecnología*, 16(4), 43-49. <https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/PGM/article/view/3135>

Kazmierczak, K. M., Rabine, S., Hackel, M., McLaughlin, R. E., Biedenbach, D. J., Bouchillon, S. K., Sahm, D. F., & Bradford, P. A. (2015). Multiyear, multinational survey of the incidence and global distribution of metallo- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(2), 1067–1078. <https://doi.org/10.1128/AAC.02379-15>

Liao, C., Huang, X., Wang, Q., Yao, D., & Lu, W. (2022). Virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* and antivirulence strategies to combat its drug resistance. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 926758. <https://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2022.926758>

Martínez-Zavaleta, M. G., Fernández-Rodríguez, D., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C. A., de Lourdes García-Hernández, M., Becerra-Lobato, N., Franco-Cendejas, R., & López-Jácome, L. E. (2023). Acquired bla_{VIM} and bla_{GES} carbapenemase-encoding genes in *Pseudomonas aeruginosa*: a seven-year survey highlighting an increasing epidemiological threat. *Pathogens*, 12(10), 1256. <https://doi.org/10.3390/pathogens12101256>

Melgarejo-Touchet, N., Brítez, C., Busignani, S., Falcón, M., López, E., Laconich, M., Blasco, R., Arguello, R., Kawabata, A., Olmedo, M., Rojas, C., González, M., Salinas, J., Abreu, K., Pereira, J., Mereles, E., & Martínez, M. (2021). Caracterización molecular de carbapenemasas en bacilos gramnegativos circulantes en hospitales de Paraguay. Primer cuatrimestre 2021. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 19(2), 49-58. <https://doi.org/10.18004/mem.iics/1812-9528/2021.019.02.49>

National Committee for Clinical Laboratory Standards [NCCLS]. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 11th ed. Approved standard M7-A 4. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa 2018. https://clsi.org/media/1928/m07ed11_sample.pdf

Nicolau, J., & Oliver, A. (2010). Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28: 19-28. [https://dx.doi.org/10.1016/S0213-005X\(10\)70004-5](https://dx.doi.org/10.1016/S0213-005X(10)70004-5)

Ophelie, C., & Molin Q. (2016). Detección fenotípica de carbapenemasas en *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes que acudieron al Hospital de Clínicas San Lorenzo de febrero a julio 2013. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 14(1), 25-31.

[https://doi.org/10.18004/Mem.iics/1812-9528/2016.014\(01\)25-031](https://doi.org/10.18004/Mem.iics/1812-9528/2016.014(01)25-031)

Perozo, A., Castellano, M., Chávez, T., Ling, E., & Arraiz, N. (2013). Evaluación de métodos fenotípicos para la detección de metalobetalactamasas en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. *Casmera*, 41(2), 115-126. <https://www.redalyc.org/pdf/3730/373061993007.pdf>

Poirel, L., Walsh, T. R., Cuvillier, V., & Nordmann, P. (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, 70(1), 119-123.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002>

Rada, A. M., De La Cadena, E., Agudelo, C. A., Pallares, C., Restrepo, E., Correa, A., Villegas, M. V., & Capataz, C. (2021). Genetic diversity of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates carrying *bla_{VIM-2}* and *bla_{KPC-2}* genes that spread on different genetic environment in Colombia. *Frontiers in Microbiology*, 12, Article 663020.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.663020>

Radhika, A., Lakshmi, J. T., Ariyanachi, K., & Sakthivadivel, V. (2022). Detection of metallo beta-lactamase (MBL) producing *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital, Ghanpur, Medchal, India. *Maedica*, 17(1), 134–142. <https://doi.org/10.26574/maedica.2022.17.1.134>

Raouf, M. R., Sayed, M., Rizk, H. A., & Hassuna, N. A. (2018). High incidence of MBL-mediated imipenem resistance among *Pseudomonas aeruginosa* from surgical site infections in Egypt. *Journal of Infection in Developing Countries*, 12(7), 520–525. <https://doi.org/10.3855/jidc.9936>

Remolina G, S. A., Conde M, C. E., Escobar C, J. C., Leal C, A. L., Bravo O, J. S., Saavedra R, S. Y., Rosa N, Z. R., Sánchez F, N., Santana G, A. Y., Cortés C, S., Acosta R, E., Quintero B, L. A., López C, M. D. P., & Saavedra T, C. H. (2021). Tipos de carbapenemasas expresadas en *Klebsiella* spp., y *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos en seis hospitales de alta complejidad de la Ciudad de Bogotá - Colombia. *Revista Chilena de Infectología*, 38(5), 720–723.

<https://doi.org/10.4067/s0716-10182021000500720>

Saavedra, S. Y., Duarte, C., González, M. N., & Realpe, M. E. (2014). Caracterización de aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* productores de carbapenemasas de siete departamentos de Colombia. *Biomédica*, 34(Sup1), 217–23. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.1685>

Salvador-Luján, G., García-de-la-Guarda, R., & Gonzales-Escalante, E. (2018). Caracterización de metalo- β -lactamasas en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* recuperados de pacientes

hospitalizados en el Hospital Militar Central. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 35(4), 636-641. <http://dx.doi.org/10.17843/rpmesp.2018.354.3755>

Sawa, T., Kooguchi, K., & Moriyama, K. (2020). Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *Journal of Intensive Care*, 8(13), 1-13. <https://doi.org/10.1186/s40560-020-0429-6>

Solórzano, J. W. P., & Parrales, V. E. P. (2021). *Pseudomonas aeruginosa* y su evolución de resistencia a los antibióticos en un hospital de segundo nivel en Portoviejo, Ecuador. *QhaliKay, Revista de Ciencias de la Salud*, 5(2), 50-56. <https://doi.org/10.33936/qkracs.v5i2.3002>

Spilker, T., Coenye, T., Vandamme, P., & LiPuma, J. J. (2004). PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(5), 2074-2079. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.5.2074-2079.2004>

Tacconelli, E., Magrini, N., Carmeli, Y., Harbarth, S., Kahlmeter, G., & Kluytmans, J. (2017). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. World Health Organization. <https://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>

Tapia, P. E. J., & Jaramillo R. E. K. (2023). Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* before and during the covid-19 pandemic, a review in Latin America. *Salud, Ciencia y Tecnología*, 3, 477. <https://doi.org/10.56294/saludcyt2023477>

Tenover, F. C., Nicolau, D. P., & Gill, C. M. (2022). Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* -an emerging challenge. *Emerging Microbes & Infections*, 11(1), 811-814. <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2048972>

Varela-Rodríguez, E. N., Arvizu-Gómez, J. L., Martínez-Rizo, A. B., & González-Reyes, C. (2023). Molecular identification of *Pseudomonas aeruginosa* and antibiotic resistance testing. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 24(2), 308-316. <https://doi.org/10.30574/gscbps.2023.24.2.0335>

Wang, W., & Wang, X. (2020). Prevalence of metallo- β -lactamase genes among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from various clinical samples in China. *Journal of Laboratory Medicine*, 44(4), 197-203. <https://doi.org/10.1515/labmed-2019-0162>