

1. TÍTULO: CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE CARBAPENEMASAS DE *ESCHERICHIA COLI* PROVENIENTES DE PACIENTES COVID-19 EN EL HOSPITAL NACIONAL HIPÓLITO UNANUE DURANTE EL 2021

AUTORES Y LINEA DE INVESTIGACIÓN:

- MSc. Maribel Denise Riveros Ramirez (**Responsable, docente ordinario**)

<https://orcid.org/0000-0002-5347-3261>

Línea de investigación: Resistencia Antimicrobiana en bacterias Gram negativas

- Yupanqui Siccha, Gisela Francisca (**Miembro, docente nombrado**)

<https://orcid.org/0000-0003-3950-3943>

Línea de investigación: Microbiología

- Joaquim Ruiz (**Colaborador externo**)

<https://orcid.org/0000-0002-4431-2036>

Línea de investigación: Genética Microbiana

- Alonso Soto Tarazona (**Colaborador externo**)

- <https://orcid.org/0000-0001-8648-8032>

- **Línea de investigación:** Infectología

- López Briceño, Marcela Sofía (**Colaboradora, estudiante**)

- <https://orcid.org/0000-0001-9163-6239>

Línea de investigación: Resistencia Antimicrobiana

2. Resumen:

La enfermedad denominada Coronavirus 2019 (COVID-19) causada por el Síndrome respiratorio agudo severo Coronavirus 2019 (SARS-CoV-2) ha sido considerada como una neumonía de rápida propagación en especial por la patogenicidad de su agente etiológico. Sumado a este escenario, la resistencia antimicrobiana a drogas como carbapenémicos y el fenómeno de coinfección microbiana con bacterias como *Escherichia coli*, empeora el pronóstico de muchos pacientes. Por lo expuesto, el presente estudio plantea el objetivo de caracterizar los aislamientos de *Escherichia coli* que albergan genes de Carbapenemasas provenientes de pacientes con COVID-19 en el Hospital Nacional Hipólito Unanue durante el 2021 en Lima, Perú considerando que no existen reportes en nuestro medio. Para lo cual se recolectaron los aislamientos de *Escherichia coli* resistentes a Carbapenems en pacientes COVID-19 del Hospital Nacional Hipólito Unanue (HNHU) desde el mes de marzo del 2021 hasta el mes de junio del 2022. Para evaluar la resistencia antimicrobiana se tamizaron 12 drogas por el método de Kirby Bauer, mientras que los aislamientos con resistencia a Carbapenémicos fueron evaluados fenotípicamente mediante el método de aproximación de discos y genotípicamente mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) a los genes *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{IMI}*, *bla_{GES}* y *bla_{oxa-48}*. Como resultado se obtuvo 3 aislamientos de *Escherichia coli* provenientes de pacientes COVID-19 albergando genes de carbapenemasas tipo NDM y KPC. La susceptibilidad antimicrobiana fue elevada, teniendo índices altos de resistencia a ampicilina y ciprofloxacino. En conclusión, se demuestra la presencia de carbapenemasas en *Escherichia coli* provenientes de pacientes COVID-19, por lo tanto, es importante considerar que la coinfección microbiana es un factor no despreciable en COVID-19.

Palabras claves: COVID-19, resistencia antimicrobiana, *Escherichia coli*, carbapenemasas.

Abstract:

The disease called Coronavirus 2019 (COVID-19) caused by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2019 (SARS-CoV-2) has been considered a rapidly spreading pneumonia, especially due to the pathogenicity of its etiological agent. Added to this scenario, antimicrobial resistance to drugs such as carbapenems and the phenomenon of microbial coinfection with bacteria such as *Escherichia coli*, worsened the prognosis of many patients. For these reasons, the present study sets out the objective of characterizing *Escherichia coli* isolates that harbor Carbapenemase genes from patients with COVID-19 at the Hipólito Unanue National Hospital during 2021 in Lima, Peru considering that there are no reports. For which *Escherichia coli* isolates resistant to Carbapenems were collected from COVID patients at the Hipólito Unanue National Hospital (HNHU) from March 2021 to June 2022. Antimicrobial resistance against 12 drugs was evaluated by the Kirby Bauer method, while the isolates with resistance to Carbapenems were phenotypically evaluated by the disk approximation method and genotypically by the conventional Polymerase Chain Reaction (PCR) to the genes *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{IMI}, *bla*_{GES} y *bla*_{oxa-48}. As a result, 3 *Escherichia coli* isolates from COVID 19 patients harboring NDM and KPC type carbapenemase genes were obtained. Antimicrobial susceptibility was high, with high rates of resistance to ampicillin and ciprofloxacin. In conclusion, the presence of carbapenemases in *Escherichia coli* from COVID-19 patients is demonstrated, therefore, it is important to consider that microbial coinfection is a non-negligible factor in COVID-19.

Keywords: COVID-19, antimicrobial resistance, *Escherichia coli*, carbapenemases.

3. Introducción

3.1 Planteamiento del Problema

La OMS ratifica en considerar a RAM como una de las 10 principales amenazas de salud pública a las que enfrenta la humanidad (Aggarwal et al., 2012). Antes de la pandemia el primer ministro de Canadá ya había reportado que, si este fenómeno continuaba, para el año 2050 las cifras podrían ser alarmantes y podrían superar las tasas de mortalidad causadas por enfermedades como cáncer o diabetes además del efecto económico que este fenómeno conlleva (O'Neill, 2016). Tras 7 años de este reporte, un nuevo análisis mundial se ha realizado a cargo del Instituto de Métricas y Evaluación de la Salud de la Universidad de Washington, quienes han reportado que más de 1,2 millones de personas han fallecido como consecuencia de infecciones causadas por patógenos resistentes a los antibióticos a nivel

mundial durante el 2019, estas cifras equivalen a la muerte de 3500 personas por día, superando las cifras de VIH y Malaria (Murray et al., 2022).

El problema se ve agravado debido al uso indiscriminado de antimicrobianos, generando patógenos farmacorresistentes. En la capital de nuestro país, un estudio realizado en el Hospital Cayetano Heredia reportó que el 80.3% (106/132) de pacientes hospitalizados con diagnóstico de COVID-19 habían consumido antibióticos antes de su hospitalización y que el antibiótico más prescrito fue la azitromicina (62.2%) (Zavala-Flores & Salcedo-Matienzo, 2020).

La falta de agua y saneamiento, sumado a falta de prevención y control de las infecciones han permitido una rápida aparición y diseminación de enterobacterias resistentes a carbapenémicos (CRE, por sus siglas en inglés, carbapenem-resistant Enterobacteriaceae) (Tilahun et al., 2021). Particularmente, *E. coli* es una especie bacteriana con una gran capacidad para coleccionar genes de resistencia y transferirlos a su vez, a través de la transferencia horizontal de genes, asegurando la diseminación de la RAM (Poirel L, et al, 2018). En nuestro país circulan todas las clases de carbapenemasas, sin embargo, son pocos los centros de salud que realizan los análisis fenotípicos y genotípicos. La evidencia científica y reportes genotípicos de carbapenemasas, por lo tanto, son insuficientes (Angles-Yanqui et al., 2020). El presente estudio plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Los aislamientos de *Escherichia coli* provenientes de pacientes con COVID-19 en el Hospital Nacional Hipólito Unanue durante el 2021 albergan genes de Carbapenemasas?

3.2 Antecedentes

Desde el 2019, el mundo se ha visto afectado por la presencia del virus SARS COV-2 que causa el Síndrome Respiratorio Agudo Severo, esta enfermedad conocida como COVID-19 ha incrementado las estadísticas de morbilidad y mortalidad de manera asombrosa (Chilamakuri & Agarwal, 2021). Actualmente este escenario se ha complicado debido a la aparición de coinfecciones con virus, hongos y/o bacterias (Lansbury et al., 2020). En una revisión sistemática y metaanálisis reciente, se revisaron 6639 artículos concluyendo que 19% de los pacientes con COVID-19 albergaban una coinfección al momento del diagnóstico y 24% albergaban un patógeno durante el tratamiento por COVID-19, conocido como superinfección (Musuuza et al., 2021). Existe evidencia que las coinfecciones bacterianas

son las más frecuentes (Mahmoudi, 2020) y que además presentan resistencia a los antibióticos (Hyacinth O. Ukuhor, 2020). Esta situación, junto al uso indiscriminado de antimicrobianos, ha provocado que la resistencia antimicrobiana vaya en aumento durante esta pandemia (Lai et al., 2021).

Entre los antibióticos más utilizados en pacientes críticos se encuentran los carbapenémicos, un betalactámico de amplio espectro que se ha visto afectado por la presencia de enzimas bacterianas denominadas carbapenemasas que se reportan con frecuencia en Enterobacterias (Tompkins & van Duin, 2021) y que poseen altas tasas de morbimortalidad en pacientes por la limitación de tratamiento (Queenan & Bush, 2007). En nuestro país, en el año 2013, se reportó el primer caso de una cepa de *Klebsiella pneumoniae* albergando un gen de *bla*_{KPC-2} proveniente de un hemocultivo en el hospital Nacional Arzobispo Loayza (Velásquez, et al. 2013). Desde entonces se ha reportado la presencia de genes de resistencia a carbapenémicos, por ejemplo un estudio del Instituto Nacional de Salud (INS) describió la presencia de genes de resistencia a carbapenémicos en enterobacterias aisladas de 12 hospitales del 2013 al 2017, identificando 83 aislamientos portadores de carbapenemasas, 31.3% (26/83) albergando el gen *bla*_{KPC-2}, 67.5% (56/83) *bla*_{NDM} y 1.2 % (1/83) *bla*_{IMP} (Sacsquispe-Contreras & Bailón-Calderón, 2018). En el 2019, el INS realizó un nuevo estudio en 30 Instituciones Prestadoras de servicios en salud ubicadas en 12 regiones del Perú durante los meses de enero a diciembre, identificando fenotípicamente y genotípicamente las carbapenemasas en 185 aislamientos, en su mayoría enterobacterias, con genes como *bla*_{KPC-2}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA}, sugiriendo la importancia de la vigilancia epidemiológica en nuestro país (Mayta-Barrios et al., 2021).

Finalmente, durante el 2020 se realizó una cohorte prospectiva en el Hospital Nacional Hipólito Unanue, se evaluó la frecuencia de patógenos respiratorios virales y bacterianos en muestras de esputo de pacientes hospitalizados por COVID-19. De septiembre a diciembre se colectaron 93 muestras de esputo las cuales fueron evaluadas por un panel respiratorio molecular Biofire Filmarray Pneumonia plus®. Se evidenció la coinfección con bacterias como de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Haemophilus influenzae*, *K. pneumoniae* y *E. coli* en tasas 11,8% (11/91), 10,7% (10/ 91), 10,7% (10/ 91), 8% (8/91) y 6.5% (6/91) respectivamente y reportando genes de resistencia como *mecA/C*, *MREJ*, *CTX-*

M, NDM, IMP, OXA-48, KPC y VIM (Soto et al., 2021). Lamentablemente el método no permitió identificar a qué bacterias pertenecían estos genes.

3.4 Justificación e Importancia

Desde antes de la pandemia, la Organización Mundial de la Salud (OMS) venía ejecutando un plan mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos, en dicho plan se han establecido 5 objetivos. Nuestro estudio estuvo enfocado en el objetivo 2 que plantea “fortalecer los conocimientos y la base científica a través de la vigilancia y la investigación para contrarrestar la crisis a causa de la generación de nuevas bacterias potencialmente resistentes a los fármacos y su diseminación” (Organization., 2017). Así mismo, la OMS elaboro una lista de patógenos que requieren investigación y desarrollo de nuevos fármacos, entre ellos se encuentra *E. coli* resistente a los antibióticos carbapenémicos (Roque-Borda et al., 2021) que consideramos en nuestro estudio.

En nuestro país, en el marco del Decreto Supremo N°010-2019-SA, se aprobó el Plan Multisectorial para enfrentar la Resistencia a los antimicrobianos y se creó la Comisión Multisectorial de Naturaleza Permanente con la finalidad de disminuir el riesgo sanitario que implica la resistencia a los antimicrobianos en nuestro país (Ministerio de salud del Perú, 2019), nuestra investigación genera evidencia científica que aporta con la comisión.

Un paciente infectado con una bacteria resistente requiere estancias prolongadas y esta propenso a que la enfermedad se complique y desencadene la muerte (Founou et al., 2017), nuestro estudio genera identificación fenotípica y sobre todo genotípica con la que no cuenta el Hospital Nacional Hipólito Unanue, además de consolidar la relación interinstitucional entre la academia y el hospital por el bien de los pacientes.

Considerando que estas bacterias pueden ser diseminadas a otros pacientes asegurando así su acervo genético, entonces ha sido importante reportar los linajes genéticos que circulan en los ambientes hospitalarios mediante una vigilancia epidemiología que contrarresten este problema mundial. Finalmente es importante reconocer que este proyecto ha fortalecido el papel de la academia para contener la resistencia antimicrobiana.

Limitación del Estudio y Solución Propuesta

El estudio se propuso originalmente para ser desarrollado sobre muestras colectadas entre Julio a noviembre de 2022. No obstante, en ese periodo no se colectaron cepas que cumplieren los requisitos de inclusión, por lo que se decidió abrir las fechas y analizar cepas colectadas hasta máximo un año antes (2021).

3.5 Marco Teórico

COVID-19

El síndrome respiratorio agudo severo coronavirus-2 (SARS-CoV-2) produce la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19). SARS-CoV-2 forma parte de los Coronavirus pertenecientes a la orden nidovirales, familia coronaviridae, subfamilia orthocoronavirinae, y se subdivide en cuatro géneros, alphacoronavirus, betacoronavirus, gammacoronavirus y deltacoronavirus (Woo et al., 2010), se caracterizan por ser virus envueltos que contienen un genoma de ARN monocatenario positivo y en su superficie presenta proteínas a manera de espiga, que le dan su apariencia característica de corona (Cai et al., 2020). La Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró a la COVID-19 como pandemia por presentar un impacto significativo tanto en el ámbito social, económico y sanitario a nivel global. Esta zoonosis desconocida y sin precedentes ha generado 446 millones de casos confirmados y más de seis millones de muertes en casi 224 países (OMS, 2022).

Escherichia coli

Es una bacteria Gram negativa anaeróbica facultativa en forma de bacilo corto y que forma parte de la microbiota del intestino grueso de los seres humanos y otros mamíferos (Nataro & Kaper, 1998). Aunque *E. coli* usualmente permanece en el lumen intestinal sin perjudicar al hospedero, ciertas cepas de esta especie pueden causar un amplio espectro de enfermedades intestinales y extraintestinales en humanos y otros animales (Kaper y col., 2004). En base a las características clínicas y genéticas se ha clasificado a *E. coli* en tres grandes grupos: *E. coli* comensal, *E. coli* patogénica intestinal (entérica o diarreogénica) y *E. coli* patogénica extraintestinal (ExPEC) (Russo & Johnson, 2000).

Resistencia antimicrobiana (RAM)

Es el fenómeno por el cual los antimicrobianos se vuelven ineficaces contra bacterias, virus, hongos o parásitos, lo que conlleva a tener un tratamiento más complicado, desarrollando el riesgo de propagación y aparición de enfermedades junto con elevar las tasas de muerte de forma preocupante a nivel mundial (OMS, 2022). Desde el punto de los microorganismos como las bacterias, la RAM es producto de una combinación de mecanismos moleculares, como por ejemplo la disminución de la permeabilidad del antibiótico a través de la membrana externa debido a la disminución en la expresión de porinas; aumento de la expulsión del antibiótico mediada por la activación de las bombas de eflujo; modificación o mutación del sitio blanco del antibiótico; así como la modificación y desactivación del antibiótico por hidrólisis mediada por enzimas (Gamboa, 2013). Este último mecanismo ha ido en aumento y es reportado como la producción de enzimas de tipo β -lactamasas, enzimas periplásmicas que hidrolizan los antibióticos β -lactámicos como los carbapenémicos y evitan que la droga pueda cumplir su función (Moreno, 2013). Las β -lactamasas que con mayor frecuencia pueden llevar a resistencia a los carbapenémicos son las carbapenemasas (Suárez et al., 2006).

Carbapenemasas

Son β -lactamasas que caracterizan por degradar el anillo betalactámico de las betalactamasas. Los genes que codifican estas enzimas pueden encontrarse en el cromosoma o en plásmidos (Pena, 2016). Las carbapenemasas representan la familia más versátil de las β -lactamasas, aunque se conocen como “carbapenemasas”, la mayoría de estas enzimas tienen la capacidad de hidrolizar tanto a los carbapenémicos como a otros β -lactámicos. Además, presentan la característica de ser resistentes contra la acción de los inhibidores de β -lactamasas disponibles (Fresnadillo et al., 2010). Se ha propuesto una clasificación en tres grupos: serin carbapenemasas, que pertenecen a la clase molecular A; metalo- β -lactamasas, que corresponden a la clase B y denominadas así por la dependencia de metales como el zinc para su funcionamiento; y oxacilinasas, dentro de la clase D, donde se agrupan las carbapenemasas tipo OXA (principalmente OXA-48 y variantes en la familia Enterobacteriaceae). Estos grupos difieren en su mecanismo de hidrólisis, el modo de transferencia y la acción de los inhibidores (Suarez et al., 2006). Las serin-carbapenemasas de la clase A, se pueden dividir en cinco grupos principales en base a su filogenética: GES (Guiana extended-spectrum), KPC

(*K. pneumoniae* carbapenemase), SME (*Serratia marcescens* enzyme), IMI (imipenem-resistant) y NMC-A (nonmetallo-carbapenemase-A). Mientras que las Metalobetalactamas o del grupo B engloban, entre otras las enzimas IMP (active on imipenem), NDM (New Delhi metallo-beta-lactamase) o VIM (Verona integron-encoded metallo- β -lactamase).

3.6 Objetivos

Objetivo general:

- Identificar y caracterizar genóticamente las carbapenemasas de *Escherichia coli* provenientes de pacientes COVID-19 en el Hospital Nacional Hipólito Unanue del 2021

Objetivos específicos:

- Identificar microbiológicamente los aislamientos de *Escherichia coli* provenientes de pacientes COVID-19.
- Identificar fenotípicamente las carbapenemasas en aislamientos de *Escherichia coli* provenientes de pacientes COVID-19.
- Caracterizar genóticamente las carbapenemasas de *Escherichia coli* provenientes de pacientes COVID-19 mediante PCR.

4 Método

4.4 Ámbito espacial y temporal de estudio

Los aislamientos bacterianos fueron colectados en el laboratorio de microbiología del Hospital Nacional Hipólito Unanue durante el 2021, adicionalmente se colectaron los datos del aislamiento en una ficha de recolección de datos del aislamiento, donde se incluyó un código interno, no teniendo acceso a los datos del paciente. A continuación, todos los aislamientos fueron transportados al laboratorio de Microbiología e inmunología de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática (FCNM) para su criopreservación, identificación microbiológica y susceptibilidad antimicrobiana. Para los análisis genéticos se transportaron al Laboratorio de Microbiología Molecular y Genómica Bacteriana de la universidad Científica de Sur (UCSUR).

4.5 Diseño del estudio, unidad de análisis universo y muestra de estudio

Nuestro estudio fue cuantitativo, descriptivo, prospectivo de corte transversal. Se estudiaron todos los aislamientos de *Escherichia coli* resistentes a carbapenemes provenientes de pacientes con COVID-19 (confirmado o sospechoso) procesados en el laboratorio de microbiología del Hospital Nacional Hipólito Unanue durante el 2021.

4.5.1 Criterios de inclusión y exclusión

Los criterios de inclusión:

- Aislamientos identificados microbiológicamente como *Escherichia coli* resistentes a carbapenemes provenientes de pacientes de todas las edades con diagnóstico de COVID-19.

Los criterios de exclusión:

- Aislamientos de *Escherichia coli* provenientes de pacientes hospitalizados cuyo diagnóstico de laboratorio fuese *Escherichia coli* sin resistencia a carbapenemes.

4.6 Instrumentos y Procedimiento

Identificación microbiológica

Se recolectaron los aislamientos en el Laboratorio de microbiología del Hospital Nacional Hipólito Unanue (HNHU) haciendo uso de un medio de cultivo denominado peptona. Estas peptonas conteniendo el aislamiento fueron llevadas al Laboratorio de Microbiología de FCNM, para confirmar su perfil microbiológico mediante cultivos convencionales y pruebas bioquímicas (MacFaddin, 2003).

Susceptibilidad antimicrobiana

La prueba de sensibilidad a los antimicrobianos se desarrolló por el método de disco Kirby Bauer de acuerdo con la guía M-100 del CLSI (por sus siglas en inglés, The Clinical and Laboratory Standards Institute) (Weinstein, M. P., & Lewis, 2018). Se evaluó la resistencia a 12 antibióticos: ampicilina (AMP, 10µg), trimetoprima/sulfametoxazol o sulfatrimetoprima

(STX, 10µg), cloranfenicol (CLO, 30µg), gentamicina (GEN, 10µg), ciprofloxacina (CIP, 10µg), ácido nalidíxico (NAL, 10µg), nitrofurantoina (NIT, 30µg), cefotaxima (CTX, 30µg), amoxicilina-ácido clavulánico (AMC, 30µg), imipenem (IMI, 30µg), meropenem (MER, 5µg). Todos los aislamientos fueron incubados a 37 °C por 18 horas. Luego, se midieron los diámetros de las zonas de inhibición usando una regla o calibrador.

Confirmación fenotípica de carbapenemasas en aislamientos de *E. coli*

Los aislados con resistencia a los carbapenémicos como imipenem y meropenem fueron evaluados para la confirmación fenotípica de carbapenemasas mediante la prueba fenotípica de acercamiento de discos (Tsai et al., 2020). Todos los procedimientos contaron con los controles de calidad y el uso de cepas ATCC.

Caracterización genotípica de carbapenemasas en aislamientos de *E. coli*

La extracción de ADN se realizó según el método de “shock térmico” (Guion et al., 2008). La amplificación de los genes se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para identificar los genes *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{IMI}*, *bla_{GES}* y *bla_{oxa-48}* (Tabla 1). Los controles positivos fueron provenientes del criobanco del Laboratorio de Microbiología Molecular y Genómica Bacteriana de la universidad Científica de Sur (UCSUR). Para la amplificación del material genético, se usó el Termociclador Veriti® 96 Well (Applied Biosystems). Las condiciones de ciclaje de todos los genes fueron denaturación inicial 94°C por 5 min, denaturación 94°C por 30 segundos, hibridación 57°C por 30 segundos, extensión 72°C por 1 minuto y extensión final 72°C por 7 minutos, 35 ciclos

Los productos obtenidos fueron cargados en un gel de agarosa al 1.5%, teñidos con Sybr Safe, a 80 voltios por 90 minutos y sometidos a la técnica de electroforesis. Finalmente, para estimar el tamaño de las bandas obtenidas se utilizó un marcador de peso molecular con rango de 100-1000 pares de bases (pb). Transcurrido el proceso de electroforesis, el gel de agarosa fue llevado a un transiluminador Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ (BIO-RAD), para visualizar el bandeo.

Tabla 1. Secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación de genes de carbapenemasas.

Gen		Secuencia (5'→ 3')	Tamaño (pb)	Referencia	
<i>bla_{GES}</i>	F	CTG GCA GGG ATC GCT CAC TC	600	(Bogaerts et al., 2013)	
	R	TTC CGA TCA GCC ACC TCT CA			
<i>bla_{OXA-48}</i>	F	ATG CGT GTA TTA GCC TTA TCG	265		
	R	CAT CCT TAA CCA CGC CCA AAT C			
<i>bla_{KPC}</i>	F	TCG CCG TCT AGT TCT GCT GTC TTG	353		
	R	ACA GCT CCG CCA CCG TCA T			
<i>bla_{VIM}</i>	F	TGT CCG TGA TGG TGA TGA GT	437		
	R	ATT CAG CCA GAT CGG CAT C			
<i>bla_{IMP}</i>	F	ACA YGG YTT RGT DGT KCT TG	387		
	R	GGT TTA AYA AAR CAA CCA CC			
<i>bla_{NDM}</i>	F	ACT TGG CCT TGC TGT CCT T	603		
	R	CAT TAG CCG CTG CAT TGA T			
<i>bla_{IMI}</i>	F	CTA CGC TTT AGA CAC TGG C	482		(Mlynarcik et al., 2016)
	R	AGG TTT CCT TTT CAC GCT CA			

Donde: F: cebador forward; R: cebador reverse; pb: pares de bases.

Análisis de datos

Toda la información de la ficha de recolección de datos fue almacenada en hojas de cálculo de Excel representando los resultados mediante tablas y gráficos de frecuencias. El análisis estadístico se realizó usando el paquete estadístico STATA versión 14.0 (STATA Corp LP, College station, TX, USA).

Aspectos éticos

El estudio cuenta el permiso a la oficina de investigación y docencia y el comité de ética con expediente N 22-022150-001 del Hospital Nacional Hipólito Unanue para la ejecución del proyecto.

5. Resultados

Aislamientos bacterianos

El laboratorio de microbiología del Hospital Nacional Hipólito Unanue (HNHU) nos entregó una lista de los aislamientos y su peptona (figura 1), estos fueron llevados al Laboratorio de Microbiología de la FCNM para confirmar su identificación microbiológica como *Escherichia coli*. Los aislamientos fueron colectados desde el mes de marzo del 2021 hasta el mes de junio del 2022 en el HNHU y se analizaron 33 aislamientos de *Escherichia coli* resistentes a carbapenemes, provenientes de muestras entre orina, secreciones bronquiales y heridas de los cuales el 21% (7/33) provenían de pacientes diagnosticados con COVID-19.



Figura 1. Media de cultivo peptona

Susceptibilidad Antimicrobiana

La evaluación de susceptibilidad a los antibióticos para todos los aislamientos de *E.coli* (n=33) mostraron que el 90% (27/30) fueron resistentes a imipenem, ninguno presento sensibilidad a este antibiótico (figura 2A). La resistencia a meropenem fue 90.9% (30/33) y solo 9,09% (3/33) eran intermedios (tabla 2). Los aislamientos confirmados fenotípicamente

como resistentes a imipenem y meropenem fueron sometidos a pruebas de caracterización fenotípica de enzimas carbapenemasas por combinación de discos (figura 2B).

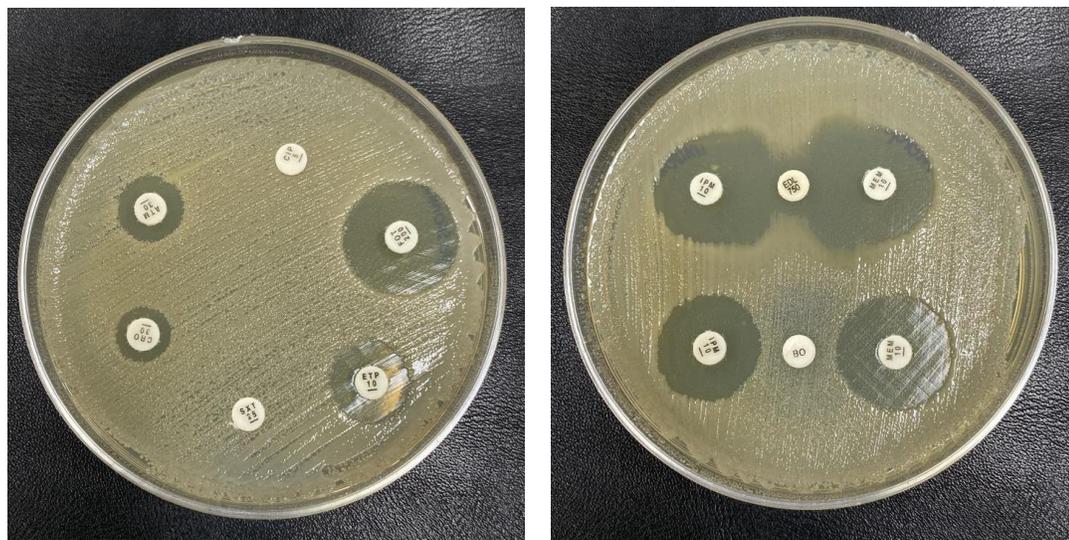


Figura 2. Resistencia antimicrobiana: A. Método de Kirby Bauer con resistencia antimicrobiana a antibióticos Carbapenémicos. B. Método de combinación de discos.

Tabla 2. Susceptibilidad Antibiótica de aislamientos de *Escherichia coli*

Antibiótico	Susceptibilidad antibiótica		
	Sensible % (n/N)	Intermedio % (n/N)	Resistente % (n/N)
Ampicilina	-	-	100 (31/31)
Cefotaxima	-	-	100 (16/16)

Amoxicilina-ácido clavulánico	-	-	100 (33/33)
Ácido nalidíxico	-	-	100 (2/2)
Imipenem	-	10(3/30)	90,0(27/30)
Meropenem	-	9,09(3/33)	90,9(30/33)
Ciprofloxacina	6,0% (2/33)	6 (2/33)	87,8 (29/33)
Trimetoprima/sulfametoxazol	21,2 (7/33)	-	78,7 (26/33)
cloranfenicol	53,3 (8/15)	-	46,6 (7/15)
Gentamicina	60,6 (27/33)	-	39,3 (13/33)
Nitrofurantoina	73,3(11/15)	-	15,3 (2/13)

Nota: Fuente propia.

Caracterización Genotípica de Carbapenemasas en *Escherichia coli*

Para la caracterización genotípica de los aislamientos de *E. coli* productoras de carbapenemasas, se realizó la amplificación por PCR de los genes anteriormente detallados a los aislamientos que presentaban resistencia a imipenem y meropenem. Para el gen *bla_{KPC}* se obtuvo el 6,06% (2/33) aislamientos positivos y para el gen *bla_{NDM}* fueron 69,6% (23/33) positivos. No se reportó la presencia de los genes *bla_{GES}*, *bla_{IMI}*, *bla_{IMP}*, *bla_{OXA-48}* o *bla_{VIM}* en ninguno de los aislamientos de *E. coli*.

Tabla 3. Descripción de los aislamientos de *E.coli* resistentes a carbapenems en el Hospital Nacional Hipólito Unanue del 2021

Código	Fecha de aislamiento	Enfermedad	Área	Tipo de muestra	Perfil resistencia a carbapenems		Carbapenemasas
					IMI	MER	
001	3/04/2021	COV	EME	orina	ND	ND	ND
002	29/05/2021	-	EME	orina	R	R	NDM
003	29/05/2021	-	MI	herida	R	R	NDM
004	21/06/2021	-	MI	bronquial	R	R	NDM
005	14/06/2021	COV	EME	orina	ND	ND	NDM
006	12/06/2021	COV	EME	bronquial	R	R	NDM
007	12/06/2021	-	MI	herida	R	R	KPC
008	12/06/2021	COV	MI	bronquial	R	I	ND
009	12/06/2021	-	EME	orina	R	R	NDM
010	12/06/2021	-	MI	orina	R	R	ND
011	27/06/2022	-	EME	bronquial	I	R	NDM
012	30/06/2021	COV	UCI	orina	ND	R	ND
013	27/07/2021	COV	MI	sangre	I	I	ND
014	12/08/2021	COV	MI	bronquial	R	R	KPC

015	31/08/2021	-	out	orina	R	R	NDM
016	31/08/2021	-	out	orina	R	R	NDM
017	27/08/2021	-	MI	orina	R	R	ND
018	18/09/2021	-	MI	orina	R	R	NDM
019	3/09/2021	-	EME	herida	R	R	NDM
020	6/09/2021	-	UCI	orina	R	R	ND
021	17/10/2021	-	MI	orina	R	R	NDM
022	18/11/2021	-	MI	bronquial	R	R	NDM
023	1/12/2021	-	MI	orina	R	R	ND
024	17/02/2022	-	MI	bronquial	R	R	NDM
025	10/03/2022	-	MI	orina	R	R	NDM
026	31/03/2022	-	MI	bronquial	R	R	NDM
027	4/04/2022	-	MI	herida	R	R	NDM
028	13/04/2022	-	EME	herida	I	I	ND
029	13/04/2022	-	MI	herida	R	R	NDM
030	21/04/2022	-	MI	herida	R	R	NDM
031	22/04/2022	-	MI	herida	R	R	NDM
032	9/05/2022	-	UCI	bronquial	R	R	NDM
033	14/05/2022	-	MI	herida	R	R	NDM

IN: medicina interna; EME:emergencia; UCI:unidad de cuidados intensivos; COV: COVID-19; IMI: Imipenem; MER:Meropenem; R, resistente; I, intermedio.

Tabla 4. *Escherichia coli* provenientes de pacientes COVID-19 con carbapenemasas en el Hospital Nacional Hipólito Unanue del 2021

Código	Fecha de aislamiento	Area	Tipo de muestra	Perfil resistencia	Carbapenemasa
001	3/04/2021	EME	orina	AMP, AMC, CTX, CIP, IMI, MEM	ND
005	14/06/2021	EME	orina	AMP, AMC, CTX, CIP, MEM,SXT	NDM
006	12/06/2021	EME	bronquial	AMP, AMC, CTX, CIP, IMI, MEM,SXT	NDM
008	12/06/2021	MI	bronquial	AMP, AMC, CTX, CIP, GEN, IMI,SXT	ND
012	30/06/2021	UCI	orina	AMP, AMC, CTX, CIP, MEM,SXT	ND
013	27/07/2021	MI	sangre	AMP, AMC,SXT,	ND
014	12/08/2021	MI	bronquial	AMP, AMC, IMI, MEM	KPC

AMP: Ampicilina, AMC: Amoxicilina-ácido clavulánico, CTX: Cefotaxima, CIP: Ciprofloxacina, GEN: Gentamicina, IMI: Imipenem, MER: Meropenem STX: Trimetoprima/sulfametoxazol o sulfatrimetoprima.

5 Discusión

Las coinfecciones microbianas, son definidas como la identificación de un segundo patógeno en un paciente ya diagnosticado con la infección de otro microorganismo. Se han reportado casos de coinfección microbiana de COVID-19 y bacterias, y es así como Bazaid et al. (2022)

reporta que 1 de cada 5 de pacientes con SARS-CoV-2 presenta una coinfección. En el presente estudio, se recuperaron 7 aislamientos de *E. coli* provenientes de pacientes diagnosticados con COVID-19, y concuerda con lo ya reportado, al poseer una tasa menor del 30% dentro de las coinfecciones bacterianas en pacientes COVID-19. Así se tiene que Bazaid et al. (2022) reporta coinfecciones con *E. coli* en un 13% (10/80) de pacientes COVID-19, al igual que Sahu et al. (2022) en India, quienes aislaron *E. coli* del 21% (11/53) de pacientes diagnosticados con COVID-19 y con infección bacteriana, a partir de muestras de sangre, orina y secreciones respiratorias. En el Perú, Soto et al. (2021), describen coinfección bacteriana con *E. coli* en pacientes COVID-19 con una tasa de 6.5% (6/91), dato que coincide con los resultados presentados aquí. En el presente estudio un 43% (3/7) pertenecían de muestras bronquiales, y un 28% (2/7), de muestras de orina. Con respecto al tipo de muestras desde donde se llega a aislar el patógeno de la coinfección, el presente estudio concuerda con lo encontrado por Santos et al. (2022), quienes realizaron un estudio retrospectivo observacional, y hallaron que 37% (11/29) de las muestras de orina analizadas de 29 pacientes con COVID-19, eran aislamientos de *E. coli*. Si bien se observa que la mayoría de las coinfecciones reportadas para *E. coli* en pacientes con COVID-19, están relacionadas con el tracto urinario y, falta demostrar la relación que pudiera existir entre los efectos de la enfermedad de COVID-19 y las infecciones extraintestinales por *E. coli*.

Los carbapenémicos son antibióticos de tipo beta-lactámicos, y son generalmente usados para tratar infecciones de bacterias multidrogoresistentes. Así, el surgimiento de la resistencia a carbapenémicos en enterobacterias se ha ido incrementando en los últimos años (Tilahun et al., 2021), y esto debido a la presencia de mecanismos de resistencia como lo son las enzimas carbapenemasas que degradan estos antibióticos. De los 7 aislamientos de *E. coli* de pacientes COVID-19, el 57 % (4/7) eran resistentes tanto a imipenem como meropenem, y un 43% (3/7) eran resistentes a meropenem. Estos resultados difieren con lo encontrado en un hospital en España, donde un 18.6% (24/129) de pacientes COVID-19 presentaban coinfecciones con *E. coli*, pero sensibles a carbapenémicos en la totalidad de los aislamientos (Said et al. 2021).

Infecciones con enterobacterias productoras de carbapenemasas, han sido reportadas con mayor incidencia en pacientes con COVID-19, que en pacientes sin esta enfermedad (Pintado et al., 2022). Como se sabe la pandemia de COVID-19, ha traído consigo un aumento en el

uso indiscriminado de antibióticos en el ámbito nosocomial y comunitario, lo cual puede estar generando una presión selectiva de los microorganismos resistentes a antibióticos, como por ejemplo, carbapenémicos.

También es interesante abordar el mecanismo de la diseminación de estas bacterias resistentes. Un estudio realizado por Ymaña et al. (2022), reporta la alta prevalencia de aislamientos de *E. coli*, y de la presencia de genes productores de carbapenemasas y betalactamasas, provenientes de vestimentas y pertenencias de personal de salud en hospitales de Lima, demostrando un riesgo de diseminación de estas cepas hacia pacientes hospitalizados, como pacientes COVID-19.

Los genes productores de enzimas carbapenemasas como la metalobetalactamasa NDM o la serincarbapenemasa KPC, son las más comunes de manera global: *bla*_{KPC} ha sido extensamente reportada en Estados Unidos, China, Sur de Europa, mientras que *bla*_{NDM} ha sido frecuentemente reportada en el norte de Europa o India (Rabaan et al. 2022). En el presente estudio, un porcentaje de 69.7 % (23/33) de los aislamientos de *E. coli* presentó el gen *bla*_{NDM} y un 6% (2/33), el gen *bla*_{KPC}. Esto coincide con lo reportado por Soto et al. (2021), donde describen coinfecciones bacterianas con *S. aureus*, *S. agalactiae*, *H. influenzae*, *K. pneumoniae* y *E. coli* en tasas 11,8% (11/91), 10,7% (10/ 91), 10,7% (10/ 91), 8% (8/91) y 6.5% (6/91) respectivamente en pacientes COVID-19, y reportando genes de resistencia como *bla*_{NDM} y *bla*_{KPC}, sin embargo, no especifican en cuáles cepas. En un estudio del año 2019, se analizaron las carbapenemasas de 185 cepas de enterobacterias de diversos hospitales de Perú, encontrando que un 0.5%(1/185) era *E. coli* con el gen *bla*_{KPC}, y un 4.9% (9/185) era *E. coli* con el gen *bla*_{NDM} (Mayta-Barrios et al., 2019). Si bien el estudio anterior fue antes de la pandemia por COVID-19, ellos reportan cepas de *Pseudomonas aureginosa* portadoras del gen *bla*_{IMP} y *bla*_{VIM} en el Hospital Nacional Hipólito Unanue. Se sabe que la diseminación de estos genes puede darse a través de la transferencia horizontal mediante plásmidos, y se ha visto que *bla*_{NDM} se ha asociado a transposones, y en menor medida a integrones (Tavares et al. 2022).

También se debe mencionar los registros de la presencia de estos genes en enterobacterias, así, Soriano-Moreno et al. (2021), encontraron la presencia de genes *bla*_{KPC} en cepas de enterobacterias aisladas de efluentes de hospitales de nivel 2 y 3 de Lima, cabe resaltar que

las cepas de *E. coli* que aislaron eran sensibles a carbapenémicos y no presentaban genes de carbapenemasas.

Los resultados presentados aquí, además coinciden con lo encontrado por Farfour et al. (2020), quienes obtuvieron 6 aislamientos de *E. coli* productoras de carbapenemasas de 24 pacientes internados en UCI por COVID-19 en un hospital en Francia durante 2020. Estas cepas presentaron una relación clonal, puesto que 5 de ellas pertenecían a la secuencia tipo ST-361, y todas poseían el gen *bla*_{NDM-5}. En México, se describió un brote de *E. coli* productora de carbapenemasa NDM-1 en 4 pacientes críticos de COVID-19 con coinfección urinaria por *E. coli*, además encontraron un 20.6% (7/34) de *E. coli* portadoras de *bla*_{NDM-1} en hisopados rectales de pacientes COVID-19 (Fernández-García et al. 2022). Estos autores, además descubrieron que este gen, se encontraba en diferentes secuencias tipo de *E. coli*, sugiriendo una transferencia horizontal a través del plásmido IncFII. Aquí en el Perú, los datos encontrados en el presente estudio son los primeros hallazgos de la presencia de *bla*_{NDM} en *E. coli* aislados de pacientes COVID-19, lo cual da a pie a la necesidad de realizar una vigilancia de posibles brotes de coinfecciones con estas cepas de *E. coli* en un futuro, en pacientes COVID-19.

De acuerdo con los resultados, existe la presencia de bacterias, sobre todo *E. coli*, portadoras de carbapenemasas tipo NDM en pacientes con COVID-19 durante el año 2021, siendo esta la más frecuentemente detectada en el conjunto de *E. coli* analizadas.

6 Referencias

- Aggarwal, A., Mehta, S., Gupta, D., Sheikh, S., Pallagatti, S., Singh, R., & Singla, I. (2012). Emergency preparedness for public health modelling & forecasting. *Indian Journal of Medical Research*, 76(11), 1532–1539. <https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR>
- Aguilar Gamboa, F. R., Aguilar Martinez, S. L., Cubas Alarcón, D. M., Coaguila Cusicanqui, L. Á., Fernández Valverde, D. A., Mario Cecilio, M. M., ... & Díaz Sipión, R. S. (2016). Portadores de bacterias multirresistentes de importancia clínica en áreas críticas (UCI-UCIN) de un hospital al norte del Perú. *Horizonte Médico (Lima)*, 16(3), 50-57.
- Angles-Yanqui, E., Huaranga, J., Sacsquispe, R. y Pampa, L. (2020). Revisión

- sistemática Panorama de las carbapenemasas en Perú. *Revista Panamericana de Salud Publica*, 44, 1–10. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.61> }
- Bogaerts, P., Rezende de Castro, R., de Mendonça, R., Huang, T. D., Denis, O., & Glupczynski, Y. (2013). Validation of carbapenemase and extended-spectrum β -lactamase multiplex endpoint PCR assays according to ISO 15189. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 68(7), 1576–1582. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt065>
 - Bazaid, A. S., Barnawi, H., Qanash, H., Alsaif, G., Aldarhami, A., Gattan, H., Alharbi, B., Alrashidi, A., Al-Soud, W. A., Moussa, S., & Alfouzan, F. (2022). Bacterial Coinfection and Antibiotic Resistance Profiles among Hospitalised COVID-19 Patients. *Microorganisms*, 10(3), 495. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030495>
 - Cai Y, Zhang J, Xiao T, Peng H, Sterling SM, Walsh RM, et al. (2020). Different conformational states of the SARS-CoV-2 spike protein. *Science* 369, 1586–1592. doi: 10.1126/science. abd4251
 - Chilamakuri, R., & Agarwal, S. (2021). Covid-19: Characteristics and therapeutics. *Cells*, 10(2), 1–29. <https://doi.org/10.3390/cells10020206>
 - Ellington, M., Kistler, J., Livermore, D., & Woodford, N. (2007). Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- β -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(2), 321–322. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl481>
 - Farfour, E., Lecuru, M., Dortet, L., Le Guen, M., Cerf, C., Karnycheff, F., Bonnin, R. A., Vasse, M., Lesprit, P., & SARS-CoV-2 Hospital Foch study group (2020). Carbapenemase-producing Enterobacterales outbreak: Another dark side of COVID-19. *American journal of infection control*, 48(12), 1533–1536. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2020.09.015>
 - Fernández-García, O. A., González-Lara, M. F., Villanueva-Reza, M., de-León-Cividanes, N., Xancal-Salvador, L. F., Esteban-Kenel, V., Cárdenas-Ochoa, A., Cervantes-Sánchez, A., Martínez-Gamboa, A., Ochoa-Hein, E., Galindo-Fraga, A., Bobadilla-Del-Valle, M., Sifuentes-Osornio, J., & Ponce-de-León, A. (2022). Outbreak of NDM-1-Producing *Escherichia coli* in a Coronavirus Disease 2019 Intensive Care Unit in a Mexican Tertiary Care Center. *Microbiology spectrum*, 10(1), e0201521. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02015-21>

- Founou, R., Founou, L., & Essack, S. (2017). Clinical and economic impact of antibiotic resistance in developing countries: A systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE*, *12*(12), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189621>
- Giono-Cerezo, S., Santos, J., Morfín, M., Torres, F. y Alcántar, M. (2020). Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla. *Gaceta Médica de México*, *156*(2), 172–180. <https://doi.org/10.24875/gmm.20005624>
- Guion, C., Ochoa, T., Walker, C., Barletta, F., & Cleary, T. (2008). Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* by use of melting-curve analysis and real-time multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, *46*(5), 1752–1757. <https://doi.org/10.1128/JCM.02341-07>
- Hong, S., Kim, K., Huh, J., Jung, B., Kang, M., & Hong, S. (2012). Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding class A carbapenemases. *Annals of Laboratory Medicine*, *32*(5), 359–361. <https://doi.org/10.3343/alm.2012.32.5.359>
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews microbiology*, *2*(2), 123-140.
- Lai, C., Chen, S., Ko, W., & Hsueh, P. (2021). Increased antimicrobial resistance during the COVID-19 pandemic. *International journal of antimicrobial agents*, *57*(4), 106324. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2021.106324>
- Lansbury, L., Lim, B., Baskaran, V., & Lim, W. (2020). Co-Infections in People with COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. *The Journal of infection*, *81*(2), 266–275. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.05.046>
- MacFaddin, J. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Ed. Médica Panamericana.
- Mlynarcik, P., Roderova, M., & Kolar, M. (2016). Primer Evaluation for PCR and its Application for Detection of Carbapenemases in Enterobacteriaceae. *Jundishapur journal of microbiology*, *9*(1), e29314. <https://doi.org/10.5812/jjm.29314>
- Mahmoudi, H. (2020). Bacterial co-infections and antibiotic resistance in patients with COVID-19. *GMS hygiene and infection control*, *15*, 35. <https://doi.org/10.3205/dgkh000370>

- Mayta-Barrios, M., Ramirez, J., Pampa, L., & Alfredoyagui, M. (2021). Molecular characterization of carbapenemases in Peru during 2019. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 38(1), 113–118. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2021.381.5882>
- Ministerio de Salud del Perú. (2019). *Decreto_Supremo_010-2019-SA.PDF*.
- Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Aguilar, G. R., Gray, A., ... & Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*.
- Musuuza, S., Watson, L., Parmasad, V., Putman-Buehler, N., Christensen, L. y Safdar, N. (2021). Prevalence and outcomes of co-infection and superinfection with SARS-CoV-2 and other pathogens: A systematic review and metaanalysis. *PLoS ONE*, 16(5), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251170>
- Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic escherichia coli. *Clinical microbiology reviews*, 11(1), 142-201.
- O'Neill, J. (2016). Review on antimicrobial resistance: tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. Review on antimicrobial resistance: tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations.
- Organización Mundial de la Salud. Actualización sobre Omicron. 28 de noviembre de 2021. Disponible en: <https://www.who.int/news/item/28-11-2021-update-on-omicron>.
- Organization., W. H. (2017). *Plan De Acción Mundial Sobre La Resistencia a Los Antimicrobianos*. <https://www.who.int/es/publications/i/item/9789241509763>
- Pasteran, F., Albornoz, E., Faccone, D., Gomez, S., Valenzuela, C., Morales, M., Estrada, P., Valenzuela, L., Matheu, J., Guerriero, L., Arbizú, E., Calderón, Y., Ramon-pardo, P., & Corso, A. (2012). Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Guatemala. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(7), 1795–1797. <https://doi.org/10.1093/jac/dks101>
- Pintado, V., Ruiz-Garbajosa, P., Escudero-Sanchez, R., Gioia, F., Herrera, S., Vizcarra, P., Fortún, J., Cobo, J., Martín-Dávila, P., Morosini, M. I., Cantón, R., & Moreno, S. (2022). Carbapenemase-producing *Enterobacterales* infections in

- COVID-19 patients. *Infectious diseases (London, England)*, 54(1), 36–45.
<https://doi.org/10.1080/23744235.2021.1963471>
- Poirel, L., Madec, J.Y., Lupo, A., Schink, A.K, Kieffer, N., Nordmann, P. y Scharwz, S. (2018). Antimicrobial Resistance in Escherichia coli. *Microbiology Spectrum.*, 23(10), 979–980. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec>.
 - Queenan, A. M., & Bush, K. (2007). Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clinical microbiology reviews*, 20(3), 440-458.
 - Rabaan, A. A., Eljaaly, K., Alhumaid, S., Albayat, H., Al-Adsani, W., Sabour, A. A., Alshiekheid, M. A., Al-Jishi, J. M., Khamis, F., Alwarthan, S., Alhajri, M., Alfaraj, A. H., Tombuloglu, H., Garout, M., Alabdullah, D. M., Mohammed, E. A. E., Yami, F. S. A., Almuhtaresh, H. A., Livias, K. A., Mutair, A. A., ... Ahmed, N. (2022). An Overview on Phenotypic and Genotypic Characterisation of Carbapenem-Resistant Enterobacterales. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 58(11), 1675. <https://doi.org/10.3390/medicina58111675>
 - Roque-borda, C., da Silva, P., Rodrigues, M., Azevedo, R., Di Filippo, L., Duarte, J., Chorilli, M., Vicente, E., & Pavan, F. (2021). Challenge in the discovery of new drugs: Antimicrobial peptides against who-list of critical and high-priority bacteria. *Pharmaceutics*, 13(6), 773. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13060773>
 - Russo, T. A., & Johnson, J. R. (2000). Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of Escherichia coli: ExPEC. *The Journal of infectious diseases*, 181(5), 1753-1754.
 - Sacsquispe-Contreras, R. y Bailón-Calderón, H. (2018). Identificación de genes de resistencia a carbapenémicos en enterobacterias de hospitales de Perú, 2013-2017. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 35(2), 259. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2018.352.3829>
 - Sahu, C., Singh, S., Pathak, A., Singh, S., Patel, S. S., Ghoshal, U., & Garg, A. (2022). Bacterial coinfections in COVID: Prevalence, antibiotic sensitivity patterns and clinical outcomes from a tertiary institute of Northern India. *Journal of family medicine and primary care*, 11(8), 4473–4478. <https://doi.org/10.4103/jfmpe.jfmpe> 41 22
 - Said, K. B., Alsolami, A., Moussa, S., Alfouzan, F., Bashir, A. I., Rashidi, M.,

- Aborans, R., Taha, T. E., Almansour, H., Alazmi, M., Al-Otaibi, A., Aljaloud, L., Al-Anazi, B., Mohialdin, A., & Aljadani, A. (2022). COVID-19 Clinical Profiles and Fatality Rates in Hospitalized Patients Reveal Case Aggravation and Selective Co-Infection by Limited Gram-Negative Bacteria. *International journal of environmental research and public health*, 19(9), 5270. <https://doi.org/10.3390/ijerph19095270>
- Santos, A. P., Gonçalves, L. C., Oliveira, A. C. C., Queiroz, P. H. P., Ito, C. R. M., Santos, M. O., & Carneiro, L. C. (2022). Bacterial Co-Infection in Patients with COVID-19 Hospitalized (ICU and Not ICU): Review and Meta-Analysis. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 11(7), 894. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070894>
 - Soriano-Moreno, D. R., Yareta, J., Rojas-Cosi, A. F., Fajardo-Loyola, A., León-Luna, D., Castillo-Quezada, I., Laura-Bejarano, M., Hilario-Sánchez, M., Galarza-Pérez, M., & Marcos-Carbajal, P. (2021). Hospital effluents as a reservoir of beta-lactamase- and carbapenemase-producing enterobacteriaceae. Efluentes hospitalarios como reservorio de enterobacterias productoras de betalactamasas y carbapenemasas. *Revista peruana de medicina experimental y salud publica*, 38(2), 302–307. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2021.382.6202>
 - Soto, A., Quiñones, D., Valdivia, F., Juscamayta, E., Azañero, J., Chambi, L., Horna, H., Patiño, G., Guzman, E., & de la Cruz, J. (2021). Detection of viral and bacterial respiratory pathogens identified by molecular methods in COVID-19 hospitalized patients and its impact on mortality and unfavorable outcomes. *Infection and Drug Resistance*, 2021(14), 2795–2807. <https://doi.org/10.2147/IDR.S306439>
 - Suárez, C. J., Kattán, J. N., GUZMÁN, A., & Villegas, M. V. (2006). Mecanismos de resistencia a carbapenems en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* y *Enterobacteriaceae* y estrategias para su prevención y control. *Infectio*, 10(2), 85-93.
 - Tavares, R. D. S., Tacão, M., Ramalheira, E., Ferreira, S., & Henriques, I. (2022). Report and Comparative Genomics of an NDM-5-Producing *Escherichia coli* in a Portuguese Hospital: Complex Class 1 Integrons as Important Players in *bla*_{NDM} Spread. *Microorganisms*, 10(11), 2243. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10112243>
 - Tilahun, M., Kassa, Y., Gedefie, A., & Ashagire, M. (2021). Emerging carbapenem-

- resistant enterobacteriaceae infection, its epidemiology and novel treatment options: A review. *Infection and Drug Resistance*, 14, 4363–4374. <https://doi.org/10.2147/IDR.S337611>
- Tompkins, K., & van Duin, D. (2021). Treatment for carbapenem-resistant Enterobacterales infections: recent advances and future directions. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 40(10), 2053–2068. <https://doi.org/10.1007/s10096-021-04296-1>
 - Tsai, Y., Wang, S., Chiu, H., Kao, C., y Wen, L. (2020). Combination of modified carbapenem inactivation method (mCIM) and EDTA-CIM (eCIM) for phenotypic detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *BMC Microbiology*, 20(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-02010-3>
 - Ukuhor, H. (2020). The interrelationships between antimicrobial resistance, COVID-19, past, and future pandemics. *Journal of infection and public health*, 14(1), 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.10.018>
 - Velásquez, J., Hernández, R., Pamo, O., Candiotti, M., Pinedo, Y., Sacsquispe, R., ... & Fernández, N. (2013). Klebsiella pneumoniae resistente a los carbapenemes. Primer caso de carbapenemasa tipo KPC en Perú. *Revista de la Sociedad Peruana de Medicina Interna*, 26(4), 192-196.
 - Weinstein, M.P. y Lewis, J.S. (2018). The clinical and laboratory standards institute subcommittee on antimicrobial susceptibility testing: background, organization, functions, and processes. *Journal of Clinical Microbiology*, January, 58(3), 1864–19. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/JCM.01864-19>
 - Woo, PCY, Huang, Y., Lau, SKP, and Yuen, K.-Y. (2010). Analysis of genomics and bioinformatics of the coronavirus. *Viruses* 2, 1804–1820. doi: 10.3390/v2081803.
 - Ymaña, B., Luque, N., Ruiz, J., & Pons, M. J. (2022). Worrying levels of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria isolated from cell phones and uniforms of Peruvian intensive care unit workers. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 116(7), 676–678. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trab186>

- Zavala-Flores, E., y Salcedo-Matienzo, J. (2020). Medicación prehospitalaria en pacientes hospitalizados por COVID-19 en un hospital público de Lima-Perú. *Acta Medica Peruana*, 37(3), 393–395. <https://doi.org/10.35663/amp.2020.373.1277>