



Universidad
Zaragoza

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Análisis y detección de bacterias resistentes en
pacientes COVID-19 ingresados en las Unidades de
Cuidados Intensivos del Hospital Clínico Universitario
de Zaragoza

Analysis and detection of resistant bacteria in COVID-
19 patients admitted to the Intensive Care Units of the
Hospital Clínico Universitario de Zaragoza

Autor

Manuel Holgado Ayuso

Tutora

Cristina Seral García

Facultad de Medicina de Zaragoza, 2021

Índice

1. Objetivos	4
2. Introducción	4
2.1 COVID-19, historia natural e ingreso en UCI	5
2.2 Manejo y antibioterapia en pacientes COVID-19	6
2.3 Presencia de bacterias en pacientes COVID-19.....	7
2.4 Bacterias objeto de estudio	8
2.5 Impacto bacterias multirresistentes	10
3. Material y métodos	12
4. Resultados	17
4.1 Resultados según especie bacteriana y mecanismos de resistencia hallados	19
4.2 Análisis por temporalidad.....	22
5. Conclusiones	28
6. Bibliografía	30

Resumen

Introducción y objetivos: La actual pandemia por COVID-19 se ha solapado a una pandemia ya vigente en los últimos tiempos, la pandemia de las bacterias multirresistentes. Dado los grandes impactos que la selección de estas cepas resistentes pueden llegar a tener sobre la salud mundial en un futuro cercano, resulta de gran interés estudiar las posibles influencias que puede haber tenido la actual pandemia por COVID-19 sobre la resistencia bacteriana. Con dicho objetivo, se recopilaron datos en el Hospital Clínico Universitario de Zaragoza para observar la posible relación existente entre la COVID-19 y la presencia de bacterias con mecanismos de resistencia de interés, cuáles fueron las bacterias halladas y que implicaciones pudieron tener.

Material y métodos: Para el estudio de las bacterias multirresistentes en pacientes COVID-19 ingresados en UCI, se llevó a cabo una base de datos de pacientes del Hospital Clínico Universitario de Zaragoza. En esta base de datos se incluyeron muestras recogidas mediante triple hisopo (FTH), formando parte del programa Resistencia Zero, en el que se estudia la colonización de los pacientes por determinadas bacterias resistentes de interés, y muestras clínicas en las que crecieron bacterias objeto de estudio de la presente revisión en los distintos pacientes. En ambos tipos de muestra se llevó a cabo un estudio de los posibles mecanismos de resistencia.

Resultados: Se hallaron muestras positivas para las siguientes especies bacterianas: *P. aeruginosa*, *E. coli* productora de β -lactamasas de espectro extendido, *K. pneumoniae*, *K. variicola* y *k. aerogenes* productoras de β -lactamasas de espectro extendido y/o AmpC, *Enterobacter cloacae*, *E. faecium* y *E. faecalis* y por último *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina (SARM). Siendo la *P. aeruginosa* la más frecuentemente hallada y también la que más infecciones provocó en los pacientes estudiados.

La presencia de estas fue constante durante toda la pandemia, a pesar de ello, el número de muestras totales y las especies bacterianas fueron modificándose a medida que la pandemia iba avanzando, cambiando a medida que cambiaban las características de esta, según la incidencia de COVID-19, capacidad de los laboratorios para realizar Test diagnósticos, etc.

Se hallaron dos picos principales en cuanto al número de muestras totales en los pacientes analizados. El primero desde los meses de marzo a mayo de 2020 y el segundo más amplio desde los meses de septiembre de 2020 a enero de 2021.

Palabras Clave: resistencia bacteriana, FTH, COVID-19, antibioterapia.

Abstract

Introduction and objectives: The current COVID-19 pandemic has overlapped a pandemic already in force in recent times, the multi-resistant bacteria pandemic. Given the great impacts that the selection of these resistant strains may have on global health in the near future, the study of the possible influences that the current COVID-19 pandemic may have had on bacterial resistance is of great interest. With this objective, data were collected at the Zaragoza University Clinical Hospital to observe the possible relationship between the incidence of COVID-19 and the presence of bacteria with resistance mechanisms of interest, which bacteria were found and what implications they could have.

Material and methods: For the study of multidrug-resistant bacteria in COVID-19 patients admitted to the ICU, a database of patients from the Hospital Clínico Universitario de Zaragoza was carried out. This database included samples collected by means of triple swab (FTH), forming part of the Zero Resistance program, in which the colonization of patients by certain resistant bacteria of interest is studied, and clinical samples in which the bacteria that are the object of study of this review grew in the different patients. In both types of sample, a study of the possible resistance mechanisms was carried out.

Results: Positive samples were found for the following bacterial species: *P. aeruginosa*, extended spectrum β -lactamase producing *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. variicola* and *K. aerogenes* producing extended spectrum β -lactamases and / or AmpC, *Enterobacter cloacae*, *E. faecium* and *E. faecalis* and finally *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin (MRSA). Being *P. aeruginosa* the most frequently found and also the one that caused the most infections in the patients studied.

The presence of these was constant throughout the pandemic, despite this, the number of total samples and the bacterial species changed as the pandemic progressed, changing as the characteristics of the pandemic changed, depending on the incidence of COVID-19, capacity of laboratories to perform diagnostic tests, etc.

Two main peaks were found in terms of the number of total samples in the patients analyzed. The first from the months of March to May 2020 and the second broader from the months of September 2020 to January 2021.

Key Words: bacterial resistance, FTH, COVID-19, antibiotic therapy.

1. Objetivos

- 1) Determinar cuáles fueron las especies bacterianas halladas en los pacientes COVID-19 ingresados en las Unidades de Cuidados Intensivos del Hospital Clínico Universitario de Zaragoza.
- 2) Detectar cual fue la especie bacteriana que más veces se halló en las muestras analizadas, cuál fue la especie bacteriana que más infecciones produjo así como su mecanismo de resistencia presentado con mayor frecuencia.
- 3) Analizar la presencia de especies bacterianas cuyos mecanismos de resistencia son objeto de estudio del programa Resistencia Zero.
- 4) Observar y analizar la evolución temporal de las distintas especies bacterianas a medida que iba avanzando la pandemia por COVID-19.
- 5) Analizar las posibles consecuencias del uso de la antibioterapia empírica durante la pandemia COVID-19 y el papel que puede haber tenido esta sobre la selección de cepas resistentes.

2. Introducción

Actualmente, la pandemia mundial por COVID-19 se ha superpuesto a otra pandemia ya vigente en los últimos tiempos, la pandemia de las bacterias multirresistentes(1).

Para poder profundizar en el concepto de la resistencia bacteriana, es preciso diferenciar los siguientes conceptos: Se define resistencia bacteriana como la capacidad de una cepa bacteriana para sobrevivir al tratamiento antibiótico en unas concentraciones determinadas que inhibirían o matarían a otras bacterias de la misma especie(2). La Multirresistencia (MDR),sin embargo, se define como la falta de sensibilidad a uno o más antibióticos de al menos tres familias diferentes (3–5). Por otro lado, el concepto de Resistencia Extensa (XDR) hace referencia a la resistencia a un antibiótico o más de todas las familias con excepción de una o dos de ellas. Por último, el concepto de Panresistencia (PDR) se define como la falta de sensibilidad a todas las familias de antibióticos(4,5).

A día de hoy, la resistencia bacteriana a antibióticos supone un problema en crecimiento, tales son las dimensiones del mismo, que actualmente el 50% de las cepas

bacterianas son resistentes a un grupo de antibióticos, y la presencia de resistencia a más de un grupo es actualmente una posibilidad relativamente frecuente(1).

Las consecuencias e impactos que la actual pandemia por COVID-19 pueda llegar a tener sobre las resistencias antibióticas son aún desconocidos. La propia Organización Mundial de la Salud (OMS) ha advertido que el uso en exceso de antibióticos durante la pandemia de COVID-19 provocará un aumento mundial de las resistencias antibióticas.

2.1 COVID-19, historia natural e ingreso en UCI

El 11 de marzo del año 2020 la OMS declaró oficialmente la pandemia mundial por el brote del nuevo virus SARS-CoV-2, responsable de la enfermedad conocida como COVID-19.

La salud pública mundial se ha visto gravemente amenazada. Hasta la fecha, más de 100 millones personas se han visto contagiadas por el SARS-CoV-2 y más de 2,2 millones han perdido la vida.

Existe un amplio espectro en cuanto a la sintomatología que presentan las personas que se infectan por este virus, la gran mayoría de infectados padecen síntomas como tos seca y fiebre, si bien también pueden presentar síntomas como cefalea, mialgias y diarrea(6). Sin embargo, se ha podido observar su gran capacidad de provocar síndrome de dificultad respiratoria aguda en los pacientes afectados por el mismo (7–9). Este síndrome de dificultad respiratoria aguda es de características similares al observado por otras infecciones víricas y bacterianas (7,10). Se ha encontrado una sobreproducción de citoquinas proinflamatorias en respuesta al SARS-CoV-2, provocando un aumento de la permeabilidad vascular, con riesgo de fracaso orgánico y la muerte del paciente(11).

Además, esta tormenta de citoquinas también provocaría una activación de la coagulación, dando lugar a un desequilibrio a favor de los factores procoagulantes, teniendo como resultado final una microtrombosis con coagulación vascular diseminada y fallo multiorgánico en pacientes con COVID-19(12).

Por todo esto, en un gran porcentaje de los casos, los pacientes afectados por COVID-19 requieren intubación orotraqueal y manejo en Unidades de Cuidados Intensivos(7).

2.2 Manejo y antibioterapia en pacientes COVID-19

Dada la importancia de la antibioterapia y las implicaciones que esta pueda tener sobre las resistencias bacterianas estudiadas en la presente revisión, se exponen a continuación las indicaciones de la misma, así como sus pautas de manejo, recogidas del protocolo de manejo utilizado en el Hospital Clínico Universitario de Zaragoza (13):

Se indica ,en aquellos pacientes que cumplan criterios de Neumonía moderada-grave o pacientes críticos ,el inicio empírico de tratamiento con ceftriaxona 2g/i.v cada 24 horas durante las 48-72 primeras hasta esperar resultados de microbiología(13). La elección de ceftriaxona como antibiótico empírico, se debió, entre otras causas, a una pauta de administración cómoda que permitía mantener un contacto reducido con los pacientes infectados (al administrarse únicamente una dosis al día), evitando una exposición extensa al Sars-CoV-2 al personal sanitario.

Además, se adjuntan obtenidas de dicho protocolo, la siguientes pautas para el manejo de la antibioterapia en pacientes COVID-19 (13):

1. Se ha de reservar el uso de antibióticos empíricos para los casos más graves o cuando se sospeche coinfección bacteriana en un contexto clínico, radiológico o analítico.
2. En caso de aprobar el uso de antibioterapia, se ha de realizar la toma de muestras procedente para el diagnóstico microbiológico.
3. Suspender el antibiótico precozmente si en la reevaluación del paciente la sospecha de coinfección bacteriana es baja
4. Se ha de plantear el paso a vía oral del antibiótico siempre que exista disponibilidad e indicación
5. La duración no debe extenderse de los 5 días en la mayoría de las situaciones
6. El antibiótico empírico seleccionado debe ser activo frente a *S. pneumoniae* y *S. aureus*, incluyéndose preferentemente un β -lactámico. Se ha de evitar el uso de macrólidos y quinolonas por el riesgo de prolongar el intervalo QT, especialmente si se van a utilizar antivirales u otros fármacos que prolonguen dicho segmento.

7. No existe indicación para utilizar antibióticos con intención profiláctica para prevenir sobreinfecciones.

En la actualidad, se conoce que el uso extendido e indebido de la antibioterapia es el combustible principal para la aparición de resistencias antibióticas (14,15).

Además, debido a la pandemia actual, se está produciendo un aumento a nivel mundial en el uso de antibióticos(1,16). La principal razón que motiva el uso de antibioterapia en pacientes infectados por COVID-19 es la posibilidad de que se produzca la coexistencia de una coinfección bacteriana en los mismos(16).

Las consecuencias de una antibioterapia extendida, pueden llevar consigo problemas de prescripción en la misma, seleccionándose y aumentando la presencia de resistencias bacterianas(15). Por otro lado, la antibioterapia previa puede favorecer la colonización por bacterias resistentes como las productoras de beta lactamasas de espectro extendido en pacientes ingresados en unidades de cuidados críticos(17).

Las consecuencias e impactos de la selección y aumento en el número de cepas bacterianas resistentes se analizan posteriormente en el apartado *2.4 Impactos de las bacterias multirresistentes*.

2.3 Presencia de bacterias en pacientes COVID-19

La presencia de bacterias multirresistentes en pacientes positivos en COVID-19 es motivo actual de gran interés, dado que la presencia de las mismas como agentes de coinfección condiciona un aumento en la mortalidad en estos pacientes(18,19).

Las coinfecciones bacterianas son una causa frecuente de comorbilidades en las neumonías virales (18,19). En la actualidad la fisiopatología del COVID-19 es aún desconocida, sin embargo, a medida que avanza la evidencia se van planteando distintas hipótesis de cómo podrían producirse estas coinfecciones. Algunos autores plantean distintos escenarios para justificar la presencia de estas durante la infección COVID-19, entre ellas se destaca la posibilidad de que una lesión en el epitelio de las vías respiratorias provoque un aumento de la destrucción, haciéndolo más susceptible de sobreinfectarse por otros microorganismos (1,19). Otra posibilidad planteada sería la alteración del eje intestino-pulmonar, implicado en la patogenia de distintas neumonías, alterándolo y dando lugar a la posible coinfección (1,19). En otros

estudios, se sugiere que el propio virus debilita al sistema inmune del huésped, permitiendo así el desarrollo de la coinfección bacteriana y vírica (18,20).

Cabe señalar también que distintas características de los pacientes positivos en COVID-19 que requirieron ingreso en UCI como lo son la ventilación mecánica y una estancia hospitalaria prolongada hacen que estos sean más susceptibles de padecer dichas coinfecciones(1).

2.4 Bacterias objeto de estudio

Las bacterias que han sido analizadas en los pacientes del presente trabajo son las siguientes:

- *Klebsiella pneumoniae*
- *Klebsiella aerogenes*
- *Klebsiella variicola*
- *Staphylococcus aureus resistente a la meticilina (SARM)*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Escherichia coli*
- *Enterococcus faecalis*
- *Enterococcus faecium*
- *Enterobacter cloacae*

El motivo de inclusión de estas especies se debe principalmente a que son las que mayor impacto clínico y epidemiológico generan, y las que mayores dificultades terapéuticas presentan (5).

SARM es una bacteria que coloniza de forma habitual a los seres humanos, pero ha demostrado que en determinadas circunstancias se comporta como un patógeno oportunista. Su mecanismo principal de resistencia consiste en la resistencia a la meticilina/oxacilina mediante la producción de una proteína de unión a la penicilina llamada PBP2a, que es codificada por el gen *mecA*, siendo el gen que codifica para una proteína con baja afinidad para los β -lactámicos(5,21). Esta resistencia condicionaría una falta de sensibilidad a todos los β -lactámicos, en distinta magnitud y con algunas excepciones ,incluyendo penicilinas, las combinaciones con inhibidores de las beta lactamasas, cefalosporinas, monobactames y carbapenemas excepto ceftarolina y ceftobiprole(21).

Las implicaciones que SARM puede tener a nivel epidemiológico hacen obligatorio el establecimiento de sistemas de detección y control adecuados(5,22).

Por otro lado, se ha decidido incluir a una serie de enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido, de aquí en adelante denominadas enterobacterias **BLEE**. En los últimos años, se han diseminado una serie de clones de estas bacterias resistentes productoras de BLEE, mecanismo de resistencia más común e importante que presentan las Gram – frente a los β -lactámicos(23). Estas BLEE tienen capacidad de hidrolizar penicilinas, oximino-cefalosporinas y monobactámicos, pero no así a cefamicinas (cefoxitina) y carbapenémicos (23,24). La extensión de bacterias productoras de BLEE se está convirtiendo en uno de los principales problemas a la hora de combatir las infecciones que estas provocan (5). Estas BLEE presentan una amplia clasificación : tipos CTX-M, TEM y SHV y otras de menor prevalencia como PER,VEB,GES... (25). Se destaca las de tipo CTX-M al ser estas las de mayor prevalencia en España (5).Además, una de las características que presentan estas BLEE es que son inhibidas por el ácido clavulánico, pudiendo esta característica utilizarse para la detección de las mismas (25).

La extensión de estas BLEE se ha convertido en una gran amenaza para el tratamiento antibiótico de las infecciones causadas por las mismas, por ello, algunos autores proponen la vigilancia de la colonización por cualquier especie de enterobacteria productora de BLEE(5).

Otro mecanismo de resistencia que amenaza al tratamiento mediante cefalosporinas de amplio espectro, son las denominadas **AmpC plasmídicas**, llamadas también cefamicinas(5,26). Estas AmpC pueden estar presentes de forma natural en cromosomas de algunos microorganismos como *Enterobacter spp*, *Morganella morganii*, *Serratia*, *Pseudomonas aeruginosa* de manera inducible, esto significa que en presencia de distintos inductores, como serían potencialmente los β -lactámicos, aumentarían de forma significativa la producción de estas AmpC, haciéndose resistentes por tanto a una serie de antibióticos mencionados a continuación. Además, se ha demostrado que los genes que codifican estas AmpC se han integrado en elementos de material genético con capacidad de transferirse , AmpC plasmídicas, pudiendo diseminarse así la información genética de unas bacterias a otras(26). Los antibióticos que las AmpC pueden hidrolizar incluyen cefalosporinas de primera y segunda generación, las de tercera generación de forma menos relevante , no teniendo así capacidad para hidrolizar las de cuarta generación y los carbapenémicos(23). Además, al contrario que ocurre con las BLEE, el ácido clavulánico no tiene capacidad de inhibirlas, pudiendo verse inhibidas sin embargo por la cloxacilina(25).

Actualmente una de las mayores amenazas en cuanto a resistencia antibiótica se refiere es la diseminación de las cepas productoras de carbapenemasas, y es junto a la mayor frecuencia de cepas productoras de BLEE y AmpC ha provocado un aumento en la prescripción de antibióticos carbapenémicos y un aumento en la aparición de resistencia frente a los mismos(5).

Estas **carbapenemasas** presentan una amplia clasificación, dividiéndose en carbapenemasas de tipo A, B y D en la clasificación de Ambler, que se corresponden a los grupos funcionales de la clasificación de Bush y Jacoby, siendo las de mayor importancia las de clase B de Ambler o grupo 3 en la clasificación de Bush y Jacoby(25). Las carbapenemasas principales de clase B son las denominadas IMP y VIM (25). Estas enzimas, además de generar resistencia a los Carbapenemes, debido a su hidrolización, tendrían resistencia general a todos los β -lactámicos a excepción del aztreonam(27).

Mientras que se propone la vigilancia activa de cualquier especie productora de BLEE y carbapenemasas, se recomienda la vigilancia de las AmpC en aquellas bacterias que no poseen las mismas de forma cromosómica y presentan capacidad de diseminación de estas enzimas a través de plásmidos de resistencia (5).

Por último, cabe mencionar la existencia de otro mecanismo de resistencia, presente en algunas de las bacterias analizadas, denominado **pérdida de porinas**. Este mecanismo consiste en diversos cambios en la permeabilidad de la membrana externa de la bacteria, provocando distintas modificaciones conformacionales que dificultan el paso de diversas sustancias, como los antibióticos, a través de dicha membrana (28). Este mecanismo suele ir asociado a alguno de los anteriores dificultando su detección.

2.5 Impacto bacterias multirresistentes

Observando todos estos mecanismos de resistencia se pone de manifiesto la necesidad de un control estricto sobre las mismas, dado las implicaciones que estas bacterias resistentes pueden llegar a tener sobre la salud mundial.

Los posibles impactos consecuentes a la extensión de estas cepas multirresistentes pueden llegar a ser realmente catastróficos. Expertos en la materia mandan una alarma a nivel mundial. De hecho, algunos de estos han llegado a plantear la situación en la que si este problema se volviese incontrolable, cabría la posibilidad, mínima pero real, de volver a un

mundo sin antibióticos eficaces(14). Se ha llegado incluso a la realización de estudios en los últimos años en los que se adopta esta perspectiva, en uno de ellos, se realizó una estimación de cómo sería la infección postquirúrgica y su mortalidad tras una intervención de cadera en un mundo sin antibióticos (29).Viéndose que en la actualidad, la tasa de infección es de entorno al 0,5-2% según distintos estudios y como, al retirar esa antibioterapia profiláctica, la tasa ascendería hasta el 40-50%, con una mortalidad cercana al 30%. Los propios autores señalaron la inexactitud de lo observado, debido a todos aquellos factores que contribuyen de manera importante a la profilaxis de dichas infecciones. Sin embargo, trataron de representar el peligroso escenario al que podría llegar a enfrentarse la salud mundial (29).

Como es de prever, la salud de los pacientes sería la primera consecuencia de este problema sanitario. De hecho, se ha considerado en términos generales que los resultados adversos, siendo estos tanto clínicos como económicos, causados por estas cepas ,son dos veces mayores a los causados por cepas sensibles a un grupo mayor de antibióticos (30) .En cuanto a los efectos clínicos, estos se traducen en un aumento de la mortalidad, además de en un aumento en las distintas complicaciones secundarias a estas infecciones(30).

Es de importancia destacar que los impactos que tendría la extensión de estas cepas resistentes no se limita al sector sanitario, viéndose también afectada la esfera de la economía. El impacto económico que pueden tener estas resistencias también es de grandes dimensiones, viéndose afectado en su conjunto el gasto económico total (30,31).

Por todo ello, las bacterias con resistencia a diversos grupos de terapia antibiótica se presentan como las responsables de uno de los grandes problemas a los que se enfrenta la salud mundial en el actual siglo XXI y su contención se ha de convertir en una prioridad asistencial en favor de la salud pública(5).

3. Material y métodos

Con el objeto de poder estudiar la presencia de bacterias resistentes en pacientes COVID-19 ingresados en Unidades de Cuidados Intensivos (UCI), se llevó a cabo una recopilación de datos iniciada el 17 de marzo de 2020 y finalizada el 3 de febrero de 2021 en el Hospital Clínico Universitario de Zaragoza (HCU). En dicha base de datos, se incluyeron aquellos pacientes positivos en COVID-19 que requirieron ingreso en las diversas UCIs del HCU y que presentaron colonización o coinfección por bacterias resistentes.

Para la detección de dichas bacterias se llevaron a cabo dos acciones, la primera consistió en la aplicación del programa Resistencia Zero, con el cual se detectaron bacterias colonizadoras en los pacientes. Este programa tiene como objetivo la reducción de la presencia de bacterias resistente en los pacientes ingresados en unidades de cuidados críticos (32).

Por otro lado, en aquellos pacientes en los que se encontró sintomatología compatible con una coinfección se extrajeron muestras clínicas para observar el crecimiento bacteriano en ellas como agentes etiológicos de la coinfección.

Resistencia Zero: siguiendo las recomendaciones de dicho programa, se realizó una búsqueda activa de bacterias resistentes en cada paciente en el momento de su ingreso en UCI. Esta búsqueda consiste en la recolección de tres muestras (frotis nasal, rectal y orofaríngeo) mediante un triple hisopo denominado de aquí en adelante FTH (figura 1), está recogida permite conocer si el paciente está colonizado por una o varias bacterias resistentes.



Figura 1: Triple Hisopo (FTH)

Las bacterias que se estudian en el programa Resistencia Zero son las siguientes: *Pseudomonas* productoras de carbapenemasas, enterobacterias productoras de BLEE y AmpC plasmídicas, como *Klebsiella* y *E.coli* y por último *Staphylococcus aureus* resistente a la *meticilina*, debido al impacto clínico y epidemiológico que estas pueden tener(5).

El motivo de conocer la existencia de colonización bacteriana en un paciente es debido a que la colonización constituye una de las principales vías de diseminación de las bacterias multirresistentes (5).

Es de importancia diferenciar los conceptos de colonización e infección: se define colonización como la presencia del microorganismo en la flora del paciente sin causar enfermedad. La infección es considerada cuando existe presencia de microorganismo en el organismo del paciente causando enfermedad(33).

Por ello ,se consideró colonización al crecimiento de una o varias bacterias resistentes en muestra obtenida mediante triple hisopo FTH, considerando infección tan solo en aquellos casos en los que el crecimiento de una o varias bacterias resistentes se produjo en una muestra clínica, pudiendo ser esta muestra clínica obtenida de sangre, esputo, broncoaspirado, catéter, herida ,orina o líquido pleural.

Como resultado final, se incluyeron por tanto muestras obtenidas mediante FTH y muestras clínicas. Una vez recogidas las mismas se realiza un proceso que consta de cuatro partes con el fin de conocer la existencia de bacterias resistentes, así como el fenotipo de resistencia de las mismas.

El proceso consta de los siguientes puntos:

- Cultivo en medios cromogénicos Chromagar
- Identificación de especie y genero bacteriano mediante MALDI TOF
- Cultivo y antibiograma en medio Müller Hinton
- Inmunocromatografía para detectar beta-lactamasas

Una vez recogida la muestra, esta se cultiva en los siguientes medios cromogénicos:

- Chromagar MRSA2 brillante de oxoid: está compuesto por una mezcla de antibióticos, cuya concentración y composición exacta se desconoce. Dado que su principal objetivo es la selección de *Staphylococcus aureus resistente a la meticilina (SARM)*, se puede intuir que uno de ellos podría ser la oxacilina. El color de la placa es el blanco. Al ser este un medio cromogénico, el crecimiento de *SARM* en la placa se hace evidente con el cambio de coloración, apareciendo las colonias de una coloración azul metálico, diferenciándose así de otros *Staphylococcus* sensibles a meticilina cuyas colonias crecerán de color blanco.
- Chromagar ESBL: Este medio es selectivo y diferencial. Al igual que el anterior, está compuesto por una mezcla de antibióticos cuya composición y concentración se

desconoce, es de suponer que el medio contiene alguna cefalosporina que permita el crecimiento de bacterias productoras de BLEE, pudiendo así detectarlas. Al ser también un medio cromogénico, se produce un cambio en la coloración entre las distintas especies bacterianas, permitiendo identificarlas a expensas de una confirmación posterior como se menciona más adelante. Así según el color observado el género bacteriano será diferente. Como podemos ver en la imágenes adjuntadas (Figura 2, figura 3) se ha producido un crecimiento de unas posibles *E. coli*, con una coloración rosada y de *Klebsiella sp.*, con una coloración azulada.



Figura 2: crecimiento de una posible *Klebsiella*



Figura 3: crecimiento de una posible *E. coli*

- Chromagar CPE: Este medio también es selectivo y diferencial. En este caso, el antibiótico empleado es presuntamente un carbapenem, con el objeto de poder seleccionar bacterias productoras de carbapenemasas. Debido a que también es un medio cromogénico, según la coloración crecerá una bacteria u otra. Las bacterias no fermentadoras como *Pseudomonas aeruginosa* aparecerán con una coloración transparente, sin embargo, las enterobacterias productoras de carbapenemasas aparecerán con coloración azulada, roja...

Según el crecimiento obtenido en los diferentes medios, se identifica la especie y el género bacteriano con el MALDI-TOF, el cual, mediante espectrometría de masas es capaz de identificar la especie y el género de la misma, habiéndose convertido actualmente en el Gold standard para la identificación microbiológica (34). Se adjuntan dos imágenes en las que se observa el MALDI-TOF (Figura 4) y la identificación bacteriana realizada por el mismo (Figura 5).



Figura 4: MALDI-TOF

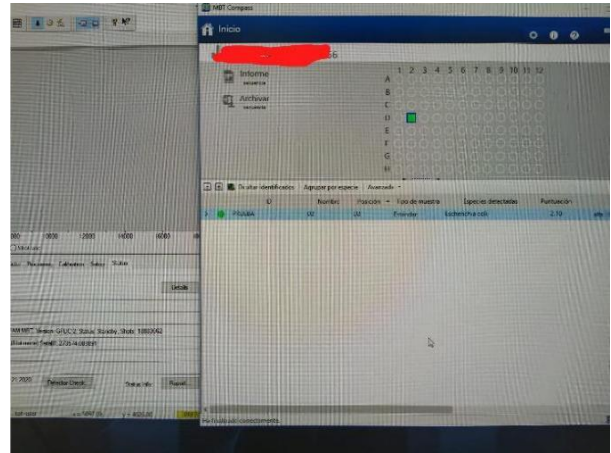


Figura 5: Identificación Bacteriana

Una vez identificada la especie bacteriana, se realizan diferentes antibiogramas para confirmar el mecanismo de resistencia y estudiar su fenotipo.

En el caso de que las colonias que hayan crecido en el Chromagar MRSA2 tengan una coloración azul, existe la posibilidad de que se haya producido un crecimiento de SARM, por ello se realizará un cultivo en medio Müller Hinton disco placa con 4 discos diferentes, cada uno de ellos impregnado por un antibiótico: tetraciclina, ácido fusídico, mupirocina y cefoxitina. Después, se observarán halos de inhibición y se procederá a su medición, comparando el tamaño de los mismos con los datos de referencia del comité EUCAST, pudiendo confirmar así la resistencia o sensibilidad que presentan a los 4 antibióticos (35).

Por otro lado, las bacterias que mostraron crecimiento en el medio Chromagar ESBL son bacterias potencialmente productoras de BLEE y/o AmpC, por ello, se realiza también un antibiograma en medio Müller Hinton mediante tiras E-Test. En estas tiras se añaden 4 antibióticos en un extremo y los mismos 4 antibióticos junto con un inhibidor en el otro. Los antibióticos utilizados serían los siguientes: cefotaxima, ceftazidima y cefepime, utilizando al ácido clavulánico como inhibidor, y por otro lado al antibiótico cefotetan utilizando a la cloxacilina como inhibidor. Según como sea la formación de dichos halos y comparando y midiendo sus valores, se podrá inferir la presencia de un tipo de resistencia u otro o la ausencia de las mismas.

Por último las colonias que han mostrado crecimiento en el medio Chromagar CBP son potencialmente productoras de carbapenemasas. Para la confirmación de la presencia de este mecanismo de resistencia, se realiza un antibiograma en medio Müller Hinton con los siguientes discos compuestos: un disco de meropenem, otro disco de meropenem impregnado con

cloxacilina, otro disco de meropenem con ácido dipicolínico y otro de meropenem con temocilina.

La interpretación de los resultados obtenidos se realiza mediante la medición del tamaño de los halos, observando el número de diluciones en las que el antibiótico o el antibiótico junto a su inhibidor son capaces o no de inhibir el crecimiento de la bacteria.

Según sean los resultados observados en los distintos antibiogramas en medio Müller Hilton se identificará la especie bacteriana, la presencia de mecanismos de resistencia y el fenotipo de los mismos.

Para finalizar, una vez se ha hallado el mecanismo de resistencia de la especie bacteriana, se procede mediante Inmunocromatografía a la detección de la beta-lactamasas implicada en dicho mecanismo de resistencia.

Cabe destacar también, que además de las bacterias estudiadas en el programa Resistencia Zero, se decidió incluir una serie de especies bacterianas que aparecieron con gran frecuencia en los pacientes analizados en la presente revisión, estas serían: *E. faecalis*, *E. faecium* y *E. cloacae*, las cuales fueron incluidas en el presente estudio dada su resistencia intrínseca a cefalosporinas de tercera generación, antibióticos utilizados empíricamente durante la pandemia, como se mencionó con anterioridad.

4. Resultados

Para la realización de este estudio se incluyeron en una base de datos un total de 340 muestras diferentes, estas procedieron de 128 pacientes positivos en SARS-CoV-2. La recogida de dichas muestras se realizó desde el de 17 marzo de 2020 hasta de 3 febrero de 2021.

Del total de muestras analizadas se obtuvieron 162/340 (47,6%) mediante FTH, y 178/340 (52,3%) de muestras clínicas. Las 178 muestras clínicas correspondieron a un total de 86 pacientes, apareciendo por tanto infección en un 67% de los 128 pacientes analizados totales.

Las 162 muestras obtenidas mediante FTH correspondieron a los 42 pacientes analizados restantes, siendo por tanto un 33% de los pacientes analizados en los que se observó colonización pero no infección.

Por otra parte, la distribución de las especies bacterianas estudiadas fue la siguiente:

- *Pseudomonas aeruginosa* 125/340 (36,8%)
- *Enterobacter cloacae* 7/340 (2,1%)
- *Enterococcus faecium* 22/340 (6,4%)
- *Enterococcus faecalis* 25/340 (7,3%)
- *Escherichia coli* 20/340 (5,8%)
- *Klebsiella aerogenes* 28/340 (8,2%)
- *Klebsiella pneumoniae* 86/340 (25,3%)
- *Klebsiella variicola* 5/340 (1,5%)
- **SARM** 22/340 (6,4%)

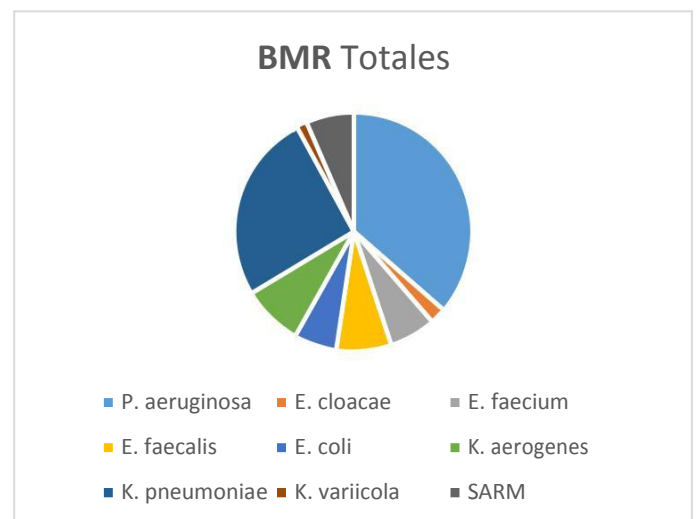


Gráfico 1

En el Gráfico 1 se muestra el % de cada especie bacteriana en el total de muestras analizadas: 340.

- *Pseudomonas aeruginosa* 94/178 (52,8%)
- *Enterobacter cloacae* 6/178 (3,4%)
- *Enterococcus faecium* 19/178 (10,6%)
- *Enterococcus faecalis* 25/178 (14%)
- *Escherichia coli* 1/178 (0,6%)
- *Klebsiella aerogenes* 7/178 (3,9%)
- *Klebsiella pneumoniae* 14/178 (7,8%)
- *Klebsiella variicola* 0/178 (0%)
- **SARM** 12/178 (6,7%)

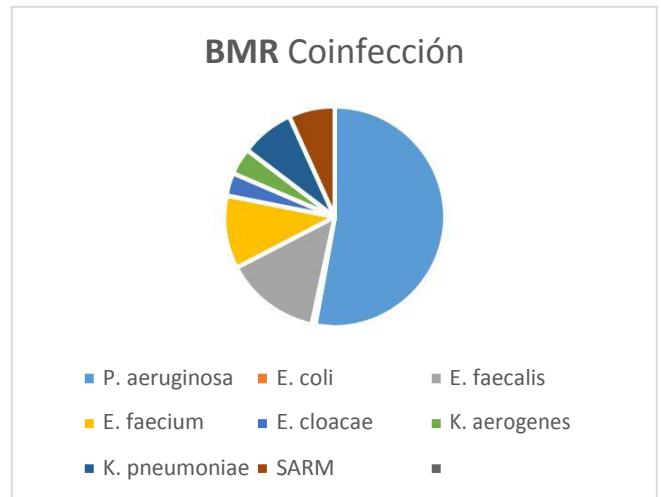


Gráfico 2

En el Gráfico 2 se representa el % de cada especie bacteriana que creció en muestra clínica, del total de 178 muestras clínicas incluidas.

Del total de 128 pacientes analizados, se vieron infectados un total de 86 pacientes, la distribución según la especie bacteriana responsable de dichas infecciones se expone en el siguiente Gráfico 3.

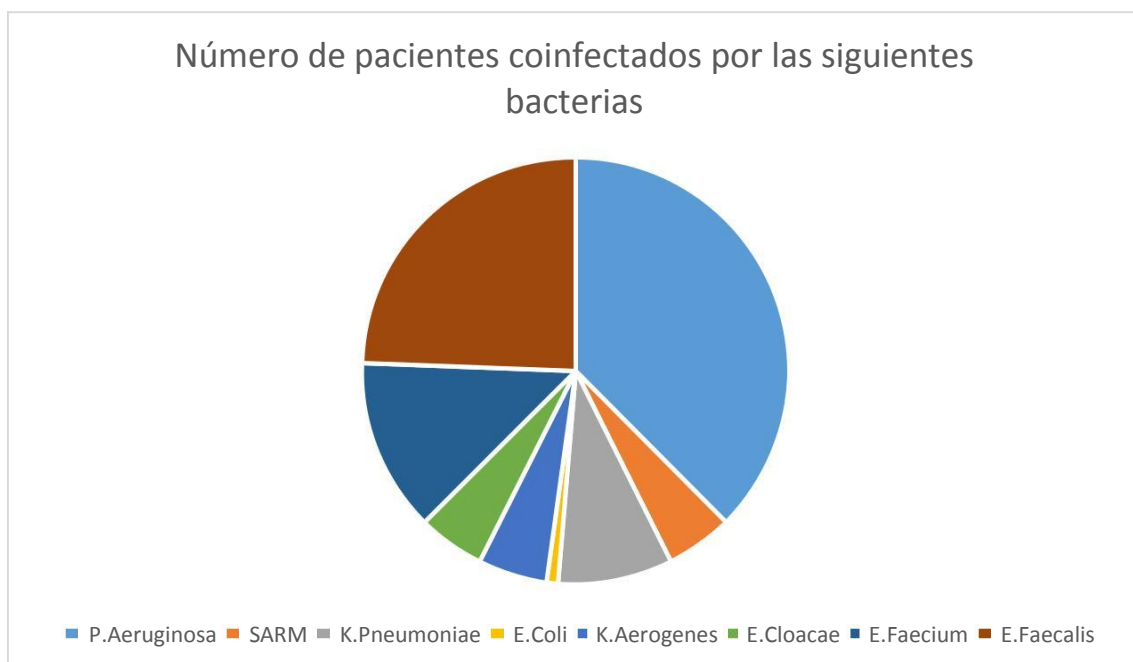


Gráfico 3

Como se puede observar en dicho gráfico, las bacterias de mayor relevancia implicadas en estas coinfecciones fueron las siguientes:

1º *P. aeruginosa*: 37 pacientes con 94 muestras clínicas

2ª *E. faecalis*: 24 pacientes con 25 muestras clínicas

3ª *E. faecium*: 13 pacientes con 19 muestras clínicas

4ª *SARM*: 11 pacientes con 12 muestras clínicas

5ª *K. pneumoniae* 9 pacientes con 14 muestras clínicas

Dado que se vieron infectados 86 pacientes con un total de 178 muestras positivas, podemos observar que hubo varias muestras positivas para una misma bacteria en cada paciente y que hubo pacientes que padecieron infección por más de una especie bacteriana.

4.1 Resultados según especie bacteriana y mecanismos de resistencia hallados

Como se ha señalado, las especies *E. faecalis*, *E. faecium* y *E. cloacae* no son objetivo de estudio del programa de Resistencia Zero, no constando por tanto nunca en muestras FTH y no estudiándose sus resistencias. El hecho de incluir a estas tres especies se debe a la resistencia intrínseca a β -lactámicos que presentan, siendo principalmente resistentes a las cefalosporinas(36). Las implicaciones que estas resistencias han podido tener en lo observado en el presente estudio se analizan más adelante.

Del resto de especies bacterianas se tuvieron en cuenta dos criterios para incluirlas: crecimiento en muestra FTH de programa de resistencia Zero siempre que presentasen uno de los mecanismos de resistencia que son objeto de estudio del programa. Por otro lado, se incluyó cualquier especie que creció en muestra clínica, independientemente de presentar mecanismo de resistencia o no.

De las bacterias analizadas que si son objeto de estudio del programa Resistencia Zero, se encontraron los siguientes resultados según la especie bacteriana:

P. aeruginosa: se hallaron 5 muestras FTH en las que creció *P. aeruginosa* en la que apareció la producción de carbapenemasas, de tipo VIM en el 100% de los casos. Dado que no

se halló ninguna muestra clínica con *P. aeruginosa* con producción de carbapenemasas como mecanismo de resistencia, podemos concluir que ninguna de estas 5 muestras en las que se aisló *P. aeruginosa* como microorganismo colonizador provocó infección. Además, se incluyeron 26 muestras en las que creció *P. aeruginosa* en muestra FTH en las que finalmente no se halló ningún mecanismo de resistencia, sin embargo, estas se incluyeron debido a que mostraron un crecimiento inicial en el medio cromogénico CBP, sin embargo, no se pudo comprobar la existencia de mecanismos de resistencia adquirida como la producción de carbapenemasas al realizarles el antibiograma en medio Müller-Hilton (véase apartado *Material y métodos*)

Por otro lado, en las 94 muestras clínicas en las que apareció *P. aeruginosa*, se halló *P. aeruginosa* XDR en 46 muestras, un 49% de las veces en las que la *P. aeruginosa* provocó infección, viéndose infectados un total de 28 pacientes por *P. aeruginosa* XDR. En las 48 muestras clínicas restantes en las que creció *P. aeruginosa* no se encontró ningún mecanismo de resistencia adquirido, provocando infección en 20 pacientes.

E. coli: esta enterobacteria creció en 20 muestras. En 19 de ellas fue en muestras FTH presentando como mecanismo de resistencia adquirido la producción de BLEE en todos los casos, siendo además fue del tipo CTX-M en 4/19. En las 15 restantes no se especificó el tipo de BLEE. Se aisló *E. coli* en una muestra clínica sin encontrarse ningún mecanismo de resistencia adquirido relevante.

SARM: esta bacteria mostró crecimiento en un total de 22 muestras, 10 de ellas en muestra FTH y 12 de ellas en muestra clínica. Como se señaló con anterioridad, los *Staphylococcus aureus* sensibles a meticilina que crecieron en muestras FTH, al no ser motivo de estudio por parte del programa Resistencia Zero, no se incluyeron en nuestro estudio. Además, todos los *Staphylococcus aureus* que crecieron en muestra clínica fueron *SARM*.

K. pneumoniae: mostró crecimiento en 86 muestras, 14 de ellas fue en muestra clínica y las 72 restantes en muestras FTH. El mecanismo de resistencia hallado en las 14 muestras clínicas fue el siguiente: en 2 muestras no consta ningún mecanismo estudiado, en las 12 restantes se halló la producción de BLEE, siendo de tipo CTX-M en 6 de ellas, un 50%. Por otro lado, de las 72 muestras FTH restantes los mecanismos de resistencia hallados fueron los siguientes: se encontró la producción de AmpC plasmídicas en una única muestra, además se sobreañadió la pérdida de porinas como mecanismo de resistencia. En las 71/72 muestras restantes, se halló la producción de BLEE como mecanismo de resistencia, siendo esta de tipo

CTX-M en 37 de las ocasiones. Además, se sobreañadió la pérdida de porinas como mecanismo de resistencia en un total de 6 muestras.

K. aerogenes: apareció en un total de 7 muestras clínicas y 21 muestras FTH. El mecanismo de resistencia hallado en las 7 muestras clínicas no consta en 5 de 7 muestras, en las 2 restantes se encontró la producción de AmpC como mecanismo de resistencia, sobreañadiéndose en una de esas dos muestras la pérdida de porinas. En las 21 muestras FTH restantes no se halló mecanismo de resistencia en 1 muestra, esta se incluyó debido a un crecimiento inicial en el medio Chromagar ESBL no apareciendo mecanismo de resistencia finalmente al realizar cultivo con antibiograma en medio Müller Hilton (véase material y métodos). También se encontró una muestra con producción de BLEE. Por último, en las 19 muestras restantes se halló como mecanismo de resistencia la producción de AmpC, al cual se le sobreañadió la pérdida de porinas en 11 ocasiones.

K. variicola: esta *Klebsiella* creció en 5 muestras FTH y en ninguna muestra clínica. Se identificó como mecanismo de resistencia la producción de BLEE en todos los casos, siendo de tipo CTX-M en 3 muestras.

Independientemente de la especie bacteriana, se hallaron los mecanismos de resistencia objeto de estudio del programa Resistencia Zero en el siguiente número de muestras:

- Producción de BLEE : 108 muestras
- Producción de AmpC: 22 muestras
- Producción Carbapenemasas: 5 muestras
- Resistencia a meticilina : 22 muestras

Estos mecanismos aparecieron en diferentes especies, encontrándose producción de BLEE en especies como *E. coli*, *k. pneumoniae* y *k. aerogenes*, por su parte la producción de AmpC se halló en *k. aerogenes* y *k. pneumoniae*, la producción de carbapenemasas en *P. aeruginosa* y la resistencia a meticilina en el *Staphylococcus aureus*.

4.2 Análisis por temporalidad

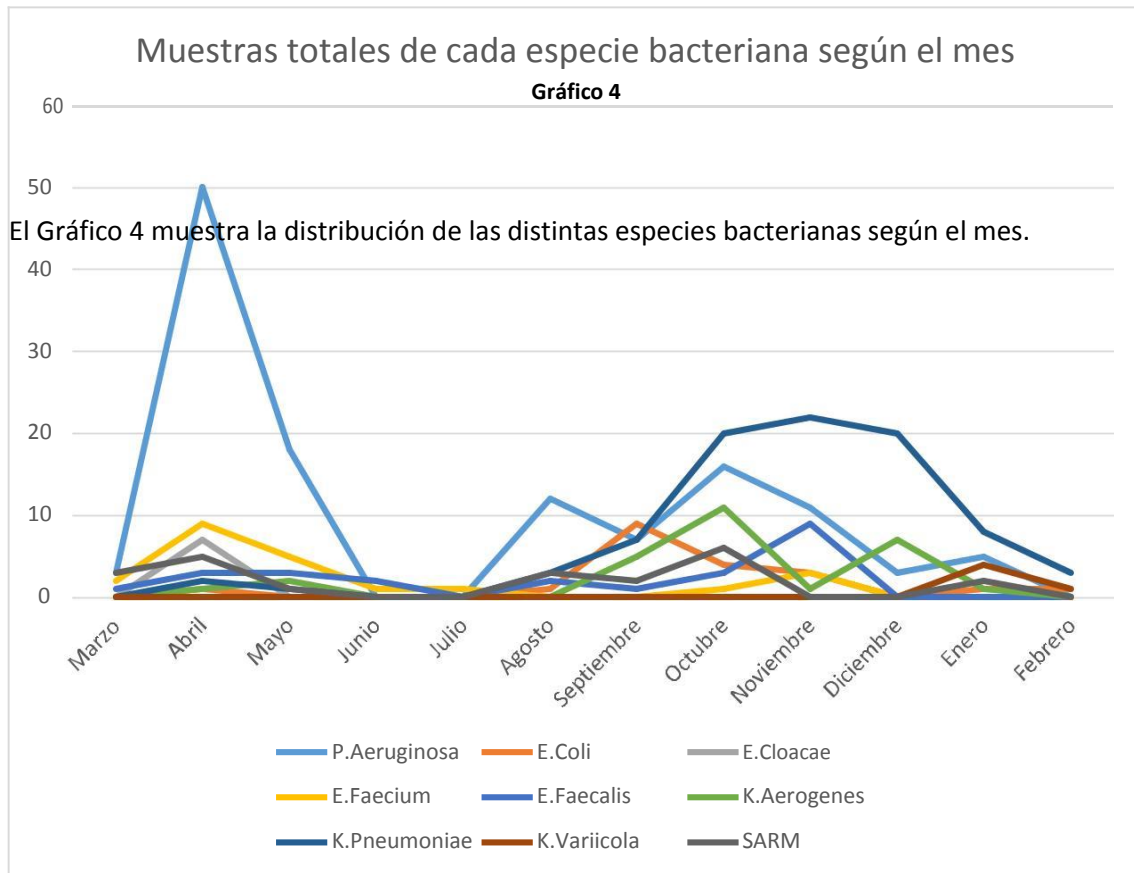


Gráfico 4

En el gráfico 4 se observan globalmente como han ido aislándose las bacterias resistentes a lo largo de las distintas olas epidémicas. Se pueden identificar dos picos epidémicos principales. El primero tuvo lugar desde el mes de marzo de 2020 hasta el mes de junio de 2020. El segundo pico tuvo lugar desde los meses de septiembre de 2020 a enero de 2021. En el primer pico se observa un aumento significativo de *Pseudomonas aeruginosa*, aumento de *E. faecium* y de *E. cloacae*, las tres con resistencia intrínseca a las cefalosporinas de tercera generación, antibiótico utilizado como tratamiento empírico. Se demuestra que la presión selectiva de cefalosporinas seleccionó bacterias resistentes al mismo.

A pesar de que la presencia de *P. aeruginosa* fue constante durante todo el estudio, se destaca una menor participación después de los meses iniciales, recobrando cierta importancia en los meses de octubre a diciembre.

En el segundo pico mencionado, de septiembre de 2020 a enero de 2021, además de la importante presencia de *P. aeruginosa* ya mencionada, destaca la aparición de *K. aerogenes* y

K. pneumoniae, cuya mayor importancia en cuanto al número total de muestras se refiere apareció en aquellas fechas

El resto de especies bacterianas presentaron un crecimiento constante durante todo el estudio sin que se observasen picos importantes en ninguna de ellas.

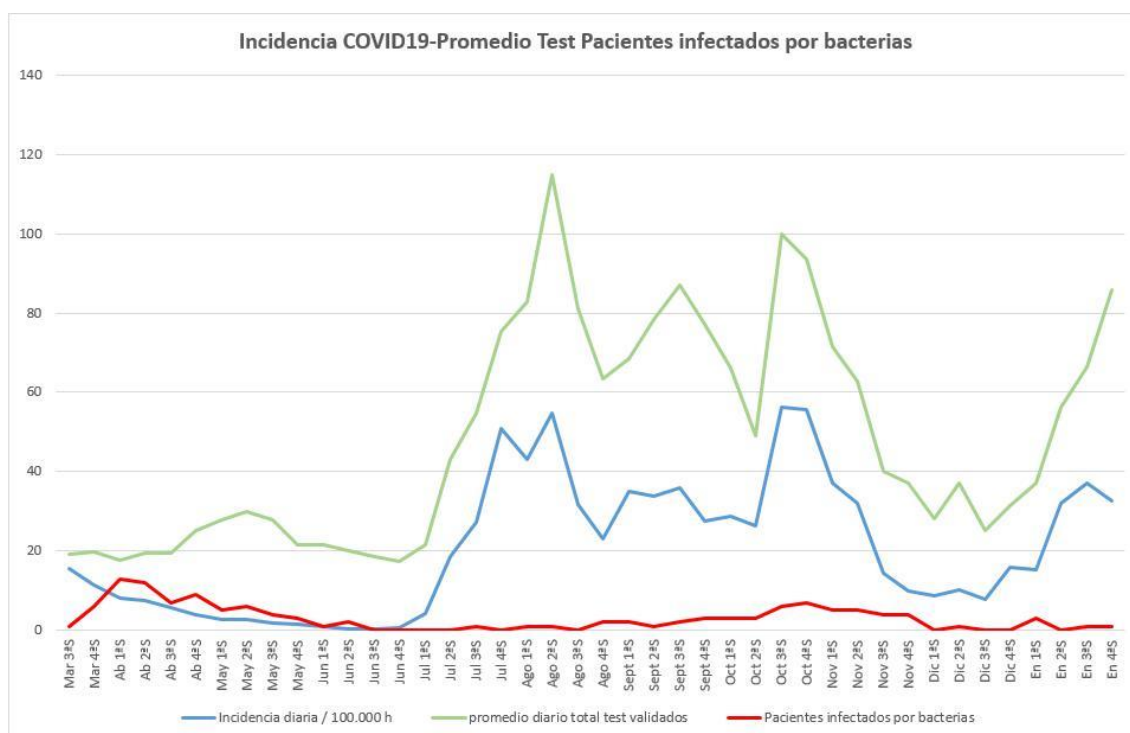


Gráfico 5

En el Gráfico 5 se han incluido los datos recogidos por el servicio de información para la gestión del Hospital Clínico Universitario de Zaragoza, datos accesibles en la web del hospital clínico (37). Los datos proporcionados por gestión se han combinado con nuestros datos de coinfecciones proporcionando en el mismo gráfico tres tipos de datos analizados semanalmente: número total de pacientes coinfectados por bacterias resistentes, incidencia diaria de COVID-19 por cada 100.000 habitantes y promedio diario total de test PCR validados. Destacar que el aumento de bacterias resistentes en la pandemia no coincide en el tiempo con el aumento de la incidencia de pacientes con COVID. Esto es normal porque las coinfecciones tienen lugar en pacientes de larga estancia y más frecuentemente en pacientes que han terminado en UCI, demostrando que las coinfecciones van posteriores en tiempo a los ingresos. El primer aumento destacado de bacterias resistentes tuvo lugar a mediados de abril. Estos pacientes eran los ingresados en marzo y que llevaban una media de estancia alta en el hospital

llegando a coinfectarse con las bacterias estudiadas. El aumento de bacterias resistentes observado en octubre y noviembre es debido a la alta incidencia de pacientes COVID mostrada en agosto y septiembre.

Basándonos en la incidencia de pacientes que padecieron COVID-19, se pueden destacar cuatro ondas epidémicas totales, desde marzo de 2020 hasta finales de enero de 2021. Las características de las mismas han diferido en todas las variables analizadas, tanto en la incidencia semanal por cada 100.000 h como en el número de test promedios realizados así como en el número de pacientes que se vieron coinfectados por bacterias.

A continuación, se expone un análisis cuantitativo y cualitativo de cada una de las cuatro oleadas:

1ª Oleada

- Duración: 3ª semana de marzo - 4ª semana de mayo. Total 10 semanas
- Incidencia media semanal COVID-19: 59,6 por cada 100.000h
- Media semanal de test realizados: 1592,5 test validados
- Total pacientes coinfectados por bacterias: 35 pacientes
- Bacteria más hallada: *P. aeruginosa*

En la primera onda epidémica con una duración aproximada desde la segunda semana de marzo hasta la última semana de mayo se vieron coinfectados un total de 35 pacientes con un total de 113 muestras clínicas. La media de pacientes que sufrieron coinfección bacteriana fue de 6,6 semanal. En ese mismo periodo la incidencia semanal media por cada 100.000 h fue de 59,6 con una media de test realizados semanal de 1592,5 test validados. Por otro lado, la bacteria más hallada en esta primera oleada fue la *P. aeruginosa*, infectando a un total de 19 pacientes, siendo hallada en 71 muestras clínicas. De estos 19 pacientes que se vieron infectados por *P. aeruginosa*, se encontró la multirresistencia (XDR) como mecanismo de resistencia en 14 de ellos, un 73% del total. En los 5 pacientes restantes que se vieron infectados por *P. aeruginosa* no se halló ningún mecanismo de resistencia.

2ª Oleada

- Duración: 1ª semana de julio – 4ª semana de agosto. Total 8 semanas
- Incidencia media semanal: 221,2 por cada 100.000 h

- Media semanal de test realizados: 3759 test validados
- Total pacientes coinfectados por bacterias: 5 pacientes
- Bacteria más hallada: *E. faecalis*

En esta segunda onda epidémica se vieron infectados 5 pacientes, siendo el *E. faecalis* la bacteria más frecuentemente hallada produciendo infección en 2 pacientes. Cabe señalar que no se halló ningún mecanismo de resistencia para esta bacteria. En esta segunda onda epidémica la incidencia semanal por cada 100.000h ascendió hasta 221,2, además la media de test validados semanal fue de 3759. La segunda onda epidémica difiere de la primera que no estábamos confinados y había que hacer estudios de contactos por cada positivo que salía. Además, las técnicas de diagnóstico habían mejorado y los laboratorios tenían más capacidad de análisis. De aquí que los números son más altos tanto el número de test realizados como de incidencia. Sin embargo, el número de coinfecciones fue significativamente menor que en la primera onda.

3ªOleada

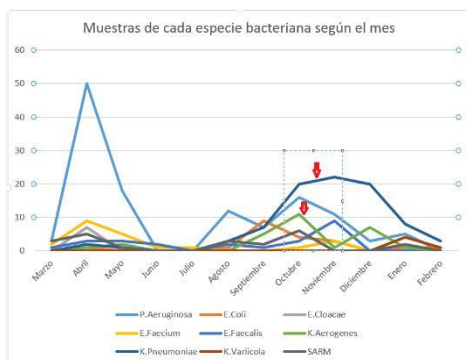
- Duración: 2ª semana de octubre – 4ª semana de noviembre. Total 6 semanas
- Incidencia media semanal: 239,4 por cada 100.000 h
- Media semanal de test realizados: 4725 test validados
- Total pacientes coinfectados por bacterias: 27 pacientes
- Bacteria más hallada: *E. faecalis*

En esta tercera oleada de contagios, se vieron coinfectados por bacterias un total de 27 pacientes con un total de 36 muestras clínicas. La bacteria más hallada fue *E. faecalis*, provocando infección en un total de 12 pacientes, no hallándose ningún mecanismo de resistencia. Además, la incidencia semanal media de COVID-19 fue de 239,42 con una media semanal de test validados de 4725. La capacidad de los laboratorios siguió aumentando lo que se refleja en el número de test realizados.

Cabe destacar que además de *E. faecium*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* aparecieron con gran relevancia, provocando infección en un total de 6,6 y 4 pacientes respectivamente cada una de ellas.

Además, durante esta 3ª onda epidémica se produjo un aumento importante en cuanto al número de muestras en las que se hallaron las especies bacterianas *k. pneumoniae* y *k. aerogenes*. Este aumento pudo ser secundario al gran aumento de incidencia de COVID-19 en los meses de agosto y septiembre.

Se hallaron 42 muestras de *k. pneumoniae*, un 49% del total de 86 muestras en las que creció durante todo el estudio y 12 muestras de *k. aerogenes*, un 43% del total de 28 muestras en las que creció. Ambas, como se observa en el gráfico 4 fueron, junto a la *p. aeruginosa* las más importantes en aquellos meses en cuanto al número total de muestras positivas se refiere.



En la siguiente figura 6 adjuntada se puede observar el aumento en el número de muestras de ambas especies bacterianas, señaladas con flechas de color rojo, mostrando las curvas de crecimiento de *k. aerogenes* (color verde) y de *k. pneumoniae* (color azul oscuro)

Figura 6

4ª Oleada

- Duración: 3ª semana de diciembre- 4ª semana de enero. Total 6 semanas
- Incidencia media semanal: 163,8 por cada 100.000
- Media semanal de test realizados: 3520 test validados
- Total pacientes coinfectados por bacterias: 5 pacientes
- Bacteria más hallada: *P. aeruginosa*

En la cuarta y última oleada analizada, se vieron coinfectados un total de 5 pacientes, con un total de 6 muestras clínicas. La única bacteria que participó en estas infecciones fue *P. aeruginosa*, siendo por tanto la más hallada en esta última oleada. El estudio de resistencias fue negativo, no hallándose por tanto ninguna resistencia en las *P. aeruginosa* halladas. Por último, la incidencia semanal media fue de 163,8 y la media semanal de test validados fue de 3520.

Si nos fijamos exclusivamente en el número total de pacientes coinfectados por bacterias, solo podríamos destacar una presencia importante de estas infecciones en dos

oleadas de cuatro, siendo la primera oleada, con una extensión aproximada desde la 2ª semana de marzo a la última semana de mayo, y la tercera oleada con una extensión desde la 2ª semana de octubre a la 4ª semana de noviembre. Esto es así dado que el número de pacientes coinfectados fue muy superior al de las dos ondas restantes, siendo como se mencionó con anterioridad de 35 pacientes en la primera oleada y de 27 pacientes en la tercera oleada, apareciendo solo 5 pacientes infectados en la segunda y cuarta oleadas.

A pesar de que la primera oleada se observó el mayor número de pacientes coinfectados, la incidencia de COVID-19 fue la más baja de las cuatro oleadas, siendo la incidencia en aquella primera oleada fue de 59,6, muy inferior a la incidencia recogida en las tres siguientes oleadas: 221'2 ,239'4 y 163'8 respectivamente. A pesar de que la incidencia fue inferior en la primera oleada, también cabe destacar que la media de test realizados fue también inferior en aquella primera oleada con respecto a las tres oleadas restantes, siendo de 1592,5 test semanales validados en la primera oleada y de 3759 ,4725 y 3520 en las tres siguientes oleadas respectivamente, lo cual pudo justificar una incidencia inferior a la que existía en realidad.

En resumen, la presencia de bacterias resistentes en pacientes infectados por el Sars-CoV-2 que ingresaron en UCI en el HCU de Zaragoza ha sido constante durante toda la pandemia, a pesar de ello, la evolución ha ido modificándose a medida que avanzaba la pandemia, cambiando a la vez que cambiaban las características de la misma (incidencia de COVID, mayor potencia de los laboratorios pudiendo validar más test diagnósticos...). Por su parte, las bacterias presentes en estas muestras también han ido variando, con diferente predominio de unas u otras especies según el tiempo analizado del estudio.

Los impactos y la magnitud de los mismos que la pandemia por COVID-19 haya podido causar en la selección de bacterias resistentes en los hospitales a nivel mundial son aún desconocidos y serán probablemente objeto de estudio en los años venideros.

5. Conclusiones

1. Las especies bacterianas halladas en las muestras analizadas en los pacientes COVID-19 que precisaron ingreso en las UCIs del HCU fueron las siguientes: *Pseudomonas aeruginosa*,

Enterobacter cloacae, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola* y SARM.

2. La especie bacteriana que más veces mostró crecimiento en el total de muestras analizadas fue la *P. aeruginosa*, apareciendo en un 37% de las muestras analizadas. Además la *P. aeruginosa*

fue también la especie bacteriana que mayor número de infecciones produjo, viéndose infectados por la misma un total de 37 pacientes, un 43% del total de pacientes estudiados. Su mecanismo de resistencia más frecuentemente presentado fue la Resistencia extensa (XDR).

3. Todas las especies bacterianas cuyos mecanismos de resistencia son objeto de estudio del programa Resistencia Zero fueron halladas en las muestras estudiadas, encontrándose muestras con especies productoras de BLEE, AmpC, Carbapenemasas y especies que mostraron resistencia a la meticilina. De todos ellos, el mecanismo más hallado fue la producción de BLEE, apareciendo en un total de 108 muestras, un 32% del total de 340 muestras analizadas. Además, se encontraron pacientes infectados por especies bacterianas que presentaron estos mecanismos de resistencia a excepción de la producción de carbapenemasas, el cual solo se halló en colonización de los diferentes pacientes.

4. La presencia de bacterias resistentes en muestras totales ha sido constante durante la pandemia, pero se destacan principalmente dos picos en cuanto a la incidencia de las mismas, el primero desde marzo a mayo de 2020 y el segundo desde septiembre de 2020 a enero de 2021. Las especies predominantes han ido modificándose según el tiempo analizado del estudio. Los primeros meses, de marzo a mayo existió un gran predominio de *P. aeruginosa*, la cual perdió importancia a medida que avanzaba la pandemia, recobrando importancia en los meses de octubre a diciembre de 2020, coincidiendo con la segunda. En el segundo pico analizado, además de la presencia importante de *P. aeruginosa* ya mencionada, se produjo un predominio de las especies *k. pneumoniae*, siendo la que mayor número de muestras positivas presentó y *k. aerogenes*, siendo la tercera en importancia en aquellas fechas.

El resto de especies bacterianas aparecieron de una forma uniforme, con una presencia de menor relevancia que las mencionadas con anterioridad y sin presentar picos destacables ninguna de ellas.

5. El uso de la ceftriaxona como antibiótico empírico pudo provocar una presión selectiva seleccionándose bacterias resistentes al mismo, por ello se produjo un aumento en la presencia de las especies bacterianas *E. faecium*, *E. faecalis* y *E. cloacae*, pudiendo observarse este aumento a los pocos meses de iniciarse la pandemia tras el comienzo del uso de la ceftriaxona como antibioterapia empírica.

6. Bibliografía

1. Bengoechea JA, Bamford CG. SARS-CoV-2, bacterial co-infections, and AMR : the deadly trio in COVID-19? . *EMBO Mol Med*. 2020;12(7):10–3.
2. Alós JI. Antibiotic resistance: A global crisis. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2015;33(10):692–9.
3. Candel González FJ, Peñuelas M, Lejárraga C, Emilov T, Rico C, Díaz I, et al. Actualización en patología infecciosa 2017. *Rev Esp Quimioter*. 2017;30:1–7.
4. Ruesca RB. Detección de bacterias multiresistentes en muestras de vigilancia epidemiológica.
5. Oteo J, Bou G, Chaves F, Oliver A. Microbiological methods for surveillance of carrier status of multiresistant bacteria. Vol. 35, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2017. 667–675 p.
6. Seyed Hosseini E, Riahi Kashani N, Nikzad H, Azadbakht J, Hassani Bafrani H, Haddad Kashani H. The novel coronavirus Disease-2019 (COVID-19): Mechanism of action, detection and recent therapeutic strategies.
7. dos Santos WG. Natural history of COVID-19 and current knowledge on treatment therapeutic options. *Biomed Pharmacother*. 2020;129.
8. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*
9. Intravenosas I, Recomendaciones AI, li A, Ayuda AIII, Iv A. Manejo clínico de pacientes con Covid-19 en el Hospital Clínico Universitario de Zaragoza. 2020;1–31.
10. Perrone LA, Plowden JK, García-Sastre A, Katz JM, Tumpey TM. H5N1 and 1918 pandemic influenza virus infection results in early and excessive infiltration of macrophages and neutrophils in the lungs of mice. *PLoS Pathog*. 2008;4(8).
11. Bouros D, Alexandrakis MG, Antoniou KM, Agouridakis P, Pneumatikos I, Anevlavis S, et al. The clinical significance of serum and bronchoalveolar lavage inflammatory cytokines in patients at risk for Acute Respiratory Distress Syndrome. *BMC Pulm Med*. 2004;4:1–9.
12. Sáenz Morales OA, Rubio AM, Yomayusa N, Gamba N, Garay Fernández M. Coagulopatía en la infección por el virus SARS-CoV-2 (COVID-19): de los mecanismos fisiopatológicos al diagnóstico y tratamiento. *Acta Colomb Cuid Intensivo*. 2020;2.
13. CI H, Intravenosas I, Seguimiento AI, li A, Iv A. Manejo clínico de pacientes con Covid-19 en el Hospital Clínico Universitario de Zaragoza. 2021;
14. Barriere SL. Clinical, economic and societal impact of antibiotic resistance. *Expert Opin Pharmacother*. 2015;16(2):151–3.
15. Davies J. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiologia*. 1996;12(1):9–16.
16. Rawson TM, Zhu N, Ranganathan N, Gilchrist M, Satta G, Cooke G, et al. Antibiotics and COVID19. *Clin Infect Dis*. 2020;
17. Duallyeh N, Chanchiri I, Skjøt-Arkil H, Pedersen AK, Rosenvinge FS, Johansen IS. Colonization with multiresistant bacteria in acute hospital care: The association of prior antibiotic consumption as a risk factor. *J Antimicrob Chemother*. 2020;75(12):3675–81.

18. Mirzaei R, Goodarzi P, Asadi M, Soltani A, Aljanabi H ali abraham, Jeda AS, et al. Bacterial co-infections with SARS-CoV-2. IUBMB Life. 2020;72(10):2097–111.
19. Chen X, Liao B, Cheng L, Peng X, Xu X, Li Y, et al. The microbial coinfection in COVID-19. Appl Microbiol Biotechnol. 2020;104(18):7777–85.
20. Almand EA, Moore MD, Jaykus LA. Virus-bacteria interactions: An emerging topic in human infection. Viruses. 2017;9(3):1–10.
21. Morosini MI, Cercenado E, Ardanuy C, Torres C. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos grampositivos. Vol. 30, Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2012. 325–332 p.
22. Paterson GK, Harrison EM, Holmes MA. The emergence of mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol [Internet]. 2014;22(1):42–7.
23. Calvo, Jorge; Cantón, Rafael; Fernández, Felipe; Mirelis, Beatriz; Navarro F. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos, SEIMC [Internet]. Seimc. 2011. 54 p.
24. Seral C, José Gude M, Javier Castillo F. Emergencia de β -lactamasas AmpC plasmídicas (Pampc ó cefamicinasas): Origen, importancia, detección y alternativas terapéuticas. Rev Esp Quimioter. 2012;25(2):89–99.
25. Navarro F, Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F, Mirelis B. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011;29(7):524–34.
26. Martínez Rojas DDV. Betalactamasas tipo AmpC: Generalidades y métodos para detección fenotípica. Rev la Soc Venez Microbiol. 2009;29(2):78–83.
27. Cercenado E. Laboratory detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* Bacteriología. Rev Esp Quim [Internet]. 2015;28:8–11.
28. Tafur D, Villegas V. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. Infectio. 2018;12(3):217–26.
29. Smith R, Coast J. The true cost of antimicrobial resistance. BMJ. 2013;346(7899).
30. Friedman ND, Temkin E, Carmeli Y. The negative impact of antibiotic resistance. Clin Microbiol Infect [Internet]. 2016;22(5):416–22.
31. Cosgrove SE, Carmeli Y. The impact of antimicrobial resistance on health and economic outcomes. Clin Infect Dis. 2003;36(11):1433–7.
32. Zero PR. existencia ero. :1–55.
33. Albacete CHDE. Preguntas y Respuestas en el Cuidado del Paciente Portador de Gérmenes. 2004;1–24.
34. Sören Schubert K, Kostrzewa M. MALDI-TOF MS in Microbiology. Curr Issues Mol Biol [Internet]. 2017;23:17–20.
35. Skov R, Skov G. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. 2013.
36. Cercenado E. Enterococcus: resistencias fenotípicas y genotípicas y epidemiología en España. Enferm Infecc Microbiol Clin 2011;29(SUPPL. 5):59–65.

37. CI H. HCU Zaragoza Incidencia diaria de Casos Confirmados por PCR de COVID-19. 2020;
38. Veterinaria FDE. Departamento de Sanidad Animal Resistencia a Cefalosporinas en. 2017;