

PROTOCOLOS RED DE LABORATORIOS PARA LA VIGILANCIA DE LOS MICROORGANISMOS RESISTENTES (RedLabRA)

**Amplificación de genes de carbapenemasas**

Aprobado por:	Código:	<b>RedLabRa-I-005</b>
Fecha: 15/02/2021	Ed.:	<b>01</b>
Firma:	Fecha edición:	<b>15/02/2021</b>

**OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN**

La amplificación de genes de carbapenemasas mediante PCR y posterior secuenciación para identificar el tipo de carbapenemasa. Se utilizan cebadores específicos de los siguientes tipos de carbapenemasas: KPC, NDM, VIM, IMP y OXA-48-like, en aislados de pacientes de interés.

**RECURSOS MATERIALES**

Equipos

- Termociclador.
- Tubos eppendorf 0.2 ml.

Materiales

- Agua destilada libre de nucleasas.
- Taq MIX (amplificación).
- Iniciadores específicos del gen de cada carbapenemasa.

**REALIZACIÓN**

1. Realizar un cultivo bacteriano puro en **Agar Müeller-Hinton**.
2. **Extraer el ADN** mediante hervido a 100°C durante 10min.
3. **Amplificar** los siguientes genes utilizando los iniciadores de amplificación que se indican a continuación:

Gen	Iniciador	Posiciones respecto referencia	Secuencia 5'-3'	Longitud del fragmento-Longitud del gen (pb)
KPC	KPC-up	132-151	TGTCACTGTATCGCCGTC	881-1377
	KPC-dn	995-1012	TTACTGCCCGTTGACGCC	
VIM*	VIM-up	155-171	ATGGTGTTTTGGTCGCATATC	507-801
	VIM-dn	643-661	TGGGCCATTCAGCCAGATC	
NDM	NDM-F	18-41	CCATGCGGGCCGTATGAGTGATTG	768-813
	NDM-R	762-785	TCGCGAAGCTGAGCACCGCATTAG	
IMP**	IMP-up	190-210	GAAGGCGTTTATGTTTCATAC	588-854
	IMP-dn	758-777	GTAAGTTTCAAGAGTGATGC	
OXA-48-like	OXA48-TOT-F	2-21	TGCGTGTATTAGCCTTATCG	785-798
	OXA48-TOT-R	766-786	TTTTTCCTGTTTGAGCACTTC	
GES	GES-F	125-144	CTGGCAGGGATCGCTCACTC	564-601
	GES-R	707-725	TTCCGATCAGCCACCTCTCA	

Condiciones de amplificación:

IMP-TOT			KPC-TOT; VIM-TOT; NDM-TOT; OXA-48-like			GES		
T <sup>a</sup>	Tiempo	Ciclos	T <sup>a</sup>	Tiempo	Ciclos	T <sup>a</sup>	Tiempo	Ciclos
95°C	5min	x30	95°C	5min	x30	95°C	15min	x30
95°C	45seg		95°C	45seg		94°C	30seg	
50°C	45seg		60°C	45seg		57°C	90seg	
72°C	45seg		72°C	45seg		72°C	90seg	
72°C	10min		72°C	10min		72°C	10min	
4°C	∞		4°C	∞		4°C	∞	

4. **Purificar y secuenciar** cada tipo de carbapenemasa con los mismos iniciadores usados para la amplificación.

\* En el caso de las carbapenemasas tipo VIM y debido a la mayor frecuencia de los grupos VIM-1 y VIM-2 se utiliza una PCR con iniciadores específicos de cada uno de estos grupos que nos permiten identificar carbapenemasas de estos grupos (VIM-1/VIM-2) sin necesidad de secuenciación.

**Cebadores**

Grupo	Iniciador	Secuencia 5'-3'
VIM-1	Vim1_F	ATGTTAAAAGTTATTAGTAGT
	Vim1_R	CTACTCGGCGACTGAGCG
VIM-2	Vim2_F	ATGTTCAAACCTTTTGAGTA
	Vim2_R	CTACTCAACGACTGAGCG

**Condiciones amplificación**

VIM1/VIM2		
T <sup>a</sup>	Tiempo	Ciclos
95°C	5min	
95°C	45seg	x30
50°C	45seg	
72°C	45seg	
72°C	10min	
4°C	∞	

\*\* Dada la gran variabilidad de las carbapenemasas de tipo IMP, hay algún tipo de IMPs que no se amplifican con los iniciadores indicados (IMP-2-like), en estos casos no incluidos se llevará a cabo la identificación mediante secuenciación de genomas completos (WGS).