



Protocolo de Real Time PCR multiplex para la detección de genes *kpc*, *o48*, *ndm*, *imp* y *vim*

Multiplex	Gen	Rango T°m	Variantes
CBP	blaKPC	88,25-89,57	KPC-2; KPC-3
	blaVIM	83,27-84,04	VIM-2; VIM-36
	blaIMP	76,26-77,12	IMP-8
	blaOXA-48	78,05-79,15	OXA-48; OXA-163
	blaNDM	81,33-82,14	NDM-1; NDM-5

Ciclado
95°C 10 min / 35 ciclos: 95°C 20 seg - 55°C 20 seg - 72°C 45 seg
Curva de Melting
95°C 30seg / 65°C 30 seg - 95°C 30 seg Resolución: 0,2 °C/10 seg

Reactivo	Concentración Final	Volumen p/ 20ul
MeltDoctor™ HRM Master Mix 2X	1X	10 µl
Primers VIM	0,2 µM	0,4 µl (c/u)
Primers NDM	0,4 µM	0,8 µl (c/u)
Primers IMP	0,6 µM	1,2 µl (c/u)
Primers OXA-48	0,2 µM	0,4 µl (c/u)
Primers KPC	0,2 µM	0,4 µl (c/u)
H2O	-	1,6 µl
DNA	-	2 µl

Gen	Nombre		Tamaño
blaKPC	KPC-RT-F	5'-TCGCTAAACTCGAACAGG	785 pb
	KPC-RT-R	5'-TTACTGCCCGTTGACGCCCAATCC	
blaVIM	VIM-F	5'-AGTGGTGAGTATCCGACAG	261 pb
	VIM-R	5'-ATGAAAGTGCGTGGAGAC	
blaIMP	IMP-RT-F	5'-GAGTGGCTTAATTCTCRATC	188 pb
	IMP-UR1	5'-GGYARCCAAACCACTASGTTATCT	
blaOXA-48	O48-RT-F	5'-TGTTTTTGGTGGCATCGAT	177 pb
	O48-RT-R	5'-GTAAMRATGCTTGGTTCGC	
blaNDM	NDM-RT-F	5'-ACACCAGTGACAATATCACCG	82 pb
	NDM-RT-R	5'-TTGGCCTTGCTGTCCTTG	

Referencia
Primers KPC-RT-F; KPC-RT-R; IMP-RT-F; O48-RT-F; O48-RT-R; NDM-RT-F; y NDM-RT-R del trabajo Monteiro et al. JAC,2012 (10.1093/jac/dkr563)