



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO E INVESTIGACIÓN
HOSPITAL GENERAL "DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ"**

**"IDENTIFICACIÓN DE CARBAPENEMASAS DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS DE
INFECCIONES DEL TRACTO URINARIO AISLADAS EN EL HOSPITAL GENERAL "DR. MANUEL
GEA GONZÁLEZ" DURANTE 2017"**

TÉSIS:

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN UROLOGÍA

PRESENTA:

DR. MARIO ENRIQUE ORTEGA GONZÁLEZ

ASESORES:

**DR. CARLOS PACHECO GAHLER
JEFE DE SERVICIO DE LA DIVISIÓN DE UROLOGÍA**

**DR. RIGOBERTO HERNANDEZ CASTRO
JEFE DEPARTAMENTO DE ECOLOGIA DE AGENTES PATÓGENOS**

CIUDAD DE MÉXICO FEBRERO DE 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

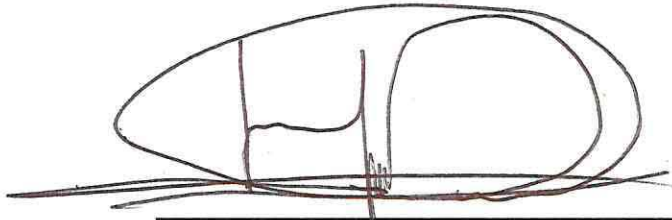
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

HOSPITAL GENERAL "DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ"

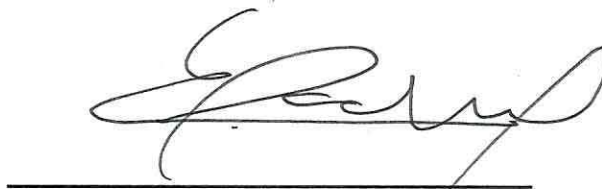
AUTORIZACIONES



Dr. Héctor Manuel Prado Calleros
Director de Enseñanza e Investigación

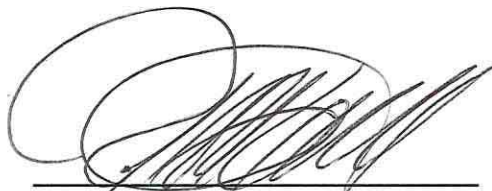


Dr. José Pablo Maravilla Campillo
Subdirector de Investigación Biomédica



Dr. Carlos Pacheco Gahbler
Jefe de la división de Urología
Investigador Principal

Este trabajo de tesis con número de registro: **28-80-2919** presentado por Dr. Mario Enrique Ortega González y se presenta en forma con visto bueno por el tutor principal de la tesis **Dr. Carlos Pacheco Gabhler** con fecha 08/08/2019 para su impresión final.



Dr. José Pablo Maravilla Campillo
Subdirector de Investigación Biomédica



Dr. Carlos Pacheco Gabhler
Investigador Principal

“Identificación de carbapenemasas de bacterias gram negativas de infecciones del tracto urinario aisladas en el Hospital General “Dr. Manuel Gea González” durante 2017”

Este trabajo fue realizado en el Hospital General “Dr. Manuel Gea González” en la División de Urología bajo la dirección de Dr. Rigoberto Hernández Castro con el apoyo Dr. Carlos Pacheco Gahbler y adscritos de la División quienes orientaron y aportaron a la conclusión de este trabajo.

COLABORADORES:



Dr. Rigoberto Hernández Castro
Investigador Principal



Dr. Carlos Pacheco Gahbler
Investigador Principal

ÍNDICE

Resumen	6
Introducción	8
Plantamiento del problema	13
Justificación	13
Objetivos	15
Material y Métodos	15
Resultados	18
Discusion y Conclusiones	19
Bibliografía	23
Figuras	27

RESUMEN

Palabras clave: Carbapenemasas, bacterias gram negativas, infecciones del tracto urinario, CarbaNPTest

Introducción

Las infecciones del tracto urinario (ITU) son las enfermedades infecciosas más frecuentes y el principal agente causal es *Escherichia coli*. La resistencia a múltiples fármacos de amplio espectro en estos microorganismos va en aumento a nivel mundial, principalmente en la familia *Enterobacteriaceae*. OMS realizó alertas sobre la presencia de microorganismos con carbapenemasas (MrCar) nivel mundial. Para 2011, La Red Latinoamericana de Vigilancia En Resistencia a los Antimicrobianos (ReLAVRA) detectó la presencia de microorganismos con carbapenemasas en esta zona geográfica.

Las carbapenemasas son los antimicrobianos beta-lactámicos de mayor espectro, con resistencia a las beta-lactamasas, incluidas las BLEE. La OMS realizó alertas sobre la presencia de microorganismos con carbapenemasas (MrCar) nivel mundial y Latinoamérica. La detección oportuna y efectiva de los MrCar es una cuestión urgente.

Usualmente, la resistencia a carbapenémicos en bacterias Gram negativas ocurre por la combinación de mecanismos de resistencia, en su mayoría por la acción mediada por carbapenemasas, las cuales se dividen en clase A, B C y D. (Fig. 1)

Se ha producido un rápido aumento en la presencia de estas bacterias multirresistentes principalmente por sus dos vías de dispersión: la diseminación vertical de los clones productores de estas enzimas y la diseminación horizontal de los genes que las codifican, vía plásmidos. Estas dos vías pueden combinarse de manera frecuente.

Las infecciones nosocomiales causadas por bacterias Gram negativas multirresistentes son la principal causa de preocupación en hospitales. Entre las bacterias Gram negativas que producen estas infecciones destacan las de la familia *Enterobacteriaceae* y, bacterias Gram negativas no fermentadoras. El tratamiento de esas infecciones es un desafío debido al aumento de ESBL-E. La prueba ESBL NDP (Nordmann/Dortet/Poirel) para la identificación rápida de ESBL-E, basada en la detección de la hidrólisis del anillo-lactámico de cefotaxima, es rápida, sensible y específica con resultados en menos de 40 min, La prueba de NDP es una propuesta útil y eficaz para el tratamiento empírico de la ITU. La situación en México no es conocida en su totalidad, pues son pocos los registros que se tienen acerca de la presencia de estas enzimas.

Objetivo

Identificar las carbapenemasas más frecuentes en bacterias gram negativas de infecciones del tracto urinario aisladas en el Hospital General "Dr. Manuel Gea González" durante 2017

Tipo de estudio

Observacional, descriptivo, transversal y prolectivo

Material y Método

Se realizó una recopilación de orina 110 de pacientes que acudieron a la consulta externa de la división de urología, se purificó las cepas mediante urocultivo confirmados por el medio

cromogénico CHROMagar KPC, se someten a Sistema automatizado Vitek 2 para la identificación de resistencia a antibióticos por concentración mínima inhibitoria (MIC). Se realizó técnica fenotípica de detección carbapenemasas ESBL-E por NDP, se corroboró mediante análisis molecular por técnica de PCR la presencia de genes asociados a resistencia de 4 tipos: *bla*-KPC, *bla*-NDM, *bla*-VIM y *bla*-IMP.

Resultados

Se realizaron 110 pruebas a pacientes con síntomas de tracto urinario inferior e infección de vías urinarias corroboradas con 100,000,000 UFC. Se obtuvieron 56 aislamientos provenientes de hombres y 54 de mujeres, con edad promedio de 61 años de edad.

Se purificaron aislamientos obteniendo cepas mediante urocultivo por técnica de CROMAgar, se realizó técnica de detección carbapenemasas ESBL-E por Carba NP Test resultando positivas en 22.7% (25) pacientes.

De los 25 aislamientos se obtuvieron 21 enterobacterias (17 *E. coli*, 2 *K. oxytoca*, 1 *P. mirabilis*, 1 *C. freundii*) *Pseudomonas aeruginosa* 1, *Acinetobacter baumannii* 2, y *Enterobacter cloacae* 1. Se realizó PCR para presencia de genes carbapenemasas con 100% de co-relación entre la positividad a ESBL-E por Carba NP Test y la resistencia genética obtenida mediante los genes carbapenemasas: IMP 4, KPC 12, NDM 2, y VIM 3.

Conclusiones

La técnica ESBL NPD puede ser una alternativa para toma de decisiones en el tratamiento empírico de ITU, ya que es una prueba rápida útil que permitirá futuros estudios sobre el pronóstico en el tratamiento de infecciones complicadas de vías urinarias.

“IDENTIFICACIÓN DE CARBAPENEMASAS DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS DE INFECCIONES DEL TRACTO URINARIO AISLADAS EN EL HOSPITAL GENERAL “DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ” DURANTE 2017”

INTRODUCCION

Infecciones de vías urinarias

La infección de vías urinarias (IVU) o del tracto urinario ha sido definida por varios organismos a nivel mundial, sin embargo una de las más empleadas es aquella que la define como una alteración anatomofuncional de la mucosa de la vía urinaria, mediada por un agente causal y mecanismos inflamatorios capaces de generar sintomatología urinaria.^(1,2)

Para clasificar dicha entidad existen diferentes criterios:⁽³⁾

Por su duración:

Infecciones de vías urinarias agudas.- Son aquellas que la sintomatología urinaria no tiene una duración mayor de 14 días, generalmente no se asocian a síntomas generales como fiebre o datos de alarma sistémica o inflamación severa de las vías urinarias.

Infecciones de vías urinarias crónicas.- Son aquellas infecciones cuya sintomatología urinaria, tiene una duración mayor de 14 días usualmente semanas o meses las cuales asocian algún tipo de complicación o afectación sistémica.

Infección urinaria recurrente.- Es aquella infección que se presenta nuevamente después de haber sido tratada y curada dentro de a la cual se le ha dado tratamiento se considera que se presenta en menos de 6 meses después de la primera o en 3 ocasiones en el mismo año.

Por su situación anatómica:

Infecciones de vías urinarias Altas.- Son IVU que anatómicamente tienen mayor afección en riñones y uréteres, es decir causan pielonefritis. En general, se considera que este tipo de infección es causada por cepas uropatógenas con quimiotáxis bacteriana hacia órganos urinarios altos ya que la colonización del tracto urinario alto es difícil, por diversos factores como el pH ácido de la orina y la altura del tracto urinario.

Infecciones de vías urinarias bajas.- Se consideran a las IVU cuya afección fisiopatológica radica en vejiga, próstata o uretra, generan cistitis, prostatitis o uretritis

Por su escenario clínico:

Infecciones de vías urinarias no complicadas o simples.- Son aquellas infecciones no se asocian a ninguna anomalía urinaria (Tabla 1) con algunas características fisiopatológicas (Tabla 2).

Infecciones de vía urinarias complicadas.- Cuando la infección se asocia a anomalías del tracto urinario.

Infecciones de vías urinarias recurrentes.- Cuando se ha erradicado una infección con un adecuado tratamiento y a pesar de esto continúe persiste o que existan más de tres episodios en el mismo año.

Triada epidemiológica de la infección de vías urinarias

En las enfermedades infecciosas, el modelo de estudio se compone de una triada epidemiológica de las enfermedades y las IVU no son la excepción, sus componentes se enumeran a continuación.

Huésped

Existen factores que dependen directamente del huésped, se dividen en aquellos que favorecen la infección y los que la evitan.⁽⁴⁾ (Tabla 3) Dentro de los factores que evitan la infección se encuentran las características histológicas del uroepitelio, de tal forma que a excepción de la porción uretral la mucosa del tracto urinario, es considerada como resistente a la colonización bacteriana, debido a que posee mecanismos defensivos antiadhesivos que tienen como objetivo eliminar microorganismos que invaden la vía urinaria. Por otro lado, la orina brinda mecanismos físico-químicos que protegen la vía urinaria gracias a que posee un pH ácido, una elevada osmolaridad, así como altas concentraciones de urea. Se considera que es la primer línea de defensa del tracto urinario por dificultar la supervivencia de microorganismos, además contiene uromucoides inhibidores de la adherencia bacteriana, como la proteína Tamm Horsfall (PTH) glicoproteína rica en manosa que evita la unión de *E. coli* con las uroplactinas, proteínas de la superficie del uroepitelio.⁽⁵⁾ Por otro lado, el uroepitelio es capaz de producir péptidos antimicrobianos como defensinas, lactoferrinas y generar un flujo unidireccional con movimientos peristálticos.

A pesar de esto existen diversas bacterias que son capaces de colonizar el uroepitelio, preferentemente en individuos que presentan características que favorecen la infección, tales como: el reflujo vesicoureteral en sus diferentes grados, alteraciones en el flujo urinario, la edad

ya sea en infantes (niños menores de 1 año), adolescentes o adultos mayores y los problemas en la terapéutica empleada ya sea por retraso terapéutico o incumplimiento del mismo, ya que los estudios han definido que el tratamiento con una ventana terapéutica de inicio dentro de las primeras 12 a 24 horas se asocia a una disminución en la inflamación, infección y cicatrización en la mucosa urotelial. ⁽⁶⁾

Agente

Existe una gama importante de agentes infecciosos con la capacidad de colonizar el tracto urinario que va desde virus, bacterias y hongos; sin embargo, algunos patógenos poseen una mayor capacidad adaptativa para colonizar este tipo de mucosa. ⁽⁷⁾

Se sabe que las bacterias gram negativas causan la mayoría de las IVU. En el 95% de los casos la infección ocurre por vía ascendente del meato urinario, uretra, vejiga, uréteres hasta llegar a los riñones y algunas veces ocurre por diseminación por vía hematógena. A nivel mundial *Escherichia coli* (*E. coli*) es el microorganismo responsable de la mayor parte de las IVU reportado entre el 80-90 %, algunos otros microorganismos asociados incluyen a *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus* y *Pseudomonas aeruginosa*. ^(8,9)

En base a criterios genéticos y clínicos, las cepas de *E. coli* se clasifican en 3 grupos: 1) cepas comensales, 2) cepas patógenas intestinales y 3) cepas patógenas extraintestinales (comúnmente llamadas ExPEC). Las cepas comensales constituyen parte de la microbiota intestinal normal en humanos. ⁽¹¹⁾ Las cepas patógenas intestinales generan procesos inflamatorios en la mucosa intestinal que condicionan enfermedades gastrointestinales. Se reconocen 6 patotipos: cepas enterotoxigénicas (ETEC); enterohemorrágicas (EHEC); enteroinvasivas (EIEC); enteroagregativas (EAEC); enteropatógenas (EPEC); y adherentes difusas (DAEC). Las cepas extraintestinales de *E. coli* (ExPEC) pueden afectar a casi todos los órganos y localizaciones anatómicas, excepto tracto gastrointestinal. Dentro de las ExPEC se encuentran las cepas de *E. coli* uropatógenas (UPEC). ⁽¹²⁾ Este patotipo tiene especial importancia en las IVU ya que son el patotipo evolutivamente adaptado con diferencias sustanciales en genes de virulencia como adhesinas, toxinas, hemolisinas,

aerobactinas, fimbrias tipo P, que invaden de manera específica el epitelio del tracto urinario ocasionando IVU complicadas y recurrentes.⁽¹³⁾

Ambiente

Mundialmente la sociedad ha recurrido a lo largo de su historia a mejorar las condiciones de salud, evitando aquellas conductas que favorecen infecciones y propiciando muchas otras que las disminuyen y que generalmente se basan en la prevención de las enfermedades. Estas conductas de prevención son importantes en las IVU y se toman en cuenta para las conductas ambientales, hábitos higiénicos y dietéticos. Acciones conductuales como el uso de espermicidas, la frecuencia de relaciones sexuales y la automedicación han probado ser factores ambientales que inciden directamente en la presentación de IVU.⁽¹⁴⁾

Consecuencia del proceso infeccioso

Hoy en día los estudios basados en evidencias a nivel mundial conforman las guías terapéuticas para el manejo de enfermedades infecciosas. Actualmente las guías de la sociedad de enfermedades infecciosas sugieren que para el tratamiento empírico de cualquier tipo de IVU, se seleccionen de primera elección fármacos como las quinolonas y fluroquinolonas. Sin embargo, se recomiendan fármacos como TMP-SMX, (trimetropin sulfametoxazol), nitrofurantoina, fosfomicina y amoxicilina con ácido clavulánico como opciones terapéuticas con variaciones en los periodos terapéuticos.^(24,25) Esta guía incluye el uso de técnicas diagnósticas y de tratamiento en conjunción con el uso de urocultivos, antibiogramas y concentraciones mínimas inhibitorias de un fármaco (MIC). Esta última es la concentración mínima necesaria de un antibiótico para inhibir el crecimiento bacteriano y en consecuencia erradicar la bacteria. La técnica permite que mediante varios puntos de corte de concentración de un fármaco se catalogue a una cepa como sensible, intermedia o resistente para varios tipos de fármacos, por lo que entre mayor sea la concentración a la que se pueda exponer a la bacteria sin afectar sus tasas de crecimiento, mayor resistente será la misma. Es por tal motivo que las guías de terapéutica recomiendan usar fármacos a los cuales sea más sensible el patógeno para que su erradicación sea más sencilla, eficaz y a menor plazo.⁽²⁶⁾ Por esta razón el uso de un fármaco al que es sensible la bacteria, con un adecuado tiempo de tratamiento de 7 a 14 días, erradica la infección, consecuentemente

restablecerá la integridad del urotelio, disminuye el proceso inflamatorio hasta la curación, documentándose mediante un urocultivo sin crecimiento bacteriano.

Resistencia al tratamiento

La resistencia a los carbapenémicos es poco frecuente, mucho menor que la reportada por otros beta-lactámicos, sin embargo, en los últimos años se ha incrementado sustancialmente. En general, la resistencia suele presentarse de carácter local y en forma de brotes hospitalarios a pesar de que la incidencia es creciente y en algunos países (Japón, Grecia) y hospitales, puede considerarse endémica.⁽²⁷⁾

La resistencia por parte de los Gram negativos hacia los antibióticos, suele ser una combinación de mecanismos de resistencia, algunos de ellos inherentes a la especie (resistencia intrínseca o natural) y otros adquiridos (por medio de elementos móviles como transposones y plásmidos). En términos generales, los principales mecanismos de resistencia a antibióticos en Gram negativos son: 1) modificación y desactivación del antibiótico por hidrólisis mediada por enzimas; 2) disminución de la permeabilidad del antibiótico a través de la membrana externa debido a la disminución en la expresión de porinas; 3) aumento de la expulsión del antibiótico mediada por la activación de las bombas de flujo, y 4) modificación o mutación del sitio blanco del antibiótico. 5) Vías metabólicas alternas⁽²⁸⁾ (Fig. 2).⁽²⁹⁾

Los beta-lactámicos son un grupo de antibióticos de acción bactericida lenta, con escasa toxicidad y un amplio margen terapéutico. Su espectro incluye bacterias gram positivas, gram negativas y espiroquetas. Son utilizados para el tratamiento de ITU complicadas o para aquellas que comprometen la vida del paciente.⁽³⁰⁾ La presencia de 4 átomos de carbono, denominada anillo betalactámico, define a esta familia de antibióticos y es responsable de la inhibición de la síntesis de la pared celular, también es el principal blanco de resistencia mediante beta-lactamasas⁽³¹⁾.

La detección de los microorganismos productores de carbapenemasas es una cuestión urgente, para la selección de regímenes terapéuticos y para la aplicación de las medidas de control de infección^(34,35).

Recientemente se incorporó un novedoso método que permite realizar la detección de carbapenemasas acortando el tiempo de respuesta. Dicha técnica es conocida como Carba

NP Test, dada a conocer por los franceses Patrice Nordmann y Laurent Poirel en 2012⁽³⁹⁾. En esta técnica, al emplear un buffer de lisis, la carbapenemasa es liberada al medio provocando la hidrólisis del anillo beta-lactámico. La ruptura del anillo trae consigo cambios en el pH del medio, el cual es detectado por un indicador (el rojo de fenol), que vira de rojo a amarillo/naranja (Figura 3). La ventaja de este método es que los resultados pueden interpretarse, a los pocos minutos. La técnica se ha reportado 100% sensible y específica para la familia *Enterobacteriaceae* y 100% específica y 94.4% sensible para *Pseudomonas* spp., portadoras de carbapenemasas.

Las técnicas de detección molecular continúan siendo el estándar de oro en la confirmación de detección enzimática. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite eludir las dificultades asociadas con la detección fenotípica y puede arrojar resultados dentro de periodos cortos de tiempo (4 a 6 horas) y de ser necesaria la identificación precisa de la variante encontrada de carbapenemasa se recurre a la secuenciación o bien la clonación de los genes de resistencia.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

¿Cuáles son las carbapenemasas identificadas con mayor frecuencia en bacterias gram negativas de infecciones del tracto urinario aisladas en el Hospital General “Dr. Manuel Gea González” durante el 2017?

JUSTIFICACIÓN.

La resistencia bacteriana es un grave problema de salud, con fuertes repercusiones en la morbilidad y mortalidad de pacientes hospitalizados y en particular, en pacientes que adquieren infecciones de vías urinarias complicadas. En los últimos años, se ha presentado un número importante de informes donde se reportan brotes de carbapenemasas: enzimas con acción hidrolítica frente a antibióticos de última generación (carbapenémicos), empleados en el tratamiento de infecciones nosocomiales. Las opciones disponibles después de haber fracasado con estos, son pocas y pueden traer consigo problemas nefrotóxicos y hepatotóxicos en el paciente. El principal problema con estas enzimas, es que se encuentran codificadas en cromosomas y elementos móviles, lo que facilita su diseminación en diversos géneros y especies bacterianas. Realizar una detección oportuna e identificar la clase de enzimas que afectan a la población, permite a los sistemas de salud

establecer medidas de control y vigilancia de tal modo, que se evite la propagación a niveles mayores. Las cepas provenientes de asilamientos por infecciones del tracto urinario complicadas, que en su mayoría son causadas por bacterias gram negativas son un reto para el tratamiento, debido a la dificultad del mismo, sobre todo si tienen mecanismos de resistencia antibiótica como con la presencia de betalactamasas, lo cual genera poblaciones en riesgo de complicaciones debido a diversos factores (metabólicos, anatómicos, edad, género) la mayoría de las veces con patologías asociadas, se debe identificar con qué

frecuencia se presentan este tipo de cepas en el Hospital General “Dr. Manuel Gea González” a fin de generar mayor conocimiento biológico sobre los agentes comunes.

OBJETIVO GENERAL.

- Identificar las carbapenemasas más frecuentes en bacterias gram negativas de infecciones del tracto urinario aisladas en el Hospital General “Dr. Manuel Gea González” durante 2017.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Identificar el género y especie de las bacterias gram negativas seleccionadas.
- Determinar la presencia de carbapenemasas mediante la técnica de Carba NP Test en bacterias gram negativas provenientes de infecciones urinarias.
- Identificar la presencia de genes asociados a resistencia a carbapenems (KPC, VIM, NDM, e IMP) por medio de la PCR.

DISEÑO.

Observacional, descriptivo, transversal y prolectivo

MATERIALES Y MÉTODO

Universo de estudio: Cepario del Departamento de Ecología de Agentes Patógenos

Población de estudio:

Cepas de bacterias gram negativas con resistencia fenotípica a carbapenemasas aisladas de pacientes con diagnóstico de infecciones del tracto urinario del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”, en el periodo del 1 de enero al 31 de diciembre del 2017.

Tamaño de la muestra.

Se propone un muestreo no probabilístico con un tamaño de muestra por conveniencia, acotado al periodo de tiempo 2017. Se cuentan con 182 aislamientos de bacterias gram negativas con resistencia fenotípica a carbapenemasas.

Criterios de selección

Criterios de Inclusión.

1. Cultivos viables de las cepas gram negativas

2. Cepas confirmadas con resistencia fenotípica a carbapenemasas

Criterios de exclusión.

1. Cepas almacenadas que no sean recuperables del cepario del Hospital General Dr. Manuel Gea González
2. Cepas contaminadas con otros microorganismos

Definición de variables

Variables Principales		Variables Generales	
Variable	Escala (intervalo, ordinal, nominal)	Variable	Escala (intervalo, ordinal, nominal)
Bacterias Gram negativas	Nominal Politomica <i>(Escherichia, Klebsiella, Acinetobacter, Pseudomonas)</i>		
a. Genero			
b. Especie	<i>(coli, pneumoniae, baumannii, aeruginosa)</i>		
Origen de carbapenemasas por Carba NP Test	Nominal dicotómica a. Cromosomal b. Plasmídico	Edad del paciente	Intervalo discreto Años
Tipo de carbapenemasas	Nominal a. KPC b. VIM c. NDM d. OXA 48 (OXA232-OXA181) e. IMP	Sexo	Nominal a. Femenino b. Masculino

Bacterias Gram negativas Se anotara la identificación bacteriana en se denominan bacterias gramnegativas aquellas que no se tiñen de azul oscuro o de violeta por la tinción de Gram, y lo hacen de un color rosado tenue

Genero Se anotará de acuerdo al tipo, clase, estirpe bacteriana o linaje al que pertenecen

Especie Se anotaran bacterias cuando se identifiquen como un conjunto de organismos o poblaciones naturales capaces de entrecruzarse y producir descendencia fértil,

Origen de carbapenemasas por Carba NP Test: Se anotará de acuerdo a la prueba Carba NP Test como cromosomal cuando el color de buffer rojo torne amarillo después de una hora de exposición de la bacteria con el buffer de lisis con el carbapenemico

Tipo de carbapenemasas: Se anotará posterior a la realización de amplificación de productos de genes por PCR de acuerdo a l peso molecular en pb cuando los fragmentos de genes amplificados (*bla*-KPC, *bla*-NDM, *bla*-OXA48, *bla*-VIM y *bla*-IMP) sean los correspondientes a los productos amplificados (621, 390, 437, 232, y 638 pb) con visualización mediante el fotodocumentador.

Edad: Tiempo medido en años hasta el día de la cirugía.

Sexo: Determinado por género masculino o femenino.

Descripción de procedimientos.

Se tomarán las listas del cepario del departamento de ecología de agentes patógenos (periodo de enero-diciembre de 2017) y se buscarán los fenotipos de cepas resistentes a carbapenemicos aisladas de infecciones de tracto urinario.

Con los números de registro del cepario se revisarán la existencia de cepas viables.

Las muestras almacenadas en ultracongelación (-70°C) en una suspensión de caldo BHI con glicerol 50%, serán extraídas, atemperadas y re-sembradas en placas de agar MacConkey y Trypticase Soya Agar (TSA) + Zn para su posterior análisis fenotípico

Después de seleccionar las cepas y siguiendo el procedimiento descrito por Nordmann, se realizará la prueba de Carba NP Test al total de muestras. En un tubo Eppendorf de 1.5 ml se adicionará 50 microL de buffer de lisis Tris-HCl 20 mM (BPERII, Bacterial Protein Extraction Reagent, Thermo Scientific) y proveniente de medio TSA suplementado con ZnSO₄ a 70 mg/ml, se resuspenderán de 4 a 5 colonias aisladas. Posteriormente se agregarán 100 microL de solución A (Solución de rojo de fenol 0.5% w/v con ZnSO₄ 10mM)

+ imipenem 6 mg/ml. El tubo se someterá a agitación suave por medio de un vortex y se incubará a 37°C. La lectura del Test se llevará a cabo cada 10 min durante 2 h después de incubación (37°C).

La PCR para la identificación de las bandas de interés, se realizará dirigida a los genes *bla*-KPC, *bla*-NDM, *bla*-OXA48, *bla*-VIM y *bla*-IMP empleando el TopTaq™ Master Mix Kit (250) No. de catálogo 200403.

Colocará en un tubo Eppenderof 12.5 microL de Top Taq™ Master Mix, 5 microL de agua estéril, 5 ml de ADN extraído, 1 microL de primer forward y 1 microL de primer reverse, para la identificación de cada gen. Los componentes de la reacción serán mezclados con ayuda del vortex antes de colocarlos en el termociclador. Los primers empleados para la reacción, la secuencia, y los productos de amplificación se describen en la tabla 4:

Los programas empleados en el termociclador serán programados

Programa	Ciclos	Desnaturalización	Alineación	Extensión
NDM	25	94.0°C/30´	53.0°C/30´	72.0°C/50´
VIM	30	94.0°C/30´	52.0°C/40´	72.0°C/50´
IMP	30	94.0°C/30´	52.0°C/40´	72.0°C/50´
KPC	30	94.0°C/45´	58°C/30´	72.0°C/45´
OXA-48	30	94.0°C/30´	53.0°C/40´	72.0°C/50´

Para la visualización de los productos de PCR se utilizaron geles de agarosa al 1.5 %. Estos se mezclaron con buffer de corrida Coral Load Concentratre. Se emplearán controles positivos y negativos en cada corrida y marcador de peso molecular de 100 pb.

Resultados

1.1. ESBL Test y Carba NP Test

Se realizaron 182 aislamientos de los cuales se excluyeron 72 por no cumplir con criterios de inclusion , por lo que al final se realizaron 110 pruebas de aislamientos provenientes de

infecciones de tracto urinario inferior corroboradas mediante urocultivo con una cuenta de 100,000,000 UFC todas ellas con positividad a resistencia BLEE

Se obtuvieron 110 aislamientos bacterianos los cuales se purificaron obteniendo cepas mediante urocultivo por técnica de CROMAgar, mcConkey provenientes de 56 hombres y 54 de mujeres, con edad promedio de 61 años de edad con semejanza en tipos poblacionales.

Se realizó la prueba ESBL Test a las 110 muestras resultando 53 positivas a la misma, la lectura del test se realizó haciendo una comparación directa con controles positivos descritos en la figura 4. Se realizó técnica bioquímica de detección carbapenemasas por Carba NP Test resultando positivas en 22.7%(25) pacientes, las cuales se corroboraron con medio cromogénico CHROMagar KPC.

De los 25 aislamientos se obtuvieron 21 enterobacterias (17 *E. coli*, 2 *K. oxytoca*, 1 *P. mirabilis*, y 1 *C. freundii*) *Pseudomonas aeruginosa* 1, *Acinetobacter baumannii* 2, y *Enterobacter cloacae* 1 (Tabla 4).

Determinación de los genes IMP, VIM, KPC y NDM por medio de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se realizó PCR para presencia de genes carbapenemasas, se amplificaron mediante esta técnica genes KPC, IMP, NDM, VIM mediante los programas ya descritos se obtuvieron productos de 638, 232, 621, y 390 pb respectivamente que se corrieron y visualizaron en geles de agarosa con controles positivos (Figura 5), a razón de: IMP 4, KPC 12, NDM 2, y VIM 3 ver tabla 5. Con un 100% de correlación entre la positividad a Carba NP Test y la resistencia genética obtenida mediante los genes carbapenemasa

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Actualmente existen diferentes métodos de evaluación de aislamiento para detección y caracterización de cepas se realiza por diversos sistemas automatizados, como el de MicroScan, este sistema tiene la característica de tipificar aislamientos y permite detectar aquellas bacterias que presentan resistencia sin importar el mecanismo del mismo es por este motivo que de las 53 muestras que el sistema detectó con resistencia, sólo 25, que representan el 47.1%, resultaron positivos al Carba NP test y confirmados. Como menciona Morubagal R. Et-al ⁽⁴⁰⁾ en su artículo sobre la detección de carbapenemasas en *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas* especies por el test de carbapenemasa descrita por

Nordmann–Poirel en la que comparó con la prueba de Hodge modificada (MHT) en 70 aislamientos resistentes a imipenem productores de carbapenemasa concluyendo que la prueba de Carba NP en comparación con la MHT es una prueba bioquímica simple, rápida y rentable que se puede utilizar en todos los laboratorios para la identificación de bacterias Gram-negativas productoras de carbapenemasas que tienen potencial de amenazar con vida, estos resultados se muestran que el realizar dicha prueba es reproducible y que es una buena alternativa para el estudio de las carbapenemasas, ya que en el presente estudio 25 muestras resultaron positivas a este test con correlación genética

Por otro lado la diferencia entre el resultado del sistema automatizado y el Carba NP Test indica la presencia de mecanismos diferentes a la hidrólisis mediada por las enzimas KPC, VIM, NDM e IMP en el 52% restante, como pueden ser disminución en la expresión de porinas, activación de bombas de eflujo, modificación del sitio blanco o bien, la utilización de enzimas que difieren a las analizadas en esta investigación. Para esta tipificación, deben generarse nuevos estudios para confirmarlos. Los estudios realizados como parte de nuestra investigación, confirman las cifras publicadas al encontrar en todas las muestras con resultado positivo al test, la presencia de un gen asociado a resistencia, lo que lleva a sugerir la utilización de éste en la detección rápida de microorganismos con resistencia a carbapenémicos, siempre y cuando se encuentre apoyada de otras técnicas de detección fenotípica y molecular. La combinación de pruebas fenotípicas rápidas y pruebas moleculares, son herramientas útiles para el diagnóstico de este tipo de microorganismos multiresistentes; como lo demostró Toner G, Russell et-al ⁽⁴¹⁾ en su estudio sobre la detección fenotípica por métodos moleculares y su significancia clínica donde evaluó mediante pruebas de PCR la identificación de bacterias portadoras de los genes de carbapenemasa (similares a blaOXA-48, blaVIM, blaNDM, blaKPC y blaIMP) donde aisló 39 organismos productores de carbapenemasas. Evaluando el tiempo para resultado para pruebas fenotípicas y moleculares que realizó en 4.2 días. La PCR tuvo una sensibilidad y especificidad del 100%. Los genes de las carbapenemasas más comunes fueron blaOXA-48-like (31%), blaVIM (23%) y blaNDM (20%). concluyendo que mediante la combinación de pruebas de detección rápida de Carbapenemasas y pruebas fenotípicas y moleculares en cepas provenientes de pacientes la detección influyó en la toma de decisiones antimicrobianas.

Tomando en cuenta estos resultados y comparándolos con nuestro análisis molecular de las cepas de estudio, donde se mostró la presencia de genes asociados a resistencia de 4 tipos: KPC, VIM, NDM e IMP. La mayoría de los genes detectados corresponden a carbapenemasas de clase A, tipo KPC (9 en *K. pneumoniae*; 1 en *P. aeruginosa* y 1 en *E. coli*). Esta distribución en diversos géneros bacterianos es de esperarse, debido a que el gen KPC se encuentra codificado comúnmente en plásmidos por lo que la transferencia horizontal resulta ser más eficiente. En el año 2013, una publicación de Rodríguez-Zulueta et al. ⁽⁴¹⁾ reporta el primer brote de *K. pneumoniae* productora de KPC en un hospital de la Ciudad de México en muestras provenientes de diversas fuentes, como tracto respiratorio, fluidos biológicos, sangre, heridas quirúrgicas, etc., fuentes bastantes similares a las encontradas en este estudio. Con esta información, podemos observar que existe un antecedente de la presencia de esta carbapenemasa en el Sector Salud y que se ha diseminado, al grado de abarcar otros géneros bacterianos.

Para el caso de las metalo- β -lactamasas, el panorama luce similar, esta clase de enzimas, se ha caracterizado por estar codificadas tanto en plásmidos, integrones así como en el cromosoma y su detección se ha realizado en múltiples microorganismos de géneros y especies diferentes alrededor del mundo. Esto puede explicar el hecho de haberlas localizado en una variedad importante de microorganismos: *E. coli*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*. Los reportes en México son más conocidos; ya se contaba con registros de carbapenemasas VIM e IMP en cepas bacterianas de *P. aeruginosa*, *K. oxytoca*, *K. pneumoniae* y *E. cloacae*. Recientemente se detectó a NDM en una cepa de *Providencia rettgeri*, no obstante, las encontradas en esta investigación, corresponden a las primeras a nivel nacional detectadas en *Klebsiella pneumoniae* y *Acinetobacter haemolyticus*.

El inicio de tratamientos inadecuados, la falta de actualización de los mismos y un trato inapropiado de los pacientes por parte del personal médico, pueden considerarse factores predisponentes para la multiplicación de estas enzimas en el ambiente hospitalario. Aunado a esto, la migración y el movimiento de gente alrededor del planeta, ocasiona que las bacterias portadoras de dichas enzimas, extiendan su dominio, llegando a una diversidad enorme de países y microorganismos.

Para un adecuado control de infecciones nosocomiales es necesario reforzar los programas de vigilancia epidemiológica, mediante una detección temprana de cepas productoras de

carbapenemasas, y cumplir los protocolos de limpieza generados en los hospitales, son dos herramientas con las que se podría hacer frente al aumento de reportes de carbapenemasas no sólo en territorio nacional, sino en todo el planeta.

La técnica ESBL NPD puede ser una alternativa para toma de decisiones en el tratamiento empírico de ITU, ya que es una prueba rápida útil que permitirá futuros estudios sobre el pronóstico en el tratamiento de infecciones complicadas de vías urinarias

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- 1.-Griebling TL. Urologic Diseases in America Project: trends in resource use for urinary tract infections in men. *J Urol*. 2005;173:1288-1295.
- 2.-Foxman B. The epidemiology of urinary tract infection *Nat Rev Urol*. 2010;7:653-60.
- 3.-Durwood E. Complicated Urinary Tract Infections. *Urol Clin N Am*. 2008;35: 13–22.
- 4.-Magliano E. Gender and age-dependent etiology of community acquired urinary tract infections. *Scientific WorldJournal*. 2012;26.
- 5.-Sobel JD. Pathogenesis of urinary tract infection. Role of host defenses. *Infect Dis North Am*. 2007;11:431-549.
- 6.-Orsola A. Congenital renal abnormalities in neonates with fetal vesicoureteral reflux. Detection by 99m-technetium (m) dimercaptosuccinic acid renal scintigraphy *An Pediatrics*. 2003;59:345-51.
- 7.-Paduch DA, et-al. Viral lower urinary tract infections. *Curr Urol Rep*. 2007;8:324-35.
- 8.-Wagenlehner FM, Wullt B, Perletti G. Antimicrobials in urogenital infections. *Int J Antimicrob Agents*. 2011;38:3-10.
- 9.-Raynor MC, Carson CC. Urinary infections in men. *Med Clin North Am*. 2011;95(1):43-54.
- 10.-Clermont O, Bouvet O, Lespinats S et-al. Molecular and evolutionary bases of within-patient genotypic and phenotypic diversity in *Escherichia coli* extraintestinal infections. *PLoS Pathog*. 2010;30:8-9.

- 11.-Brede CM, Shoskes DA. The etiology and management of acute prostatitis. *Nat Rev Urol.* 2011;8(4):207-12.
- 12.-Foxman, Mars et-al. *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: Are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes? *FEMS Microbiology Letters.* 2005;183–190.
- 13.-Justice SS, Hunstad DA. UPEC hemolysin: more than just for making holes. *Cell Host Microbe.* 2012;9;11(1):4-5.
- 14.-Amiri FN, Rooshan MH, Ahmady MH, et-al. Hygiene practices and sexual activity associated with urinary tract infection in pregnant women. *East Mediterr Health J.* 2009;15(1):104-10.
- 15.-Bonetta A, Di Pierro F. Enteric-coated, highly standardized cranberry extract reduces risk of UTIs and urinary symptoms during radiotherapy for prostate carcinoma. *Cancer Manag Res.* 2015;4:281-6.
- 16.-Wang CH, Fang CC et-al. Cranberry-containing products for prevention of urinary tract infections in susceptible populations: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med.* 2012;172(13):988-96.
- 17.-Huaibin W, Guangwei M, et-al. Uropathogenic *E. coli* Adhesin-Induced Host Cell Receptor Conformational Changes: Implications in Transmembrane Signaling Transduction. *J. Mol. Biol.* 2009;392:352–361.
- 18.-Xie J, Foxman B, Zhang L, et-al. Molecular epidemiologic identification of *Escherichia coli* genes that are potentially involved in movement of the organism from the intestinal tract to the vagina and bladder. *J Clin Microbiol.* 2006;44(7):2434-41.
- 19.-Schilling JD, Mulvey MA Hultgren SJ. Structure and function of *Escherichia coli* type 1 pili: new insight into the pathogenesis of urinary tract infections. *J Infect Dis.* 2001;183 Suppl 1: 36-40.

- 20.-Mulvey MA, Schilling JD, et-al. Bad bugs and beleaguered bladders: interplay between uropathogenic *Escherichia coli* and innate host defenses. Proc Natl Acad Sci USA. 2000;97:8829-35.
- 21.-Sivick KE, Mobley HL. Waging war against uropathogenic *Escherichia coli*: winning back the urinary tract. Infect Immun 2010;78(2):568-85.
- 22.-Drekonja DM, Okoye NC, Johnson JR, et-al. Appropriateness of urinary tract infection diagnosis and treatment duration. Arch Intern Med. 2010;8;170(5):489-90.
- 23.-Drekonja DM, Johnson JR. Urinary tract infections. Prim Care. 2008;35(2):345-67.
- 24.-Hsueh PR, Lau YJ, Liu CY, et-al Consensus statement on the role of fluoroquinolones in the management of urinary tract infections. J Microbiol Immunol Infect. 2011;44(2):79-82.
- 25.-Karlowsky, JA. Trends in antimicrobial resistance among urinary tract infection isolated of *Escherichia coli* from female outpatients in the United States. Antimicrob Agents Chemother. 2006;46:2540-2545.
- 26.-Masson P, Matheson S, Craig JC et-al. Meta-analyses in prevention and treatment of urinary tract infections Infect Dis Clin North Am. 2009;23(2):355-85.
- 27.-Fresnadillo M.,García M., García E. y García J. Los carbapenems disponibles: propiedades y diferencias. Enf Infec Microbiol Clin. 28, 2010;53-64.
- 28.-Houdouin V, Bonacorsi S, Barraud D et-al Phylogenetic background and carriage of pathogenicity island-like domains in relation to antibiotic resistance profiles among *Escherichia coli* urosepsis isolates. J Antimicrob Chemother. 2006;58:748-751.
- 29.-Martínez-Martínez, Calvo E, et-al. El problema creciente de la resistencia antibiótica en bacilos gramnegativos: situación actual, Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010;25-31.

- 30.- Seija V. y Vignoli R. Temas de bacteriología y virología médica. Oficina del libro FEFMUR. 2006, 2a edición: 649-662.
- 31.- Fresnadillo M.,García M., García E. y García J. Los carbapenems disponibles: propiedades y diferencias. Enfermedades Infecciosas y Microbiología 2010,28: 53-64.
- 32.- Moreno K. Et-al. Carbapenémicos: Tipos y Mecanismos de Resistencia Bacterianos. Rev Med CR y Cam LXX. 2010 (608): 599-605.
- 33.- Rodloff A., Goldstein E. and Torres A. Two decades of imipenem therapy. J Antimicrob Chem 2006. 58: 916-929
- 34.-Queenan A. and Bush K. Carbapenemases: the Versatile b-Lactamases. 2007 Clinl Microbiol Rev. 2007 (3): 440-458.
- 35.-Hammoudi D, Moubareck C. and Sarkis D. Review: How to detect carbapenemase producers? A literature review of phenotypic and molecular methods. J Microbiol Meth. 2014: 106-118
- 36.-Calvo J., Cantón R., Fernandez F., Mirelis B. Navarro F. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos. Procedimientos en Microbiología Clínica. 2011. 34p.34-18.
- 37.-Suarez C., Kattán J., Guzmán A. y Villegas M. 2006. Artículo de Revisión: Mecanismos de resistencia a carbapenems en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* y *Enterobacteriaceae* y

estrategias para su prevención y control. Infectio. Revista de la asociación colombiana de infectología 10 (2): 85-93.

38.-Queenan A. and Bush K. 2007. Carbapenemases: the Versatile b-Lactamases. Clin Microbiol Rev 20 (3): 440-458.

39.-Nordmann P. et-al Rapid Identification of Carbapenemase Types in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. By Using a Biochemical Test. Antimicrob Agents Chem. 2012. 56 (12): 6437-6440.

40-Tijet N., Boyd D., Patel S., Mulvey M. and Melano R. Evaluation of the Carba NP Test for Rapid Detection of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial Agent and Chemotherapy 57(9): 4578-4580.

FIGURAS

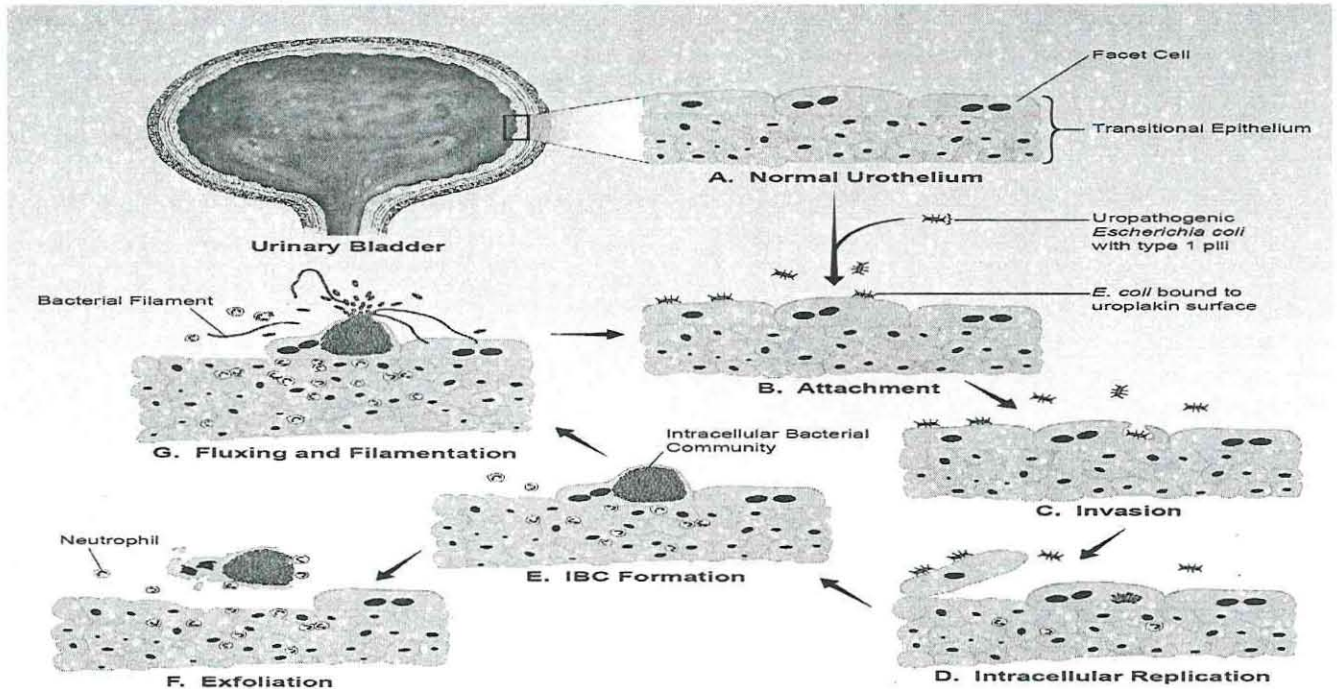
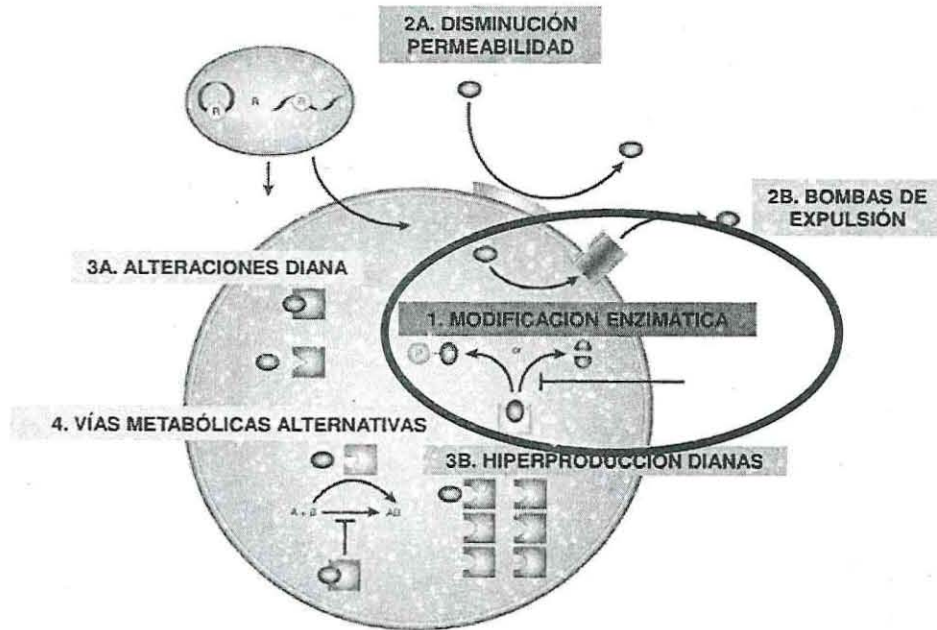


Fig1 Fisiopatología de invasión urotelial

Tomado de Justice SS, et.al 2004.



Tomado de Gupta K, et-al 2001.

Fig 2.- Descripción de algunos factores que intervienen en la resistencia bacteriana

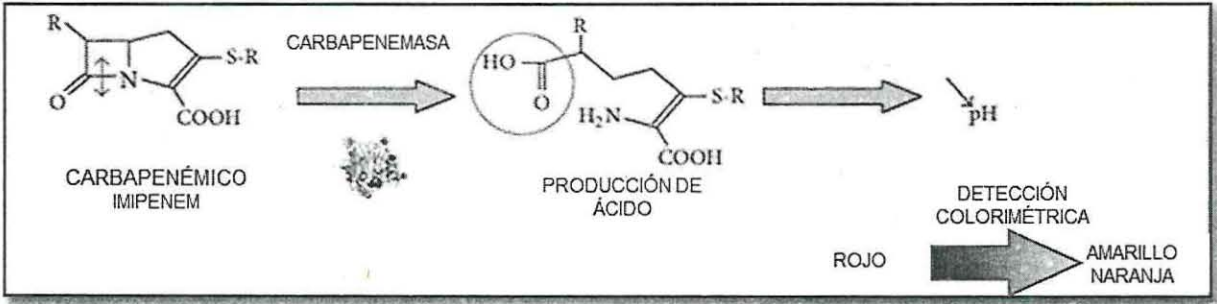


Fig 3 Fundamento teórico BUFFER de lisis para prueba de Carba NP Test

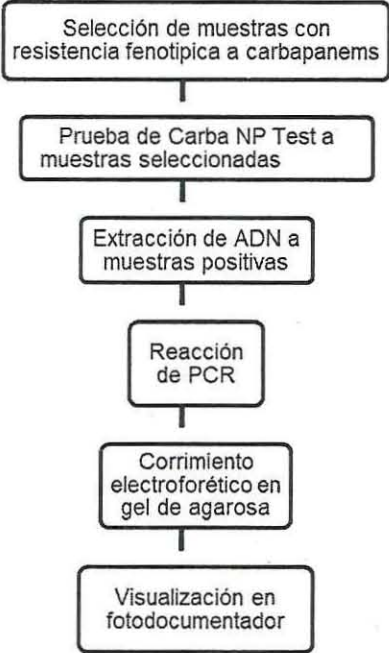
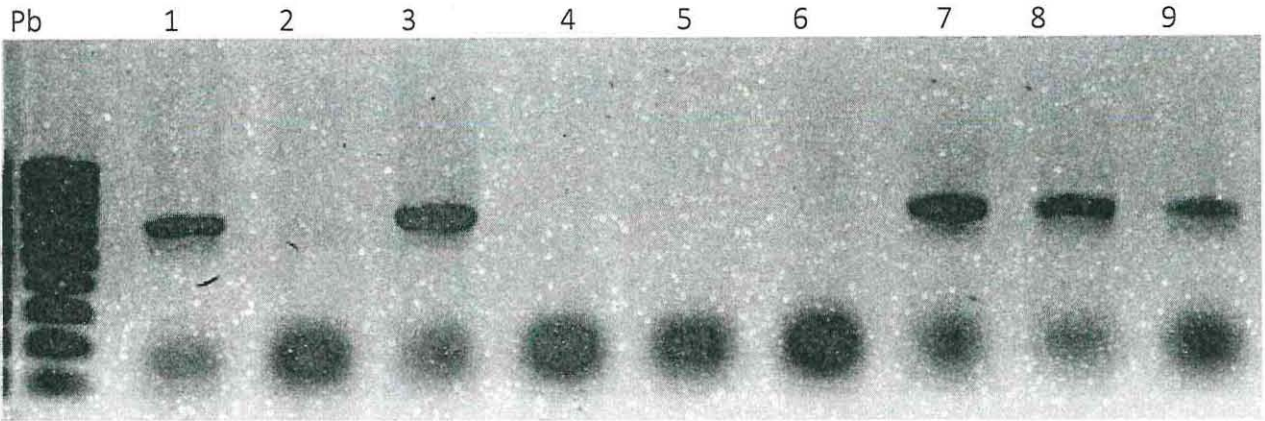
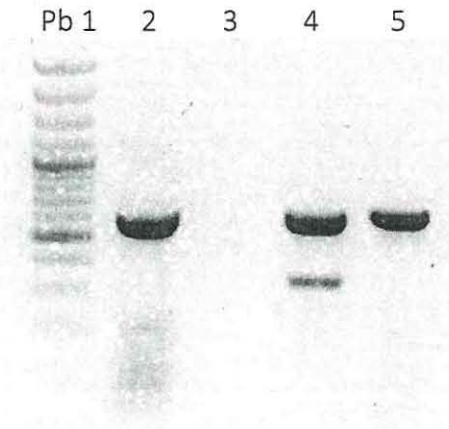


Fig 4.-Metodología

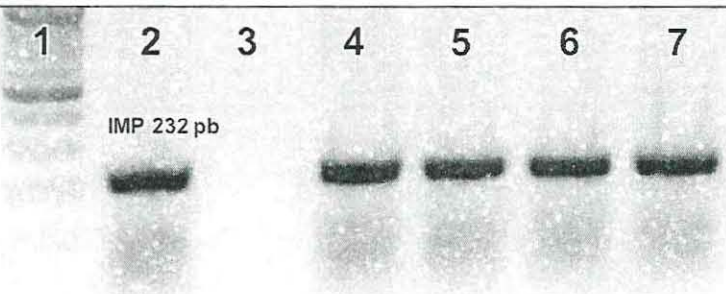
Figuras 5 Geles de agarosa al



Producto de amplificación KPC (638 pb) en gel de agarosa al 1.5%. Carril 1; marcador de peso molecular de 100 pb, carril 2 control positivo para KPC, carril 3; control negativo. Carriles 4, 5, 6, 7 y 8; muestras de trabajo.

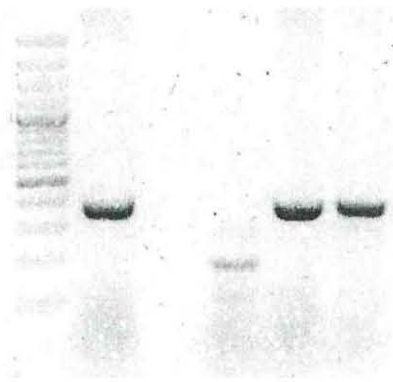


Producto de amplificación NDM (621 pb) en gel de agarosa al 1.5%. Carril 1; marcador de peso molecular de 100 pb, carril 2; control positivo para NDM, carril 3; control negativo. Carriles 4 y 5; muestras de trabajo.



Producto de amplificación IMP (232 pb) en gel de agarosa al 1.5%. Carril 1; marcador de peso molecular de 100 pb, carril 2; control positivo para IMP, carril 3; control negativo. Carriles 4, 5, 6 y 7; muestras de trabajo.

Pb 1 2 3 4 5 6



Producto de amplificación VIM (390 pb) en gel de agarosa al 1.5%. Carril 1; marcador de peso molecular de 100 pb, carril 2; control positivo para VIM, carril 3; control negativo. Carriles 4, 5 y 6; muestras de trabajo.

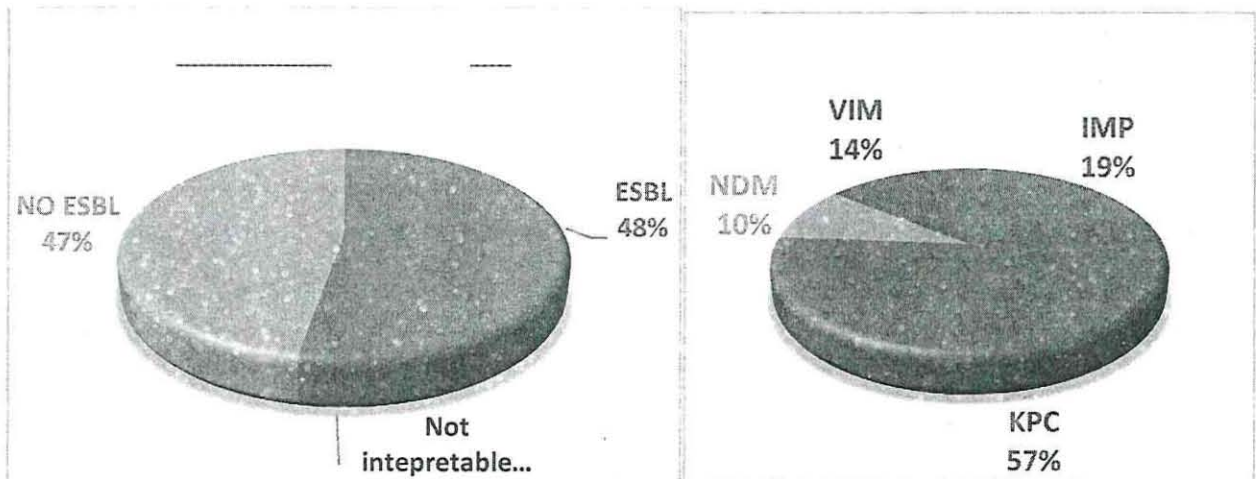


Figura 6.-a) Distribución bacteriana de cepas BLEE y no BLEE
b) Distribución de cepas de carbapenemasas con genes de Carba NP Test

TABLAS

Tabla 1. Factores asociados a infecciones de vías urinarias complicadas.

Tomado y modificado de Foxman B (2010), DurwoodE (2008).

Causas Obstructivas	Hipertrofia prostática Tumores Litiasis renoureteral Estenosis uretrales Divertículos Quistes renales
---------------------	--

Causas metabólicas	Diabetes mellitus Insuficiencia Renal Trasplante renal Espongiosis medular Procesos inmunosupresores
Causas anatómicas	Género masculino Edad Cirugía previa Valvas uretrales Embarazo
Causas funcionales	Vejiga neurógena Reflujo vesicouretral
Otras	Instrumentación de l vía urinaria Derivación urinaria ileal Infección urinaria previa

Tabla 2. Características de las IVU complicadas

Tomado y modificado de Foxman B (2010), DurwoodE (2008).

<ol style="list-style-type: none"> 1. Usualmente ascendente 2. Población susceptible de IVU 3. Infección resistente a fármacos comunes 4. Es necesario uso de terapias prolongadas
--

Tabla 3. Factores defensivos y favorecedores de IVU.

Tomado y modificado de Megliano et al 2012

Factores defensivos antibacterianos	Factores favorecedores bacterianos
<ul style="list-style-type: none"> • Inhibidores de urinarios de adhesión bacteriana <ul style="list-style-type: none"> – Proteína Tamm-Horsfall – Mucopolisacáridos vesicales – Lactoferrina • Respuesta inflamatoria <ul style="list-style-type: none"> – Citocinas – Inmunoglobulina A • Mucosa tracto urinario <ul style="list-style-type: none"> – Actividad bactericida • Físico-químicos <ul style="list-style-type: none"> – Flujo urinario – pH urinario – Osmolaridad urinaria 	<ul style="list-style-type: none"> • Género y Edad <ul style="list-style-type: none"> – Infantes y menores de 7 años – Adultos mayores – Adolescencia – Mujeres • Anomalías funcionales de vía urinaria <ul style="list-style-type: none"> – Reflujo vesicouretral • Enfermedades crónicas <ul style="list-style-type: none"> – DM – Cáncer • Terapéuticas <ul style="list-style-type: none"> – Retraso terapéutico – Incumplimiento terapéutico • Estados inmunosupresores

	<ul style="list-style-type: none"> - Trasplantados - SIDA
--	---

Tabla 4.- Primers y productos de amplificación de productos de PCR

Primer	Secuencia 5' - 3'	Producto de amplificación
NDM_F	5-GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC-3	621 pb
NDM_R	5-CGGAATGGCTCATCACGATC-3	
VIM_{FR}	5-CGAATGCGCAGCACCAG-3	390 pb
VIM_{RF}	5-GATGGTGTGGTTCGCATA-3	
IMP_F	5-GGAATAGAGTGGCTTAAYTC-3	232 pb
IMP_{RNO}	5-TCGGTTTAAAYAAAACAACCACC-3	
KPC_{FNO}	5-GTARCGCCGTCTSGTTCTGC-3	638 pb
KPC_R	5-GGTCGTGTTTCCCTTTAGCC-3	