



Protocolo de PCR multiplex para la detección de genes *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/3*

Nombre primer	Gen	Secuencia 5'--3'	MIX Primers
vanA-Mpx1	vanA	GGAAAACGACAATTGCTATT	1 ul
vanA-Mpx2		GTACAATGCGGCCGTTA	1 ul
vanB-Mpx1	vanB	ACTGGCCTACATTCTTACA	0,50 ul
vanB-Mpx2		AGCGTTTAGTTCTTCCGT	0,50 ul
vanC1-Mpx1	vanC1	TCTCCAGAATACTCAGTGT	0,50 ul
vanC1-Mpx2		ACATGGCAACCAACATAAG	0,50 ul
vanC2-Mpx1	vanC2/3	CCTCAAAAGGGATCACTAA	0,50 ul
vanC2-Mpx2		TCTTGATAGGATAAGCCGA	0,50 ul
16S-Enteroc1	16S Enterococo	GGAATCTTCGGCAATGGA	1 ul
16S-Enteroc2		CAACCTTGCGGTCGTAC	1 ul

Tamaño amplicones	Ciclado
731pb (vanA); 549pb (16S); 448pb (vanC2/3); 329pb (vanC1); 175pb (vanB)	Desnaturalización inicial = 94°C por 5min; Ciclado =35 ciclos:94°C 30seg -- 52° 30seg -- 72°C 60seg; Extensión final = 72°C por 10min

Reacción de PCR --> Vol. final = 25ul	
Reactivo	Volumen
ADN	2,5 ul
Buffer 10X	2,5 ul
MgCl ₂ (50 mM)	0,50 ul
dNTP's (10 mM)	0,5 ul
Taq pol (5U/ul)	0,20 ul
MIX primers	7 ul
H ₂ O	11,8 ul
Vol. Final	25 ul

Controles positivos	
M2758	vanA
M2188	vanB
M2190	vanC1
M2191	vanC2/3

Referencia
Poulsen et al. Detection of clinical vancomycin-resistant enterococci in Denmark by multiplex PCR and sandwich hybridization. APMIS 404-412.1999