

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR  
FACULTAD DE MEDICINA  
CARRERA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**

**CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE *Enterococcus faecalis* Y *Enterococcus faecium* RESISTENTES AL LINEZOLID EN AISLADOS DEL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA EN EL PERIODO 2017-2020.**

**Por: ANDRÉS SANTIAGO AGUIRRE PALACIOS**

**DIRECTOR: Mtr. JOSÉ EDUARDO VILLACÍS ACUÑA**

**QUITO, 2022**

## DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Andrés Santiago Aguirre Palacios, C.I 1003742499; autor del trabajo de graduación titulado: “Caracterización genotípica de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* resistentes al linezolid en aislados de Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública en el periodo 2017-2020”, previo a la obtención del grado académico de BIOQUÍMICO CLÍNICO en la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador:

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.



Andrés Santiago Aguirre Palacios

CI: 1003742499

## CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación del estudiante, Andrés Santiago Aguirre Palacios, intitulado: “Caracterización genotípica de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* resistentes al linezolid en aislados de Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública en el periodo 2017-2020”, ha concluido de conformidad con las normas establecidas por la Unidad Académica, por tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.



Mtr. José Eduardo Villacís Acuña

C.C. 1715477186

Quito 2022

## **DEDICATORIA**

*A mi abuelo, que me inspiro a ser la persona que soy*

*A mis padres, hermana, hermano y amigos que son el pilar fundamental de mi vida*

*¡Y a todas las personas que me apoyaron con sus enseñanzas y que fueron el sostén a cumplir mis metas en el ámbito profesional, lo cual inspiro a que esto sea posible!*

*“Conserva lo que tienes, olvida lo que te duele, lucha por lo que quieres, valora lo que posees, perdona a los que te hieren y disfruta a los que te aman”*

*Bob Marley*

## **AGRADECIMIENTO**

A la *PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR*, especialmente a la carrera de Bioquímica Clínica, por las enseñanzas marcadas durante el proceso de formación, que se esfuerzan todos los días en función de la generación de futuros profesionales con valores y principios bioéticos.

Al personal del Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos, quienes fueron participes directos en la realización del proyecto los cuales impartieron el conocimiento y la calidez humana en el transcurso del camino.

Al Magister José Eduardo Villacís Acuña, por apoyarme con sus consejos, conocimientos y comprensión en los momentos difíciles que se presentaron en el transcurso del desarrollo de la investigación.

A mi amigo Danilo Jácome, por darme la mano en los momentos en los que necesita ayuda y por ofrecerme una amistad verdadera durante toda la carrera siendo un apoyo fundamental en la misma

A mi familia, y quienes siempre estuvieron presentes dentro del desarrollo del proyecto dándome apoyo incondicional, guiándome en el camino durante toda mi vida para que no me desvié del mismo y pueda cumplir mis objetivos.

## RESUMEN

**Introducción:** actualmente, la resistencia al linezolid en *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, representan el tercer o cuarto lugar de patógenos causantes de infecciones intrahospitalarias, presenta una baja prevalencia, sin embargo, al ser un tratamiento de última línea en enterococos resistentes a la vancomicina múltiples centros de referencia a los antimicrobianos han aumentado la vigilancia en los últimos años. Entre los condicionantes de resistencia, se mencionan las mutaciones ribosomales del ARNr 23s, mutaciones en las proteínas L3 y L4 y los genes de resistencia *cfr*, *optrA* y *poxxA* los cuales son albergados por elementos genéticos móviles, lo que permite una diseminación efectiva. El objetivo del estudio es caracterizar los genes de resistencia al linezolid *cfr*, *optrA* y *poxxA* en aislados de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* recuperados en el periodo 2017 al 2020 mediante el desarrollo de una PCR multiplex.

**Materiales y métodos:** en el presente estudio, se implementó una PCR multiplex para la caracterización de los genes *cfr*, *optrA* y *poxxA*, que confieren resistencia al linezolid, en la cual se establecieron las condiciones adecuadas como concentración de primers, gradientes de temperatura, protocolo de trabajo, especificidad y límite de detección. Se tomaron como muestra 42 aislados de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* resistentes al linezolid, recuperados del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública, en los cuales se determinó la frecuencia de dichos genes y se correlacionaron con la CMI obtenida de la base de datos Whonet del Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos

**Resultados:** Se establecieron las condiciones adecuadas de la PCR multiplex, el protocolo demostró un buen funcionamiento de la técnica. Entre las 42 cepas estudiadas, se observa una alta frecuencia de *Enterococcus faecalis* resistente al linezolid con presencia del gen *optrA* en un (86%) con valores de CIM  $\geq 16$  mg/L (57%) y CIM  $\geq 8$  mg/L (28%). Con respecto a *Enterococcus faecium* se evidencia un (2%) del gen *optrA* con CIM  $\geq 16$  mg/L correspondientes al (2%). Además, se contempla un (10%) de *Enterococcus faecalis* sin presencia de los genes de interés con valores de CIM  $\geq 16$  mg/L (9%), mientras que un (2%) de *Enterococcus faecium* con CIM  $\geq 16$  mg/L de (2%). Finalmente, no se observó presencia de los genes *cfr* y *poxxA*

**Conclusiones y recomendaciones:** el desarrollo de la PCR multiplex mantuvo un correcto funcionamiento y una alta especificidad en la detección de los genes *cfr*, *optrA* y *poxA*. Además, el límite de detección demostró que la técnica puede trabajar con bajas concentraciones de ADN. Por último, el estudio muestra una predominancia del gen *optrA* en *Enterococcus faecalis* de los aislados recuperados con valores de CIM entre 8-16 mg/L. Se propone continuar con el estudio en la identificación de las mutaciones ribosomales de ARNr 23s y sus características fenotípicas de resistencia al linezolid

**Palabras clave:** PCR multiplex, *Enterococcus*, *cfr*, *optrA*, *poxA*

## ABSTRACT

**Introduction:** currently, resistance to linezolid in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*, representing the third or fourth place of pathogens causing nosocomial infections, has a low prevalence, however, being a last line treatment in enterococci resistant to vancomycin multiple reference centers to antimicrobials have increased surveillance in recent years. Among the determinants of resistance, 23s rRNA ribosomal mutations, mutations in L3 and L4 proteins and the resistance genes *cfr*, *optrA* and *poxtA* are harbored by mobile genetic elements, which allow effective dissemination. The aim of the study is to characterize linezolid resistance genes *cfr*, *optrA* and *poxtA* in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates recovered in the period 2017 to 2020 by developing a multiplex PCR.

**Materials and methods:** in this study, a multiplex PCR was implemented for the characterization of the *cfr*, *optrA* and *poxtA* genes, which confer resistance to linezolid, in which the appropriate conditions were established, such as primer concentration, temperature gradients, work protocol, specificity and detection limit. Forty-two isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* resistant to linezolid, recovered from the Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública, were sampled, in which the frequency of these genes was determined and correlated with the MIC obtained from the Whonet data base of the Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos.

**Results:** the appropriate conditions for multiplex PCR were established, the protocol showed a good performance of the technique. Among the 42 strains studied, a high frequency of linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* was observed with the presence of the *optrA* gene in (86%) with MIC  $\geq 16$  mg/L (57%) and MIC  $\geq 8$  mg/L (28%). With respect to *Enterococcus faecium*, a (2%) of the *optrA* gene with MIC  $\geq 16$  mg/L corresponding to (2%) is evidenced. In addition, a (10%) of *Enterococcus faecalis* without presence of the genes of interest with MIC values  $\geq 16$  mg/L is contemplated (9%), while a (2%) of *Enterococcus faecium* with MIC  $\geq 16$  mg/L of (2%). Finally, the presence of the *cfr* and *poxtA* genes was not observed.

**Conclusions and recommendations:** the development of multiplex PCR maintained a correct performance and high specificity in the detection of *cfr*, *optrA* and *poxA* genes. In addition, the limit of detection demonstrated that the technique can work with low DNA concentrations. Finally, the study shows a predominance of the *optrA* gene in *Enterococcus faecalis* of the recovered isolates with MIC values between 8-16 mg/L. It is proposed to continue the study in the identification of 23s rRNA ribosomal mutations and their phenotypic characteristics of resistance to linezolid.

**Keywords:** multiplex PCR, *Enterococcus*, *cfr*, *optrA*, *poxA*.

## TABLA DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN.....	I
CERTIFICACIÓN .....	II
DEDICATORIA .....	III
AGRADECIMIENTO .....	IV
RESUMEN .....	V
ABSTRACT.....	VII
TABLA DE CONTENIDOS .....	IX
LISTA DE TABLAS .....	XII
LISTA DE FIGURAS.....	XIII
LISTA DE ANEXOS.....	XIV
LISTA DE SIGLAS.....	XV
CAPITULO I .....	1
1.1.    INTRODUCCIÓN .....	1
1.2.    PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	2
1.3.    JUSTIFICACIÓN.....	4
1.4.    OBJETIVOS.....	6
1.4.1.    Objetivo general.....	6
1.4.2.    Objetivos específicos .....	6
CAPITULO II.....	7
2.1.    ANTECEDENTES.....	7
2.2.    MARCO TEÓRICO .....	9
2.2.1.    Generalidades del género <i>Enterococcus</i> . spp.....	9
2.2.2.    Epidemiología .....	10
2.2.3.    Factores de virulencia de <i>Enterococcus. faecalis</i> y <i>Enterococcus</i> <i>faecium</i> .....	11
2.2.4.    Resistencia al Linezolid .....	12
2.2.5.    Susceptibilidad y resistencia intrínseca de <i>Enterococcus. faecalis</i> y <i>Enterococcus faecium</i> .....	13
2.2.6.    Resistencias adquiridas de <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Enterococcus</i> <i>faecium</i> .....	14
2.2.6.1.    Resistencia a los $\beta$ -lactámicos.....	14
2.2.6.2.    Resistencia a los Aminoglucósidos .....	14

2.2.6.3.	Resistencia a los Glucopéptidos.....	15
2.2.7.	Tratamiento.....	15
2.2.8.	Métodos de identificación en el laboratorio.....	16
2.2.8.1.	Tinción de Gram.....	16
2.2.8.2.	Cultivo.....	16
2.2.8.3.	Métodos moleculares.....	16
2.3.	MARCO CONCEPTUAL.....	17
CAPITULO III.....		20
3.1.	MARCO METODOLÓGICO.....	20
3.1.1.	Tipo de estudio.....	20
3.1.2.	Población.....	20
3.1.3.	Muestra, tamaño muestral y selección.....	20
3.1.3.1.	Criterios de inclusión.....	20
3.1.3.2.	Criterios de exclusión.....	21
3.2.	OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....	22
3.3.	FASES DE ESTUDIO.....	25
3.3.1.	Primera fase: autorizaciones y permisos.....	25
3.3.2.	Segunda fase: recolección de datos.....	25
3.3.3.	Tercera fase: procedimientos de laboratorio análisis microbiológicos.....	25
3.3.3.1.	Materiales y reactivos.....	25
3.3.3.2.	Aislamiento e Identificación de <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Enterococcus faecium</i> .....	27
3.3.4.	Cuarta fase: procedimiento de laboratorio análisis molecular.....	27
3.3.4.1.	Control de la amplificación por PCR.....	27
3.3.4.2.	Extracción del ADN.....	27
3.3.4.3.	Selección de primers.....	28
3.3.4.4.	Preparación de la Master Mix y concentración de primers.....	28
3.3.4.5.	Determinación del protocolo de trabajo.....	29
3.3.4.6.	Preparación de la Master Mix.....	30
3.3.4.7.	Determinación de la especificidad.....	30
3.3.4.8.	Ensayos para determinar el límite de detección.....	30
3.3.5.	Control de calidad.....	33
3.3.6.	Quinta fase: análisis de datos.....	35

3.4.	ANÁLISIS DE RESULTADOS .....	35
CAPITULO IV .....		36
4.1.	RESULTADOS REACTIVACIÓN E IDENTIFICACIÓN .....	36
4.1.1.	Resultados de reactivación e identificación de <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Enterococcus faecium</i> .....	36
4.2.	RESULTADOS DE PRUEBAS MOLECULARES .....	39
4.2.1.	Concentración de primers .....	39
4.2.2.	Temperatura de hibridación .....	39
4.2.3.	Número de ciclos .....	40
4.2.4.	Tiempo de elongación.....	41
4.2.5.	Especificidad de los primer.....	42
4.2.6.	Resultados de límite de detección.....	43
4.2.7.	Resultados PCR multiplex .....	43
4.3.	RESULTADOS GENOTIPIFICACIÓN DE <i>Enterococcus faecalis</i> Y <i>Enterococcus faecium</i> RESISTENTES AL LINEZOLID .....	44
4.4.	RESULTADOS FENOTÍPICOS Y GENOTÍPICOS DE <i>Enterococcus faecalis</i> Y <i>Enterococcus faecium</i> .....	45
4.4.1.	Correlación fenotípica y genotípica de <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Enterococcus faecium</i> .....	45
CAPITULO V .....		47
5.1.	DISCUSIÓN.....	47
5.2.	CONCLUSIONES .....	51
5.3.	RECOMENDACIONES .....	52
BIBLIOGRAFÍA .....		53
ANEXOS .....		60

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Operacionalización de variables .....	22
<b>Tabla 2.</b> Primers para la amplificación de los genes de resistencia al linezolid en <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Enterococcus faecium</i> .....	28
<b>Tabla 3.</b> Determinación de la concentración de los primers.....	29
<b>Tabla 4.</b> Programa de termociclado para la detección de los genes <i>cfr</i> , <i>optrA</i> y <i>poxA</i> .....	29
<b>Tabla 5.</b> Preparación de la Master Mix PCR multiplex.....	30
<b>Tabla 6.</b> Determinación del límite de detección .....	32
<b>Tabla 7.</b> Control de calidad Caldo BHI .....	33
<b>Tabla 8.</b> Evaluación Microbiológica.....	33
<b>Tabla 9.</b> Control de calidad Agar CLED .....	33
<b>Tabla 10.</b> Evaluación Microbiológica.....	34
<b>Tabla 11.</b> Control de calidad Agar Nutritivo .....	34
<b>Tabla 12.</b> Evaluación Microbiológica.....	35
<b>Tabla 13.</b> Características macroscópicas de <i>Enterococcus</i> spp .....	37
<b>Tabla 14.</b> Características macroscópicas de <i>Enterococcus</i> spp .....	37
<b>Tabla 15.</b> Identificación Bioquímica de <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Enterococcus faecium</i> ..	38
<b>Tabla 16.</b> Resultados genotípicos de <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Enterococcus faecium</i> .....	45
<b>Tabla 17.</b> Resultados fenotípicos y genotípicos de <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Enterococcus faecium</i> .....	46
<b>Tabla 18.</b> Resultados genotípicos y fenotípicos de <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Enterococcus faecium</i> .....	66
<b>Tabla 19.</b> Protocolo de la PCR multiplex empleada en la detección de los genes <i>cfr</i> , <i>optrA</i> y <i>poxA</i> .....	68

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Crecimiento en Caldo BHI.....	36
<b>Figura 2..</b> Colonias macroscópicas de <i>Enterococcus</i> spp en agar CLED.....	36
<b>Figura 3.</b> Colonias macroscópicas de <i>Enterococcus</i> spp en agar nutritivo .....	37
<b>Figura 4.</b> Identificación de <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Enterococcus faecium</i> .....	38
<b>Figura 5.</b> Coloración Gram.....	38
<b>Figura 6.</b> Evaluación de la concentración de primers de los genes <i>cfr</i> , <i>optrA</i> y <i>poxA</i> .....	39
<b>Figura 7.</b> Evaluación de la temperatura de Hibridación de los genes <i>cfr</i> , <i>optrA</i> y <i>poxA</i> ...	40
<b>Figura 8.</b> Evaluación del número de ciclos .....	41
<b>Figura 9.</b> Evaluación del tiempo de elongación .....	42
<b>Figura 10.</b> Evaluación de la especificidad de los primers <i>cfr</i> , <i>optrA</i> y <i>poxA</i> .....	42
<b>Figura 11.</b> Ensayos del límite de detección .....	43
<b>Figura 12.</b> Ensayo PCR multiplex de los genes <i>cfr</i> , <i>optrA</i> y <i>poxA</i> .....	44
<b>Figura 13.</b> Gel de agarosa al 2% productos de la PCR multiplex en la detección de los genes <i>cfr</i> , <i>optrA</i> y <i>poxA</i> .....	45
<b>Figura 14.</b> Resultados PCR multiplex <i>cfr</i> , <i>optrA</i> y <i>poxA</i> .....	67
<b>Figura 15.</b> Resultados PCR multiplex <i>cfr</i> , <i>optrA</i> y <i>poxA</i> .....	67

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Carta de intención de interés institucional.....	60
<b>Anexo 2.</b> Acuerdo de entendimiento entre el investigador y la institución INSPI .....	61
<b>Anexo 3.</b> Aprobación del protocolo por el CEISH .....	62
<b>Anexo 4.</b> Medición de concentración de ADN (Nanodrop).....	63
<b>Anexo 5.</b> Especificaciones de Go Taq Green Master Mix .....	64
<b>Anexo 6.</b> Resultados PCR multiplex en la detección de los genes de resistencia <i>cfr</i> , <i>optrA</i> y <i>poxA</i> .....	66
<b>Anexo 7.</b> Protocolo empleado en la PCR multiplex de los genes <i>cfr</i> , <i>optrA</i> y <i>poxA</i> .....	68

## **LISTA DE SIGLAS**

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**ARNr:** ácido ribonucleico ribosomal

**ATCC:** American Type Culture Collection

**CLSI:** Clinical and Laboratory Standard Institute

**CMI:** Concentración Mínima Inhibitoria

**ERV:** Enterococos resistentes a la vancomicina

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**PF:** primer forward

**PR:** primer reverse

**pb:** Pares de bases

**Taq:** Polimerasa *Thermus aquaticus*

**Ta:** Temperatura de annealing

**Tm:** Temperatura de melting

# CAPITULO I

## 1.1.INTRODUCCIÓN

Las especies de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* forman parte de la flora normal del microbioma intestinal humano (García-Solache & Rice, 2019). Estos aislados también se consideran patógenos oportunistas con alta prevalencia en infecciones del tracto urinario “ITU”, heridas, trasplantes, válvula cardíaca, implantes y sepsis (Higuita & Huycke, 2014). Entre los factores de riesgo que promueven el desarrollo de infección incluyen la colonización relacionada con la edad, la prolongada estancia hospitalaria, el uso inadecuado de antibióticos y la condición de inmunosupresión (Higuita & Huycke, 2014). Los enterococos, ocupan el segundo lugar después de *Staphylococcus aureus* como causa de infecciones nosocomiales. Estos organismos poseen una gran capacidad para adquirir resistencia a los antimicrobianos como a la vancomicina presentándose como un gran desafío, especialmente en *Enterococcus faecium* el cual presenta menos susceptibilidad.

El linezolid es un antimicrobiano de última línea utilizado en infecciones por enterococos resistentes a la vancomicina. En la actualidad, el linezolid presenta una alta tasa de efectividad y una baja prevalencia de resistencia a nivel global, sin embargo, en los últimos años se ha visto una disminución de la susceptibilidad a este medicamento (Dadashi et al., 2021; Pfaller et al., 2017). Entre los mecanismos de resistencia al linezolid, se presentan mutaciones ribosomales del ARN 23s como la G2576T, mutaciones de las proteínas L3 y L4; y los genes *cfr*, *optrA* y *poxTA* (Sadowy, 2018).

La presencia de estos genes se ha reportado en varios países a nivel mundial, corroborando su eficiente diseminación en los últimos años. El gen *cfr* fue reportado por primera vez en China en *Enterococcus faecalis* procedente de una muestra en heces bovinas ubicado en el plásmido pEF-01, y flanqueado por elementos de inserción de tipo IS1216 facilitando la recombinación con otros plásmidos (Liu et al., 2012). Pocos años después se encontró en una muestra humana proveniente de Tailandia albergada en el plásmido pHOU*cfr* (Diaz et al., 2012). Por otro lado, el gen *optrA* se evidenció por primera vez en *Enterococcus faecalis* en una muestra de sangre humana en China, presente en el plásmido de tipo pE349 ; varios estudios lo apuntan a ser el gen con más predominancia a nivel global

(Deshpande et al., 2018; Sadowy, 2018). Finalmente, el gen *poxtA* es el último de los genes descubiertos, y su primera aparición se menciona en una muestra clínica de *Enterococcus faecium* proveniente de China y dos aislados recuperados de Dinamarca y Estados Unidos en muestras de origen clínico, el gen se encontraba alojado en un transposón compuesto *Tn6245*; sin embargo, las secuencias eran demasiado cortas para identificar si se transportaba a nivel cromosomal o plasmídico (Antonelli et al., 2018)

Por lo tanto, aunque el linezolid muestran una potente actividad correspondiente al >99 % de efectividad (Dadashi et al., 2021), la diseminación del gen *optrA* en *Enterococcus faecalis*, podría comprometer la utilidad clínica del linezolid (Deshpande et al., 2018). Por otro lado, la presencia de *optrA* en diferentes plásmidos y transposones compuestos podría aumentar su potencial para diseminarse a otras especies menos susceptibles (Sadowy, 2018), que incluye a *Enterococcus faecium* el cual, puede presentar solo susceptibilidad al linezolid y a la daptomicina (Deshpande et al., 2018). Por lo cual, este estudio se llevó a cabo para evaluar los condicionantes génicos de resistencia al linezolid en *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública con la finalidad de investigar a fondo la epidemiología local.

## **1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Entre los problemas que enfrenta la salud en la actualidad, la resistencia antimicrobiana es un inconveniente que recae tanto en el personal de salud como en los pacientes, ya que el mal uso de los antibióticos genera una pérdida en la eficacia terapéutica. La dificultad al momento de elegir un tratamiento antibiótico óptimo se puede dar ante la variación de patrones de resistencia bacteriana, el incremento del precio de los antimicrobianos y la pausada producción de nuevos tratamientos frente al emergente crecimiento de microorganismos resistentes (Sara Cosgrove et al., 2015).

La resistencia antimicrobiana se deduce como el proceso por el cual un microorganismo pierde susceptibilidad ante un antibiótico al que anteriormente era sensible, de esta manera logra adquirir la capacidad de neutralizar el efecto del medicamento ante una infección, así estos microorganismos consiguen sobrevivir y adaptarse a los diferentes antibióticos siendo un proceso natural e inevitable (OMS, 2021). El aumento de patógenos multiresistentes sigue siendo un problema en la salud pública, como es el caso de *Enterococcus* spp, que es un microorganismo con gran adaptabilidad al medio hospitalario y con resistencia a varios antimicrobianos de última instancia como el caso de la vancomicina y el linezolid (GarcíaSolache & Rice, 2019)

Las infecciones enterocócicas nosocomiales resistentes a la vancomicina “ERV” son cada vez más prevalentes a nivel mundial, con opciones terapéuticas limitadas asociada a una alta mortalidad, larga estancia hospitalaria y aumento de los costos sanitarios. Los agentes de primera línea más utilizados son linezolid y daptomicina. El linezolid pertenece a la familia de las oxazolidinonas que presenta propiedades bacteriostáticas, e inhibe la síntesis de proteica bacteriana uniéndose al dominio V 23s del RNAr de la subunidad 50S del ribosoma (Colca et al., 2003)

La resistencia al linezolid se menciona antes de ser comercializado en el año 2000 en Estados Unidos de América, a pesar de que las oxazolidinonas mantiene un 99% de eficacia, solo el 1% de *Enterococcus*. spp presentan resistencias a esta familia (Pfaller et al., 2017). El linezolid mantiene una alta eficacia con una tasa de curación del 74% y 84% asociada a infecciones ERV, mientras que solo un 11% a 8% comprenden un fracaso terapéutico, lo que da a suponer el surgimiento progresivo de resistencia al fármaco (Birmingham et al., 2003). Los mecanismos de resistencia de *Enterococcus* spp al linezolid incluyen mutaciones ribosomales, incluyendo las alternaciones del sitio de unión de las oxazolidinonas. Además, se identificó condicionantes de resistencias como los genes *cfr*, *optrA* y *poxtA* asociados a la disminución de susceptibilidad a linezolid comprometiendo su utilidad clínica (Ruiz-ripa et al., 2020).

Entre los genes que confieren resistencia al linezolid, se describe el gen *cfr* que codifica una metiltransferasa de ARN, la cual modifica una adenina en la posición 2503 del gen de ARNr 23s (Shen et al., 2013), este se encuentra ubicado en mayor proporción en plásmidos y a nivel cromosomal asociado a elementos de inserción (Vester, 2018). Los estudios demuestran estar movilizados por plásmidos del tipo pSS-01, identificado previamente en aislados *Staphylococcus*. spp de cerdos en China y una variedad de elementos de inserción como IS21-558, IS256, IS257 o IS1216 (Shen et al., 2013). Por otra parte, el gen *optrA* y *poxA* codifican una proteína transportadora del tipo ATP-binding cassette ABC-F que protege el ribosoma (Saavedra et al., 2020) presente en diferentes plásmidos del tipo pE349 y a nivel cromosómico, como también su asociación a elementos de inserción IS1216 en humanos, ganado porcino y avícola (Deshpande et al., 2018; Saavedra et al., 2020)

A nivel mundial se ha constatado la presencia de los genes *cfr*, *optrA* y *poxA* en Irlanda, España, Francia, EE. UU, Suecia, Taiwán, Malasia, Tailandia (Deshpande et al., 2018; Egan et al., 2020). En Centroamérica, se los describe en Panamá y Guatemala (Deshpande et al., 2018). En Sudamérica, se los manifiesta en Colombia (Deshpande et al., 2018; Diaz et al., 2012; Cámara et al., 2018). Estos estudios demuestran el aumento progresivo de la resistencia al linezolid y la interacción de los genes implicados. En Ecuador existe un único reporte la presencia del gen *optrA* en un aislado de *Enterococcus faecalis* (INSPI, 2019), de esta manera se presenta una problemática en la creciente diseminación de los genes que confieren resistencia al linezolid, y una falta de datos que proporcionen información epidemiológica de la frecuencia de los genes *cfr*, *optrA* y *poxA*.

### **1.3.JUSTIFICACIÓN**

Las especies *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* se encuentran entre los patógenos oportunistas más frecuentes asociados a infecciones intrahospitalarias debido a su capacidad de adaptación al huésped y a la gran capacidad de adquirir resistencias a los antimicrobianos (Arias et al ,2010). El aumento de casos reportados sobre multiresistencias debido al uso indiscriminado de antibióticos tanto en humanos como tratamiento y profilaxis, en animales como promotores de engorde, en agricultura, y además los movimientos migratorios compromete la elección de un tratamiento antimicrobiano adecuado, lo cual causa una larga estancia hospitalaria, incremento de costos, morbilidad y

mortalidad; de esta manera, se genera la necesidad de pruebas direccionadas a la caracterización genotípica de los diferentes patrones de resistencia con la finalidad de comprender los mecanismos que confieren resistencia al linezolid al reportarse en los últimos años un acrecentamiento de pacientes infectados constituyendo un problema en la salud pública (Martínez et al, 2010).

Según la Organización Mundial de la Salud, el problema de las resistencias antimicrobianas de *Enterococcus* spp no recae en la gravedad de la enfermedad sino en la falta de opciones terapéuticas (OMS, 2021) como un riesgo potencial en el aumento progresivo de la expresión de patógenos emergentes no susceptibles a fármacos, asociado al uso indiscriminado de antimicrobianos, contemplando la necesidad de un programa de control adaptado a un sistema normalizado en la identificación fenotípica y genotípica de genes de resistencia que permitirá conocer el impacto de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* en salud pública.

El linezolid es un antibiótico de última línea perteneciente a la familia de la oxazolidinonas indicado en pacientes con infecciones de ERV, por lo cual la implementación de un programa de vigilancia destinado a la investigación de los genes de resistencia *cfr*, *optrA* y *poxTA* que inducen a la resistencia al linezolid en *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, brindará datos que aporten a futuras investigaciones en el contexto de conocer el entorno genético asociado a la resistencia adquirida por parte del patógeno al ser una problemática poco estudiada en Ecuador..

Se han reportado estudios de la presencia de los genes *cfr* en Panamá (Deshpande et al., 2018) y *optrA* en Colombia en el año 2016 (Cavaco et al., 2016; Saavedra et al., 2020), hasta la fecha no existe información de la frecuencia del gen *poxTA* y *cfr* en Sudamérica (Sadowy, 2018), mientras que en Ecuador se genera el primer reporte de la presencia de *optrA* tres años posteriores (INSPI, 2019), por lo cual, se propone la presente investigación con la finalidad de proporcionar una visión general entorno a la resistencia al linezolid, como un aporte en la generación de datos que revelen la presencia de dichos genes de resistencia de tal forma, que sea un aporte en futuras investigaciones, y de ayuda al personal de salud en el manejo y control de las resistencias a las oxazolidinonas

## **1.4.OBJETIVOS**

### **1.4.1.Objetivo general**

Caracterizar los genes *cfr*, *optrA* y *poxxA* de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* resistentes al linezolid de los aislados obtenidos del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública en el período 2017-2020.

### **1.4.2.Objetivos específicos**

- Establecer las condiciones adecuadas de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa multiplex para la identificación de los genes *cfr*, *optrA* y *poxxA*.
- Determinar la frecuencia genes de resistencia *optrA*, *cfr* y *poxxA* en cepas de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* mediante el método de reacción en cadena de la polimerasa multiplex.
- Correlacionar la presencia de los genes *cfr*, *optrA* y *poxxA* con la concentración mínima inhibitoria de linezolid recuperada de la base de datos Whonet de aislados de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* del Instituto Nacional de Investigación Pública.

## CAPITULO II

### 2.1.ANTECEDENTES

La resistencia antimicrobiana surge como un problema en consecuencia a la adaptación y supervivencia ante la presión selectiva de fármacos antimicrobianos, las especies patógenas han creado mecanismos de resistencia: bombas de eflujo con la expulsión de medicamento del citosol, enzimas que hidrolizan los antimicrobianos y expresión de proteínas de membrana (Opal, 2021).

El género *Enterococcus*. spp. fue descrito por primera vez en el año 1899, por Thiercelin, como un comensal intestinal con la propiedad de volverse patógeno. La especie *Enterococcus*. spp fue considerado parte del género *Streptococcus* spp por las similitudes morfológicas y bioquímicas que ambos presentaban, a mediados de la década de 1980 catalogándose así a *Enterococcus*. spp en el grupo D (Sherman, 1937). En 1906, se describe a *Enterococcus*. *faecalis* como un patógeno asociado a endocarditis. Años después se evidencian más especies dentro del género *Enterococcus*. En 1970, fue el segundo patógeno causante de infecciones nosocomiales dentro de las especies Gram positivas con una alta frecuencia de infecciones urinarias asociadas con el catéter e infecciones del torrente sanguíneo (García Solache & Rice, 2019).

El incremento de resistencias a vancomicina aumenta de manera rápida con el comienzo del siglo 21, levantando un estado de alarma con la pérdida de un bactericida importante (Fiore et al., 2019). El linezolid fue incluido en el año 2000 como un tratamiento de primera línea en las infecciones de ERV, poco tiempo después se evidencia la aparición de resistencia al fármaco en especies de *Enterococcus* resistentes a la vancomicina. En la actualidad, la secuenciación de aislados resistentes al linezolid demostró una mutación G2576U en la subunidad de ARNr 23s (Marshall et al., 2002); posteriormente, se reveló en cepas aisladas en Tailandia la adquisición del gen *cfr*-metiltransferasa en elementos genéticos móviles, dando como resultado la metilación de la posición A2503 en el ARNr 23s generando una resistencia de gran nivel (Diaz et al., 2012). Como últimos el gen *optrA* y *poxtA* mediado por plásmidos que codifican a un transportador ABC putativo asociado al mecanismo de resistencia de bomba de eflujo (Wang et al., 2015).

En base a la necesidad de generar técnicas de detección en búsqueda de los genes que confieren resistencia al linezolid. Bender, (2019) plantea la implementación de una PCR multiplex de los genes *cfr*, *optrA* y *poxtA*. El estudio comprende cepas de *Staphylococcus* y *Enterococcus* recuperadas en el periodo 2007 al 2018 (n=935) con un alto nivel de aislamientos de *Enterococcus faecium* en comparación a *Enterococcus faecalis*. En cuanto a los determinantes genéticos se observa un predominio de *optrA* en *Enterococcus faecalis*, mientras que los genes *cfr* y *poxtA* se asocian en su mayoría a *Enterococcus faecium*, además de observarse una mayor asociación de las mutaciones del ARNr 23s en comparación de los aislados de *Enterococcus faecalis* que no presentaron este tipo de mutación (Bender et al., 2019).

Un estudio en 2020 en Colombia identificó el gen *optrA* en 23 de 25 aislados de *Enterococcus faecalis* recuperados de 10 de pacientes que ingresaron por consulta externa y de 8 pacientes hospitalizados. La presencia del gen *optrA* se presentó en mayor frecuencia (96%) en pacientes (>60 años) con predominancia en mujeres y muestras de orina (Saavedra et al., 2020). Estudio que menciona una diseminación de *optrA* en *Enterococcus faecalis* asociado a plásmidos, y al transposón *Tn6674-like* lo cual demuestra la eficiente distribución en varias zonas geográficas (Saavedra et al., 2020).

Según el programa de vigilancia antimicrobiana “SENTRY”, en los aislamientos de 26648 especies de *Enterococcus* recolectadas del 2008 al 2016 se identificaron 36 especies *Enterococcus faecalis* con rangos de CMI  $\geq$  (4-16) mg/L, y 66 *Enterococcus faecium* con rangos de CMI  $\geq$  (4-64) mg/L correspondientes al 38% de la población de *Enterococcus* mostrando una diferencia en *Enterococcus faecium* con niveles más altos de resistencia (CIM  $\geq$  4 mg/L susceptibilidad intermedia y CMI  $\geq$  8 mg/L resistente) basados en los criterios de CLSI M100-S27 y EUCAST. Por otro lado, dentro de los genes de resistencia, el gen *optrA* se presentó en 26 *Enterococcus faecalis* (72.2%) , entre estas un aislado en Ecuador presente en el plásmido 751,258 en una muestra humana (Sadowy, 2018), dos cepas clónales de Panamá portadoras de *crf*, y nueve cepas con mutaciones G2576T en el RNAr 23s. Los aislamientos *Enterococcus faecium* mostraron una predominancia de la mutación G2576T en el RNAr 23s, una cepa de (EE.UU) mostró la presencia de *crf*, y una cepa

presentó alternación en la proteína ribosomal L3 y L4 además de la mutación G2576T (Deshpande et al., 2018).

## **2.2.MARCO TEÓRICO**

### **2.2.1.Generalidades del género *Enterococcus*. spp**

El género *Enterococcus* spp, se caracteriza por ser cocos Gram positivos con disposición en cadenas en pares de cadena corta en cuanto a su morfología puede confundirse con *S. pneumoniae* (Murray et al., 2016). En cuanto a su crecimiento, estos pueden desarrollarse en forma aeróbica y anaeróbica en un amplio rango de temperaturas (10 a 45°C). en un rango de pH de (4,6 a 9,9), en presencia de altas concentraciones de NaCl 6,5% y sales biliares (Murray et al., 2016). Se consideran bacterias de ácido láctico como producto de la fermentación de la glucosa. Su crecimiento en agar sangre son grandes y pueden ser no hemolíticas, alfa-hemolíticas o raramente betahemolíticas (Murray et al., 2016).

Los enterococos se encuentran en una amplia variedad de huéspedes tanto en animales como humanos, se caracterizan por presentar una alta supervivencia a nivel intestinal al contener una variedad de propiedades de defensas innatas del huésped y se consideran individuo central dentro del microbioma intestinal (Fiore et al., 2019).

Los *Enterococcus* spp confiere una variedad de infecciones que incluyen: tracto urinario, endocarditis, bacteriemia e infecciones intraabdominales. Entre las especies más frecuentes en infecciones asociadas al ambiente hospitalario, se encuentran una alta predominancia de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* (Fiore et al., 2019). Dentro de sus factores de virulencia, se encuentran la propiedad de adherirse a las células del huésped, a la matriz extracelular, y a materiales inertes gracias a su capacidad de generar biopelículas (García-Solache & Rice, 2019).

### 2.2.2.Epidemiología

En las últimas décadas, los enterococos se convirtieron en un patógeno importante asociado a infecciones hospitalarias (Higuita & Huycke, 2014). La capacidad de adherencia al huésped, además de su propiedad inherente de ser resistente a una variedad de antibióticos como son los aminoglucósidos de alta carga, la vancomicina y a fármacos de última instancia como el linezolid, caracterizan a los enterococos como el segundo patógeno Gram positivo de relevancia causante de infecciones nosocomiales (Arias et al., 2008). Entre las especies de enterococos que ocasionan infecciones con más frecuencia son *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*, estos constituyen la flora normal intestinal y del tracto genitourinario (García Solache & Rice, 2019).

Entre las infecciones de enterococos más predominantes son las de tracto urinario bajo como son cistitis, prostatitis y epididimitis predominantes en hombres mayores y representan el 15% de infecciones a nivel hospitalario (Higuita & Huycke, 2014). La bacteriemia y endocarditis son otro tipo de infección provocadas por enterococos que constituyen la segunda causa de bacteriemia después de las infecciones genitourinarias. La bacteriemia mantiene una tasa de mortalidad del 26 y 46% siendo *Enterococcus faecium* el que posee la tasa más alta a diferencia de *Enterococcus faecalis* (Higuita & Huycke, 2014). La endocarditis infecciosa se presenta en un 5 a 15% (Murdoch et al., 2015) por enterococos siendo, *Enterococcus faecalis* el más predominante en relación con *Enterococcus faecium* y representan un 15 a 39% de las infecciones asociadas a la atención médica (Dadashi et al., 2021).

La distribución de *Enterococcus faecium* se encuentra en mayor proporción al presentar resistencia intrínseca a una serie de antibióticos a diferencia de *Enterococcus faecalis*, constituyendo un gran problema en la generación de un tratamiento adecuado de las infecciones enterocócicas (Arias et al., 2010). El 40% de las unidades de cuidados intensivos reportaron infecciones asociados a dispositivos médicos como vías centrales, catéter urinario y ventiladores en *Enterococcus faecium*, resistentes a los aminoglucósidos y a la vancomicina en un 80% y 94% de los casos a diferencia de *Enterococcus faecalis* con una mayor susceptibilidad a la vancomicina y ampicilina (Kristich et al., 2014).

La resistencia de los enterococos ha avanzado a través del tiempo de esta manera se observan un aumento de infecciones resistentes a los fármacos de última instancia como el linezolid, de esta manera a nivel global los aislados de *Enterococcus faecalis* resistentes al linezolid tiene una mayor prevalencia con un 2,2% a diferencia de *Enterococcus faecium* con un 1,1%. La distribución de *Enterococcus faecalis* resistente al linezolid en los diferentes continentes mantiene una prevalencia de 2.8% en Asia, 2.1% en Europa y 0,7% en América. Por otro lado, *Enterococcus faecium* presenta una prevalencia del 0,9% en Asia, 1,8% en Europa y un 3,4% en América (Dadashi et al., 2021)

### **2.2.3. Factores de virulencia de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium***

Entre los factores de virulencia, se describen varias proteínas asociadas a *Enterococcus* entre ellos: moléculas de matriz adhesiva (MSCRAMMs) la cual permite que los enterococos puedan adherirse a las células de huésped (Patti & Hiiiik, 1994). *Enterococcus faecium* y *faecalis* se caracteriza por tener una molécula de adhesión Ace y Acm, que es una proteína de unión al colágeno que les permite colonizar de manera temprana las válvulas cardiacas, lo que conlleva a una importante capacidad de infección endocárdica (Murray et al., 2010). Por otro lado, poseen genes de pilina “PGC” que codifican proteínas de superficie y que funcionan como adhesinas. En *Enterococcus faecalis*, el PGC se encuentra relacionado con la adherencia inicial y la formación de biopelículas, las cuales intervienen dentro de la patogenia de endocarditis e infecciones urinarias (García Solache & Rice, 2019).

Dentro de los factores de virulencia de importancia se encuentran las citolisinas “Cyl” comúnmente llamada hemolisina, esta aporta a la virulencia en infecciones de *Enterococcus faecalis*, su propiedad lítica le permite causar daño en las células de huésped, y además esta se caracteriza por ser bactericida, propiedad que le permite eliminar a otras especies Gram positivas promoviendo la infección (Haas et al., 2002). Otro factor son las sustancias de agregación presentes en elementos genéticos móviles, su principal función es la formación de pares de apareamiento en el proceso conjugativo, y promueve la colonización en endocarditis infecciosa, adherencia de matriz extracelular, protección contra la fagocitosis y aumenta la eficacia de las citolisinas (Chow et al., 1993).

La gelatinasa “GelE” una metaloproteínasa, contribuye en la infección por endocarditis al inhibir la respuesta inmune mediada por el complemento (Park et al., 2007). La proteína de superficie enterocócica “Esp”, contribuye a la adhesión de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* en la colonización uretral y endocarditis, y promueve la formación de biopelículas. Finalmente, los genes que codifican proteínas transmembrana TPS permiten el metabolismo de variedad de azúcares promoviendo a la adaptación eficiente en entornos cambiantes (García Solache & Rice, 2019).

#### **2.2.4. Resistencia al Linezolid**

El uso de linezolid sigue siendo un tratamiento eficaz en infecciones de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* resistentes a la vancomicina. La resistencia se genera frecuentemente por mutaciones en los genes del ARNr. *Enterococcus faecalis* posee seis genes ribosomales, mientras que *Enterococcus faecium* posee cuatro y su nivel de resistencia se asocia al número de estos genes que abarcan mutaciones de relevancia (Marshall et al., 2002). La Resistencia por presión selectiva se ha asociado a mutaciones homologas, mientras que si queda un solo gen tipo salvaje, la conversión del gen puede llevar a la restauración de la susceptibilidad en ausencia del antibiótico lo que indica la desventaja selectiva en ausencia de presión selectiva por linezolid (García Solache & Rice, 2019). Por otro lado, la resistencia a causa de cambios en las proteínas ribosómicas L3, L4 y L22 que son sumamente extrañas (Vester, 2018).

*Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* también puede generar resistencia al linezolid mediante elementos genéticos móviles que confieren el gen *cfr*, el cual codifica una metiltransferasa que modifica A2503 en RNAr 23s bacteriano (Kehrenberg et al., 2005), esta enzima induce resistencia a una variedad de antimicrobianos que incluyen: lincosaminas, fenicoles, pleuromutilinas, estreptogramina y oxazolidinonas y macrólidos. El gen *cfr* es comúnmente codificado por plásmidos (Sadowy, 2018).

El gen *optrA* codifica una proteína F(ABC-F) de unión al ATP (Ruiz-ripa et al., 2020) las cuales inducen a la resistencia a oxazolidinonas y fenicoles. Finalmente, el más reciente, *poxA* al igual que *optrA* que codifica un transportador (ABC) putativo, que confiere resistencia a una variedad de antimicrobianos tales como fenicoles, tetraciclinas y oxazolidinonas. (Ruiz-ripa et al., 2020).

### **2.2.5. Susceptibilidad y resistencia intrínseca de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium***

Las especies *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* mantienen una baja susceptibilidad a muchos agentes antimicrobianos. Dentro de la susceptibilidad intrínseca se encuentra la vancomicina, pero son resistentes a clindamicina, trimetoprim sulfametoxazol y a altas cargas de aminoglucósidos (Torres et al., 2018). En cuanto a los betalactámicos, son resistentes a cualquier cefalosporina, mientras que *Enterococcus faecium* es resistente a las fluoroquinolonas. Los nuevos fármacos como daptomicina, linezolid, tedilinezolid y televancina presentan sensibilidad ante infecciones enterocócicas resistentes a la vancomicina (Vega, 2017).

Los PRP codifican receptores específicos y la formación de un par de apareamiento mediada por una sustancia de agregación codificada por plásmidos que permite el contacto donador-receptor (Palmer et al., 2010). Entre los plásmidos más estudiados se encuentra el Pcf10 que son vehículos para genes de resistencia y PAD1 que transfieren bacteriocinas, citolisinas, hemolisinas y resistencia a la luz ultravioleta (Palmer et al., 2010). Los PRP pueden transferir grandes regiones cromosómicas mediante un cointegrado plásmido cromosoma (Hirt et al., 2005).

Los plásmidos no sensibles a feromonas (NPRP) inducen a la resistencia de glucopéptidos, macrólidos y aminoglucósidos, además se localizan en *Enterococcus faecalis* y pueden coexistir con plásmidos sensibles a las feromonas (García-Solache & Rice, 2019). Los plásmidos híbridos originados bajo múltiples eventos recombinantes intervienen en la propagación a múltiples fármacos, Pre25 se ha identificado en *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* provocando resistencia a una variedad de antimicrobianos y se encuentra en una alta gama de huéspedes (Rosvoll et al., 2010).

Finalmente, los transposones constituyen el mayor número de elementos genéticos móviles “MGE” encontrados en los genomas de enterococos, además de localizarse una gran variedad de huéspedes estos pueden transferirse entre bacterias Gram positivas y Gram negativas (García-Solache & Rice, 2019). Los CTNs son elementos móviles que contienen información genética que interviene su transferencia dentro de las células y son capaces de movilizar otros plásmidos, transposones y fragmentos cromosómicos (Johnson & Grossman, 2015).

## **2.2.6. Resistencias adquiridas de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium***

### *2.2.6.1. Resistencia a los $\beta$ -lactámicos*

El género *Enterococcus* spp posee una resistencia intrínseca a la mayoría de beta-lactámicos, son susceptibles a un pequeño grupo de penicilinas como mezlocilina, ampicilina y piperacilina (García-Solache & Rice, 2019). Los mecanismos implicados en la resistencia a betalactámicos se dan a través de la producción de betalactamasas. La producción de betalactamasas es semejante a la generada por *S. aureus* en regiones genéticas idénticas a la del transposón *Tn551* de *S. aureus* (Rice & Murray, 1995). La expresión de betalactamasas de *Enterococcus faecalis* se diferencia de *S. aureus* ya que no es inducida por la exposición a beta-lactámicos y esta permanece incorporado a la membrana (Zscheck & Murray, 1993).

### *2.2.6.2. Resistencia a los Aminoglucósidos*

El género *Enterococcus* mantienen una resistencia intrínseca a concentraciones clínicamente viables de aminoglucósidos (Torres et al., 2018). La resistencia adquirida a los aminoglucósidos se expresa a través de enzimas modificadoras de aminoglucósidos la cual suprime la sinergia (Shaw et al., 1993). El gen más común que confiere resistencia a los aminoglucósidos es *aac-6'-Ie-aph-2* presente en *Tn4001* en especies de enterococos (Torres et al., 2018).

### 2.2.6.3. Resistencia a los Glucopéptidos

La resistencia a la vancomicina se asigna a la obtención de operones que alteran la naturaleza de los precursores de peptidoglucano que inducen a la sustitución de un D-lactato por una D-alanina terminal en el pentapéptido UDP-MurNac impidiendo el acceso a las proteínas fijadoras de betaláctamicos “PBP” (García-Solache & Rice, 2019) Hasta el momento, se han identificado nueve operones que se dividen en relación a la sustitución del terminal D-alanina por un D-lactato y comprenden los operones *vanA*, *vanB*, *vanD* y *vanM*, por consiguientes los operones cuya sustitución comprende una D-alanina por D-serina son *vanC*, *vanE*, *vanG*, *vanL* y *vanN* (García-Solache & Rice, 2019).

### 2.2.7. Tratamiento

El tratamiento en infecciones causadas por *Enterococcus*. spp, representa complicaciones ya que los antibióticos utilizados no son de tipo bactericida. El tratamiento de tradicional se basa en la sinergia del uso de aminoglucósidos y un antibiótico activo de la pared celular como ampicilina o vancomicina (Allergan & Nordisk, 2019). No obstante, algunos antibióticos que actúan en la pared celular bacteriana son ineficaces como la nafcilina, oxacilina, cefalosporinas, la ampicilina y penicilina son totalmente ineficaces frente a *Enterococcus faecium*, mientras que la vancomicina es particularmente deficiente en *E. faecalis* (Allergan & Nordisk, 2019). Conjuntamente, el 25% de los enterococos mantienen resistencia a los aminoglucósidos de alta carga y vancomicina mediados por elementos genéticos móviles (García-Solache & Rice, 2019).

Actualmente existen antibióticos que son usados en enterococos resistentes a la vancomicina o aminoglucósidos. Entre ellos linezolid, daptomicina, tigeciclina y quinupristina/ dalfopristina (Travaglianti et al., 2007). Desgraciadamente, la resistencia a estos medicamentos se encuentra en constante incremento (García-Solache & Rice, 2019).

## 2.2.8.Métodos de identificación en el laboratorio

### 2.2.8.1.Tinción de Gram

En la identificación microscópica de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, se observa bacterias Gram positivas ovoides distribuidas de forma individual, o en pares, o cadenas (García-Solache & Rice, 2019)

### 2.2.8.2.Cultivo

El género *Enterococcus*. spp son anaerobios facultativos quimioorganotrofos con metabolismo homofermentativo, y su producto final fermentativo es el ácido láctico. Los enterococos generalmente son oxidasa y catalasa negativos con crecimiento en agar BHI caldo enriquecido con 6.5% de NaCl, y en medio sorbitol. Los enterococos pueden crecer en medio selectivo de bilis esculina, gracias a su propiedad de resistir al 40% de bilis y son capaces de crecer en presencia de acida sódica (Murray et al., 2016).

La identificación de las especies *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* se da a través de la capacidad de tolerar el telurito de potasio donde se observan colonias negras. Otro método se basa en la propiedad de reducir las sales de tetrazolio al formazán cromogénico en presencia de glucosa como mejora en la caracterización de especies. Los métodos utilizados con mayor frecuencia comprenden las pruebas de catalasa, pirrolidinil, arilamidasa/ pirrolidinil aminopeptidasa (PYR) y la hidrólisis de bilis esculina (García-Solache & Rice, 2019).

### 2.2.8.3.Métodos moleculares

Los métodos moleculares poseen la ventaja de una mejor precisión diagnóstica, al facilitar información sobre la resistencia antimicrobiana, y la simplificación de tiempo, y costos en comparación con el cultivo y las pruebas fenotípicas (Fang et al., 2012).

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa se basa en la amplificación de ADN utilizado en la caracterización de género, especie y detección de genes de resistencia. La PCR multiplex permite la detección de varios genes como *ddl*, *atpA*, *groes* y *groEL*, *sod* y *tuf* (Poyart et al., 2000) presentes en las especies de enterococos, además proporciona la identificación de genes *cfr*, *optrA* y *poxA* de implicados en la resistencia al linezolid (García-Solache & Rice, 2019).

### 2.3.MARCO CONCEPTUAL

- **ADN:** Molécula que contiene la información genética en todos los seres vivos, consiste en dos cadenas que se enrollan entre ellas para formar una estructura de doble hélice (NIH, 2021).
- **Bilis esculina:** Medio utilizado en la identificación de *Enterococcus*. spp, el cual se basa capacidad del microorganismo de crecer en un medio de cultivo que contiene un 40% de bilis y de hidrolizar la esculina a esculetina, la cual se combina con el citrato ferroso que posee el medio, dando un complejo de color negro (Seija, 2019).
- **BHI 6.5% NaCl:** El caldo infusión de cerebro y corazón es un medio líquido de uso general para una amplia variedad de especies bacterianas y fúngicas. El caldo infusión de cerebro y corazón, con cloruro sódico al 6,5% se utiliza para diferenciar enterococos de los estreptococos(BD, 2014).
- **Catalasa:** Prueba en que la enzima catalasa descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, de este modo las bacterias se protegen del efecto tóxico del peróxido, que es un producto final del metabolismo aerobio de los azúcares generando el desprendimiento de burbujas (Seija, 2019).
- **CMI:** Término usado en bacteriología, que describe la mínima concentración de antibiótico, que, en un período de tiempo establecido, es capaz de inhibir el crecimiento in vitro de un inóculo bacteriano (Taroco et al., 2008).

- **Conjugación bacteriana:** Mecanismo de transferencia de material genético de una célula donante a una célula receptora, a través de elementos genéticos móviles los cuales participan en la transferencia de genes de resistencia (Cabezón et al., 2014).
- **ERV:** Infecciones asociadas a *Enterococcus*. spp resistentes a la vancomicina (Wada et al., 2020).
- **IAH:** Infecciones contraídas durante la estancia hospitalaria en un determinado tiempo (OMS, 2002).
- **Metiltransferasa:** Enzima que produce la metilación postranscripcional del ARN ribosomal 23s en la posición A2503, afectando así a la unión al antimicrobiano (Vester, 2018).
- **PCR Multiplex:** Reacción de la cadena de la polimerasa en la que el proceso de amplificación participa más de dos iniciadores amplificando en un único tubo varias secuencias dianas, permitiendo la detección e identificación simultánea de distintos genes (Rubio et al., 2011).
- **Plásmido:** Moléculas circulares de ADN de doble cadena que componen una unidad de replicación independiente del cromosoma (Betancor et al., 2008).
- **Primer:** Cebador o iniciador conformado por secuencias de oligonucleótidos, que flanquean y delimitan la secuencia blanca que se desea amplificar (Tamay De Dios et al., 2014).
- **Proteínas ABC-F:** Comprenden una familia de proteínas unidas a la membrana bacteriana que median el transporte a través de las membranas biológicas hidrolizando el ATP (Mishra et al., 2019).

- **Resistencia antimicrobiana:** Mecanismo intrínseco o adquirido de un microorganismo que le permite permanecer refractario de manera parcial o total ante la acción bactericida o bacteriostática de un antibiótico (CDC, 2018).
- **Transposón:** Los elementos transponibles son segmentos discretos de ADN que pueden insertarse repetidamente en varios sitios en el genoma de manera autónoma y autorreplicarse en el mismo (Vizváryová & Valková, 2004)

## CAPITULO III

### 3.1.MARCO METODOLÓGICO

#### 3.1.1.Tipo de estudio

El presente estudio es de tipo observacional descriptivo en el cual se identificó y analizó las variables genéticas que inducen a la resistencia de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* al linezolid, y no se analizó la causa-efecto del comportamiento de los genes de resistencia. Por otro lado, es un estudio transversal retrospectivo que se llevó a cabo en cepas recolectadas en el período 2017 al 2020.

#### 3.1.2.Población

El estudio tomó como población total 42 cepas de aislados *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública del período 2017 al 2020.

#### 3.1.3.Muestra, tamaño muestral y selección

El estudio utilizó la población de cepas que ya han sido caracterizadas como no susceptibles al linezolid mediante los datos de concentración mínima inhibitoria, y se determinó la variación de genes de resistencia presentes en *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* de aislados obtenidos del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública, durante el período 2017-2020. Por lo cual, no se realizó cálculo de la muestra, ya que la muestra comprende la población total.

##### 3.1.3.1.Criterios de inclusión

- Aislados de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* identificados fenotípicamente como no susceptibles al linezolid recolectadas en el período 2017-2020.
- Cepas en las que consten la información de tipo de muestra, edad, género, hospital, servicio y CMI  $\geq 4$  mg/L, basados en los criterios de CLSI M100-S27 y EUCAST, y que

se encuentren registradas y almacenadas en el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública

#### *3.1.3.2. Criterios de exclusión*

- Se excluirá del estudio las cepas que no presenten correlación de su resistencia al linezolid en la base de datos Whonet.
- Se excluirán del estudio las cepas que no presenten crecimiento en caldo BHI o presenten características de otro tipo de bacteria no correspondiente a *Enterococcus* spp.

### 3.2. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

**Tabla 1.** Operacionalización de variables

Objetivo	Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Categoría	Escala	Tipo	Indicador	Técnica	Instrumento de medida
Caracterizar los genes <i>cfr</i> , <i>optrA</i> y <i>poxtA</i> de <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Enterococcus faecium</i> resistentes al linezolid de los aislados obtenidos del Centro de Referencia Nacional de Resistencias a los Antimicrobianos en el periodo 2017-2020	Gen <i>cfr</i>	Gen que codifica una metiltransferasa que modifica A2503 en RNAr 23s bacteriano (Kehrenberg et al., 2005),	Gen que confiere resistencia al linezolid en <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Enterococcus faecium</i>	Presencia Ausencia	Nominal	Cualitativa	Frecuencia absoluta y relativa (%)	Técnicas Moleculares	Registro de resultados
	Gen <i>optrA</i>	El gen que codifica una proteína F (ABC-F) de unión al ATP (Ruiz-ripa et al., 2020) las cuales inducen a la resistencia a oxazolidinonas y fenicoles.	Gen que confiere resistencia al linezolid en <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Enterococcus faecium</i>	Presencia Ausencia	Nominal	Cualitativa	Frecuencia absoluta y relativa (%)	Técnicas Moleculares	Registro de resultados
	Gen <i>poxtA</i>	Gen que codifica un transportador (ABC) putativo que confiere resistencia a una variedad de antimicrobianos tales como fenicoles, tetraciclinas y oxazolidinonas (Ruiz-ripa et al., 2020).	Gen que confiere resistencia al linezolid en <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Enterococcus faecium</i>	Presencia Ausencia	Nominal	Cualitativa	Frecuencia absoluta y relativa (%)	Técnicas Moleculares	Registro de resultados

...continúa

Objetivo	Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Categoría	Escala	Tipo	Indicador	Técnica	Instrumento de medida
Establecer las condiciones adecuadas de la técnica de PCR multiplex: temperaturas de trabajo de cada fase del ciclo de PCR, concentración de primers, tiempo y número de ciclos en la identificación de los genes <i>cfr</i> , <i>optrA</i> y <i>poxxA</i> .	Temperatura de hibridación	La temperatura ideal con la cual se puede realizar una identificación de los genes <i>cfr</i> , <i>optrA</i> y <i>poxxA</i>	Grados centígrados con los cuales se logra la amplificación del gen de interés °	Amplificación No amplificación	Continua	Cuantitativa	Bandas definidas luego de la electroforesis	PCR electroforesis	Gel de Electroforesis
	Concentración de primers	La concentración mínima de primer con la cual se puede realizar una identificación óptima de los genes <i>cfr</i> , <i>optrA</i> y <i>poxxA</i>	Concentración ideal para la identificación del gen de interés	Amplificación No amplificación	Intervalo	Cualitativa	Bandas definidas luego de la electroforesis	PCR electroforesis	Gel de Electroforesis
	Tiempo de cada ciclo de hibridación y elongación	El tiempo de hibridación y elongación con el cual se puede realizar una amplificación óptima de los genes <i>cfr</i> , <i>optrA</i> y <i>poxxA</i>	Tiempo empleado en el ciclo de hibridación y para una correcta amplificación del gen	Amplificación No amplificación	Intervalo	Cualitativa	Bandas definidas luego de la electroforesis	PCR electroforesis	Gel de Electroforesis
	Número de ciclos	Los ciclos ideales con los cuales se puede realizar una amplificación óptima de los genes <i>cfr</i> , <i>optrA</i> y <i>poxxA</i>	Numero de ciclos con la que se obtiene una correcta amplificación de la técnica	Amplificación No amplificación	Intervalo	Cualitativa	Bandas definidas luego de la electroforesis	PCR electroforesis	Gel de Electroforesis
	Especificidad de la PCR para la detección de los genes <i>cfr</i> , <i>optrA</i> y <i>poxxA</i>	La capacidad de un primer de identificar únicamente al gen para el que ha sido diseñando.	Identificación específica de los genes <i>cfr</i> , <i>optrA</i> y <i>poxxA</i>	Identifica No identifica	Nominal	Cualitativa	Bandas definidas luego de la electroforesis	PCR electroforesis	Gel de Electroforesis
	Determinación del límite de detección	Concentración mínima de ADN detectado en la PCR	Última concentración detectable por PCR	Detección No Detección	Nominal	Cualitativa	Bandas definidas luego de la electroforesis	PCR electroforesis	Gel de Electroforesis

									...continúa
Objetivo	Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Categoría	Escala	Tipo	Indicador	Técnica	Instrumento de medida
Correlacionar la presencia de los genes <i>cfr</i> , <i>optrA</i> y <i>poxA</i> y los patrones fenotípicos de susceptibilidad de cepas de <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Enterococcus faecium</i> resistentes al linezolid.	Susceptibilidad antimicrobiana por CMI	Conducta fenotípica de un microorganismo ante una dosis conocida de antibiótico (P. R. Murray et al., 2016).	Punto de Corte CMI $\geq 4$ mg/L el cual permite describir si una bacteria es resistente o sensible al linezolid	Sensible Intermedio Resistente	Ordinal	Cualitativa	CMI $\geq 4$ mg/L	CMI	Registro de resultados

### **3.3.FASES DE ESTUDIO**

#### **3.3.1.Primera fase: autorizaciones y permisos**

La investigación se llevó a cabo una vez obtenida la autorización por parte de la unidad académica de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, se efectuó un acuerdo de entendimiento entre la Carrera de Bioquímica Clínica de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador y el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública INSPI-Quito (Anexo 1 y 2). Posteriormente se solicitó la revisión y aprobación por el Comité de Ética en Seres Humanos (CEISH-PUCE) para garantizar que el estudio se realice bajo normas bioéticas (Anexo 3).

#### **3.3.2.Segunda fase: recolección de datos**

En este estudio se seleccionaron 42 cepas de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* de aislados clínicos de diferentes hospitales del país que fueron referidas al INSPI, a través del Centro de Referencia Nacional de Resistencias a los Antimicrobianos, incluidas en la Red de Vigilancia de Resistencia Antimicrobiana durante el período comprendido del 2017 al 2020. Las cepas se eligieron en base a los siguientes criterios: identificadas en la base de datos Whonet como resistentes al linezolid, mediante la técnica de microdilución en caldo (CMI  $\geq$  4 mg/L), y que conste con la información de variables epidemiológicas completas, y que estas sean provenientes de un aislado clínico.

#### **3.3.3.Tercera fase: procedimientos de laboratorio análisis microbiológicos**

##### *3.3.3.1.Materiales y reactivos*

##### **Materiales**

- Cajas Petri
- Mechero
- Micropipetas
- Asas
- Tubos endorf

Material biológico: aislados de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*

### **Cultivo microbiológico**

- Caldo BHI (Brain Heart Infusion)
- Agar CLED
- Agar nutritivo
- Reactivo Catalasa
- Bilis esculina
- NaCl 6.5%
- Sorbitol
- Reactivo Gram
- Incubadora

### **Pruebas moleculares**

- Puntas desechables
- Thermomixer Eppendorf®
- Termociclador BioRad C1000®
- Microtubos 2 ml
- Tubos para PCR 0,2ml
- SYBR ADN gel
- Syber Safe
- Agarosa
- Agua molecular tipo I
- Go Taq Green (Promega)
- Primer de los genes *optrA*, *poxA* y *cfr*
- Cámara electroforética. Labnet ®
- Foto documentador Biorad ®

### 3.3.3.2. Aislamiento e Identificación de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*

Las cepas fueron reactivadas en caldo de enriquecimiento de BHI (Brain Heart Infusion), se incubaron durante 24 horas a 37°C para su crecimiento, se evidenció el crecimiento en BHI y se sembró en agar selectivo CLED, donde fueron incubadas durante 24 horas a una temperatura de 37°C. Después de observar el crecimiento bacteriano puro en el medio CLED, se aislaron las cepas en agar nutritivo durante 24 horas a 37°C, y se suspendieron en tubos con 400 µL de TE 1X para el análisis molecular, las cepas reactivadas se colocaron en caldo BHI más glicerol, con la finalidad de generar un cepario que se almacenó a una temperatura de -80°C. Luego, de las cepas aisladas se obtuvo los resultados de susceptibilidad al linezolid mediante microdilución en caldo de cultivo de la base de datos (Whonet), donde se evaluó su concentración mínima inhibitoria para ser correlacionada

El género y especie se identificó a través de las características fenotípicas de las colonias, características microscópicas, mediante la tinción Gram, y las pruebas bioquímicas: catalasa, bilis esculina, crecimiento en NaCl 6.5% y sorbitol.

### 3.3.4. Cuarta fase: procedimiento de laboratorio análisis molecular

#### 3.3.4.1. Control de la amplificación por PCR

Para el control de calidad de la técnica, se empleó un control positivo para los genes *cfr*, *optrA* y *poxtA* de cepas caracterizadas por el Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos, y un control negativo correspondiente a una cepa sin presencia del gen.

#### 3.3.4.2. Extracción del ADN

En esta etapa se tomó una alícuota bacteriana reactivada del agar nutritivo, y se suspendió en 400 µl de solución TE 1X estéril. La extracción de ADN se ejecutó mediante la técnica de ebullición. El protocolo consistió en incubar la suspensión bacteriana a 95°C durante un tiempo de 10 minutos, posteriormente se centrifugó durante 5 minutos a 13000 rpm. Posteriormente, se cuantificó el ADN extraído mediante espectrofotometría, para determinar

la concentración de ADN que se detalla en el Anexo 4. Finalmente, se recolectó una alícuota de 200 µl del sobrenadante en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se almacenó la muestra a una temperatura de -20°C.

### 3.3.4.3. Selección de primers

Los primers que se usaron son los descritos en la publicación “*Development of a multiplex-PCR to simultaneously detect acquired linezolid resistance genes cfr, optrA and poxtA in enterococci of clinical origin*” (Bender et al., 2019), los cuales fueron acoplados a la detección por PCR para la amplificación de los genes *cfr*, *optrA* y *poxtA*, que confieren resistencia al linezolid en *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*, como se detalla en la siguiente tabla.2.

**Tabla 2.** Primers para la amplificación de los genes de resistencia al linezolid en *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*

GEN	PRIMER	Tm°	TAMAÑO
<i>cfr</i>	F 5´ TGAAGTATAAAGCAGGTTGGGAGTCA 3´	62°	746 pb
	R 5´ ACCATATAATTGACCACAAGCAGC 3´	64°	
<i>optrA</i>	F 5´ TACTTGATGAACCTACTAACCA 3´	58°	422 pb
	R 5´ CCTTGA ACTACTGATTCTCGG 3´	60°	
<i>poxtA</i>	F 5´ AAAGCTACCCATAAAATATC 3´	52°	533 pb
	R 5´ TCATCAAGCTGTTCGAGTTC 3´	60°	

*Nota:* recuperado de (Bender et al., 2019)

### 3.3.4.4. Preparación de la Master Mix y concentración de primers

Como primer paso en los ensayos de la PCR multiplex, se realizaron los diferentes cálculos de la Master Mix donde se determinó la concentración apropiada de primers en un gel de agarosa al 2% (100 ml de TAE 1x más 2g de agarosa) en la cámara electroforética Labnet® a 70V durante 70 minutos, y se reveló en el fotodocumentador Biorad ®. Las concentraciones ensayadas se especifican en la tabla.3. Las especificaciones de la polimerasa Go Taq Green Master Mix (Promega) se muestran en el Anexo 5.

**Tabla 3.** Determinación de la concentración de los primers

<b>Primers</b>			
<b>Master mix</b>	<b>Concentración 10µM</b>	<b>Concentración 5µM</b>	<b>Concentración 2.5µM</b>
Go Taq Green	12.5 µL	12.5 µL	12.5 µL
Primer Forward	0.5 µL	0.3 µL	0.1 µL
Primer Reverse	0.5 µL	0.3 µL	0.1 µL
H2O molecular	9.5 µL	9.9 µL	10.3 µL
ADN	2.0 µL	2.0 µL	2.0µL
Volumen Final	25 µL	25 µL	25 µL

### 3.3.4.5. Determinación del protocolo de trabajo

Para la amplificación de los genes *cfr*, *optrA* y *poxtA* se utilizaron tres programas diferentes ciclos de amplificación en el termociclador BioRad C1000®, donde se determinó las temperaturas, número de ciclos y tiempos apropiados para una correcta amplificación en la técnica de PCR. Las condiciones de amplificación se detallan en la tabla.4.

**Tabla 4.** Programa de termociclado para la detección de los genes *cfr*, *optrA* y *poxtA*

<b>Etapa</b>	<b>Programa de Termociclado</b>		
	25 ciclos	30 ciclos	35 ciclos
Activación (2min)	96°C	96°C	96°C
Desnaturación (30 seg)	96°C	96°C	96°C
Hibridación (20-40seg)	50-55°C	50-55°C	50-55°C
Elongación (30 seg)	72°C	72°C	72°C
Extensión-Final (5min)	72°C	72°C	72°C
Conservación	4°C	4°C	4°C

### 3.3.4.6.Preparación de la Master Mix

Luego de los ensayos individuales de cada gen, se realizó la master mix basándose en los criterios descritos en la publicación “*Development of a multiplex-PCR to simultaneously detect acquired linezolid resistance genes *cfr*, *optrA* and *poxxA* in enterococci of clinical origin*” (Bender et al., 2019), en la cual se utilizaron las concentraciones óptimas de los primers tomando en cuenta los ensayos previos para una correcta amplificación de la técnica. Las condiciones de la preparación de la Master Mix PCR multiplex se describen en la tabla 5.

**Tabla 5.** Preparación de la Master Mix PCR multiplex

MASTER MIX PCR MULTIPLEX					
	C inicial	Unidad	C. final	Unidad	V. final
Go Taq Green	2x	U/L	1x	U/L	12.5 µL
<i>cfr</i> F/R	10	µM	0.2	µM	0.5/0.5 µL
<i>optrA</i> F/R	10	µM	0.2	µM	0.5/0.5 µL
<i>poxxA</i> F/R	10	µM	0.2	µM	0.5/0.5 µL
H2O					7.5 µL
ADN					2.0 µL
Total					25.0 µL

### 3.3.4.7.Determinación de la especificidad

Para la determinación de la especificidad de los primers *cfr*, *optrA* y *poxxA* se elaboró una Master mix para reacciones individuales. Se realizaron tres reacciones para los diferentes primers, y se agregó ADN de cepas sin presencia de los genes antes mencionado donde se evaluó que estas solo reaccionen con el ADN que contenga los genes de resistencia *cfr*, *optrA* y *poxxA*.

### 3.3.4.8.Ensayos para determinar el límite de detección

Para el desarrollo del límite de detección del ensayo se preparó la Master Mix para 10 reacciones individuales de cada gen de resistencia, en la cual se realizaron diluciones de ADN de las cepas caracterizadas donde se observó la concentración mínima requerida para

amplificar la técnica. Los detalles del procedimiento para obtener el límite de detección del ensayo se muestran en la tabla 6.

**Tabla 6.** Determinación del límite de detección

<b>Número de Dilución:</b>				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
<b>Gen</b>	<b>Concentración inicial (ng/μL)</b>	<b>Dilución</b>	<b>Nueva Concentración (ng/μL)</b>	<b>1/10</b>	<b>1/2</b>	<b>1/4</b>	<b>1/8</b>	<b>1/16</b>	<b>1/32</b>	<b>1/64</b>	<b>1/128</b>	<b>1/256</b>	<b>1/512</b>	<b>1/1024</b>
<i>cfr</i>	105,4	1/6	17,6	1,74	0,87	0,43	0,21	0,11	0,055	0,027	0,014	0,0067	0,0034	0,0017
<i>optrA</i>	101,5	1/6	16,91	1,69	0,84	0,42	0,21	0,11	0,053	0,026	0,013	0,0066	0,0033	0,0016
<i>poxA</i>	98,7	1/6	16,45	1,64	0,82	0,41	0,20	0,10	0,05	0,026	0,013	0,0064	0,0032	0,0016

### 3.3.5. Control de calidad

Los parámetros evaluados en el control de calidad del caldo BHI (Brain Heart Infusion) se especifican en la tabla.7.

**Tabla 7.** Control de calidad caldo BHI

Parámetros	Aspectos físicos
Color	Ámbar
Volumen	4 mL
pH	7.4 ± 0.2 a 25°C
Esterilidad	Antes de su uso se debe evidenciar ningún crecimiento bacteriano a 35°C ± 2 por 24 horas

*Nota:* datos proporcionados por control de calidad de medios (INSPI, 2021)

La selectividad del medio del caldo BHI, se estableció mediante la norma ISO/TS11133-2 al inocular una cepa ATCC® 25922 y una cepa ATCC® 25923 donde se observó un correcto crecimiento. Las características físicas y químicas se especifican en la tabla.8.

**Tabla 8.** Evaluación microbiológica

Microorganismo	Características físicas/químicas
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	Macroscópicamente presenta turbidez Microscópicamente se observa crecimiento de bacilos Gram negativos
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	Macroscópicamente presenta turbidez Microscópicamente se observa crecimiento de cocos Gram positivos

*Nota:* datos proporcionados por control de calidad de medios (INSPI, 2021)

Los parámetros evaluados en el control de calidad del Agar CLED se especifican en la tabla.9.

**Tabla 9.** Control de calidad agar CLED

Parámetros	Aspectos físicos
Color	Verde
Volumen	25 mL c/u
pH	7.3 ± 0.2 a 25°C
Esterilidad	Antes de su uso se debe evidenciar ningún crecimiento bacteriano a 35°C ± 2 por 24 horas

*Nota:* datos proporcionados por control de calidad de medios (INSPI, 2021)

La selectividad del medio del Agar CLED se desarrolló mediante la norma ISO/TS11133-2, al inocular una cepa ATCC® 25922, ATCC® 25923, ATCC® 29906 donde se contempló un correcto crecimiento de colonias fermentadoras y no fermentadoras de lactosa. Las características físicas y químicas se especifican en la tabla.10.

**Tabla 10.** Evaluación microbiológica

<b>Microorganismo</b>	<b>Características físicas/químicas</b>
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	Macroscópicamente presenta colonias amarillas Microscópicamente se observa crecimiento de bacilos Gram negativos
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	Macroscópicamente presenta colonias amarillas Microscópicamente se observa crecimiento de cocos Gram positivos
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC® 29906	Macroscópicamente presenta colonias azules verdosas Microscópicamente se observa crecimiento de cocos Gram negativos

*Nota:* datos proporcionados por control de calidad de medios (INSPI, 2021)

Los parámetros evaluados en el control de calidad del Agar Nutritivo se especifican en la tabla.11.

**Tabla 11.** Control de calidad agar nutritivo

<b>Parámetros</b>	<b>Aspectos físicos</b>
Color	Ámbar Claro
Volumen	25 mL c/u
pH	7.3 ± 0.2 a 25°C
Esterilidad	Antes de su uso se debe evidenciar ningún crecimiento bacteriano a 35°C ± 2 por 24 horas

*Nota:* datos proporcionados por control de calidad de medios (INSPI, 2021)

La selectividad del medio del Agar CLED se elaboró mediante la norma ISO/TS11133-2 al inocular una cepa ATCC® 25922, ATCC® 25923, donde se visualizó un correcto crecimiento de colonias fermentadoras de lactosa. Las características físicas y químicas se especifican en la tabla.12.

**Tabla 12.** Evaluación microbiológica

<b>Microorganismo</b>	<b>Características físicas/químicas</b>
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	Macroscópicamente presenta colonias cremosas Microscópicamente se observa crecimiento de bacilos Gram negativos
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	Macroscópicamente presenta colonias blancas Microscópicamente se observa crecimiento de cocos Gram positivos

*Nota:* datos proporcionados por control de calidad de medios (INSPI, 2021)

### 3.3.6. Quinta fase: análisis de datos

Los análisis estadísticos de los genes *cfr*, *optrA* y *poxA* fueron expresados en tablas de frecuencias. Finalmente, los resultados se tabularon en el software Whonet v2017, donde se correlacionó los datos de concentración mínima inhibitoria del linezolid recuperados de la base de datos Whonet del Centro de Referencia Nacional a los Antimicrobianos y su relación genotípica y fenotípica de los aislados de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* resistentes al linezolid.

### 3.4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

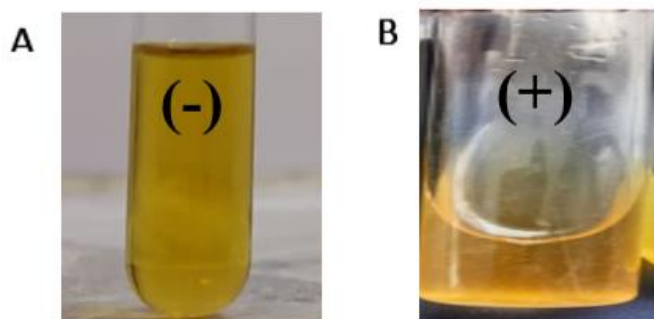
Los procesos y datos obtenidos de las condiciones óptimas para la ejecución de la PCR multiplex se muestran en el Anexo 7, la cual permitirá la realización de la técnica, mientras que los datos genotípicos y fenotípicos de la resistencia al linezolid en *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* se presentan en tablas estadísticas de frecuencia.

## CAPITULO IV

### 4.1.RESULTADOS REACTIVACIÓN E IDENTIFICACIÓN

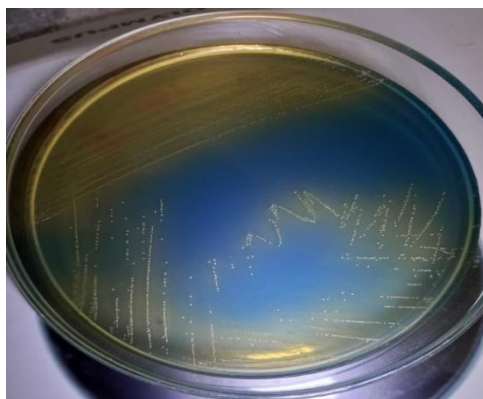
#### 4.1.1.Resultados de reactivación e identificación de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*

La reactivación de los aislados obtuvo crecimiento positivo en caldo de cultivo BHI luego de ser incubadas durante 24 horas, donde se evidenció un cambio en la turbidez del medio como se observa en la figura.1



**Figura 1.** Crecimiento en caldo BHI (A) caldo BHI sin crecimiento bacteriano, (B) caldo BHI con crecimiento bacteriano

Una vez reactivadas en agar BHI las cepas se cultivaron en agar medio diferencial CLED para su reactivación, luego de 24 horas de incubación se obtuvo un crecimiento puro con presencia de colonias pequeñas con bordes definidos y forma convexa de color amarillo como consecuencia a la fermentación de lactosa como observa en la figura 2, y se describe en la tabla 13.

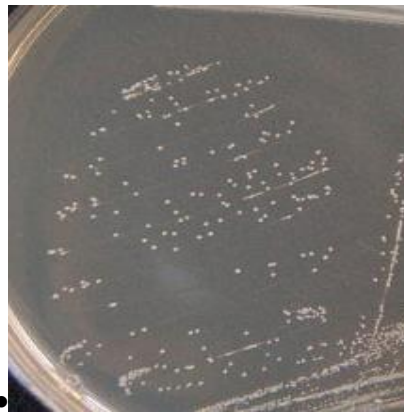


**Figura 2.** Colonias macroscópicas de *Enterococcus* spp en agar CLED

**Tabla 13.** Características macroscópicas de *Enterococcus* spp

<b>Características macroscópicas</b>	<b><i>Enterococcus</i> spp</b>
Forma	Circular
Elevación	Convexa
Borde	Entero

Las cepas reactivadas en agar CLED fueron cultivadas en agar nutritivo para garantizar su buen crecimiento, estas se incubaron durante 24 horas dando como resultado un crecimiento de colonias de color blanco con forma circular convexa y bordes regulares como se observa en la figura 3, y se describe en la tabla 14.

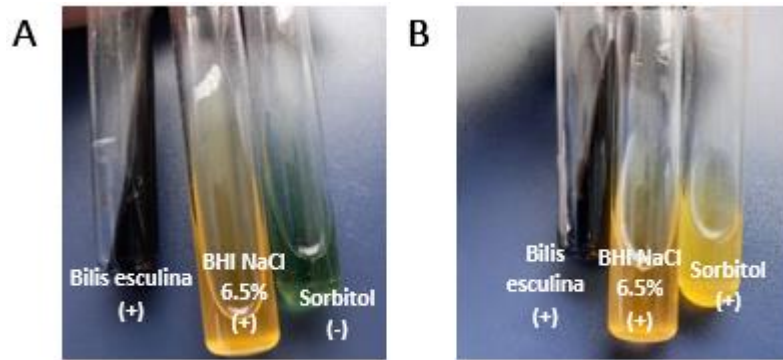


**Figura 3.** Colonias macroscópicas de *Enterococcus* spp en agar nutritivo

**Tabla 14.** Características macroscópicas de *Enterococcus* spp

<b>Características macroscópicas</b>	<b><i>Enterococcus</i> spp</b>
Forma	Circular
Elevación	Convexa
Borde	Regular

La caracterización de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* se obtuvo a través de la reacción bioquímica de bilis esculina, observándose un cambio de color verde a color negro en consecuencia de la hidrólisis de la esculina, crecimiento en caldo BHI enriquecido con NaCl 6.5% y el género se identificó por la reacción del sorbitol donde se evidencio un cambio de color de verde a amarillo en *Enterococcus faecalis*, mientras que no se observó cambio de color en *Enterococcus faecium* como se observa en la figura 4 y se describe en la tabla 15. La coloración Gram mostro cocos de color violáceo como se observan en la figura 5.



**Figura 4.** Identificación de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*. (A) Bioquímica *Enterococcus faecium*: hidrólisis de bilis esculina positiva, crecimiento en NaCl 6.5% y sorbitol negativo. (B) Bioquímica *Enterococcus faecalis*: hidrólisis de bilis esculina positiva, crecimiento en NaCl 6.5% y sorbitol positivo.

**Tabla 15.** Identificación bioquímica de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*

Especie	Bilis esculina	NaCl 6.5%	Sorbitol
<i>Enterococcus faecium</i>	(+)	(+)	(-)
<i>Enterococcus faecalis</i>	(+)	(+)	(+)

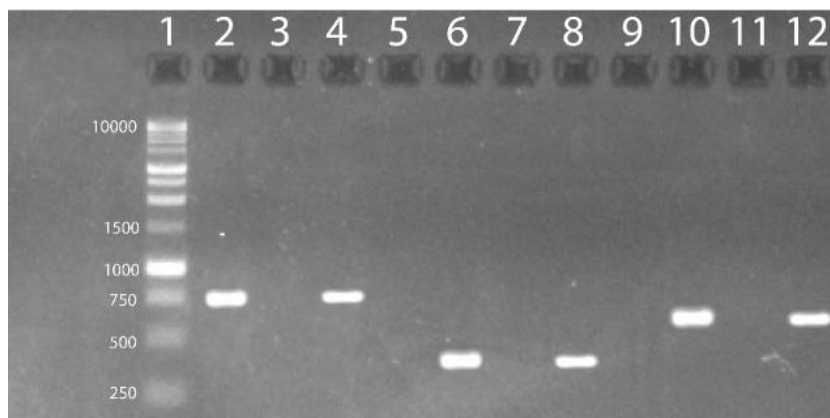


**Figura 5.** Coloración Gram en la que se observan una gran cantidad de cocos de color violáceo correspondientes a *Enterococcus* spp

## 4.2.RESULTADOS DE PRUEBAS MOLECULARES

### 4.2.1.Concentración de primers

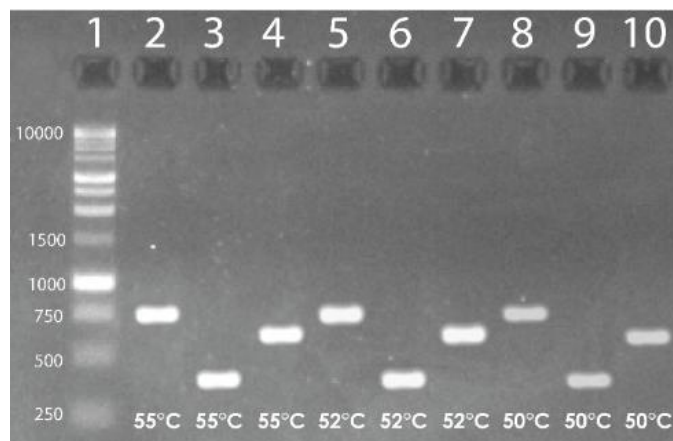
Para la determinación de la concentración ideal para la detección de los genes *cfr*, *optrA* y *poxtA* se observó que para el gen *cfr* amplificó a la concentración inicial de 5uM y 10  $\mu$ M con un peso de 746 pb, para el gen *optrA* amplificó para una concentración inicial de 5uM y 10  $\mu$ M con un peso de 422 pb, mientras que para el gen *poxtA* amplificó a la concentración inicial de 5uM y 10  $\mu$ M con un peso de 533pb. Se observan bandas bien definidas en la amplificación de 10  $\mu$ M con una concentración final de 0.2  $\mu$ M, por lo tanto, se procedió a tomar esta concentración de primers como se observa en la figura 6.



**Figura 6.** Evaluación de la concentración de primers de los genes *cfr*, *optrA* y *poxtA* Carriles: (1) Ladder 1kb. (2) Gen *cfr* (10  $\mu$ M) con un peso de 746pb, temperatura de 55°C. (4) Gen *cfr* (5  $\mu$ M) con un peso de 746pb, temperatura de 55°C. (6) Gen *optrA* (10  $\mu$ M) con un peso de 422 pb, temperatura de 55°C. (8) Gen *optrA* (5  $\mu$ M) con un peso de 422 pb, temperatura de 55°C. (10) Gen *poxtA* (10  $\mu$ M) con un peso de 533 pb, temperatura de 50°C. (12) Gen *poxtA* (5  $\mu$ M) con un peso de 533 pb, temperatura de 50°C.

### 4.2.2.Temperatura de hibridación

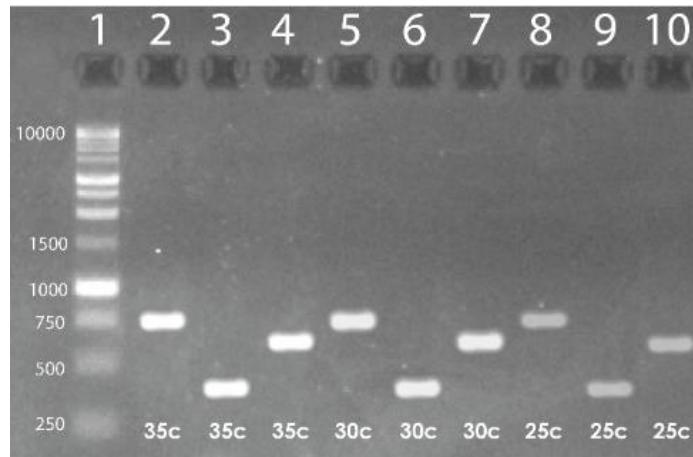
Para la selección de la temperatura de hibridación se tomó como intervalo de temperatura de 50-55 °C, tomando en cuenta la Temperatura de hibridación teórica del gen *cfr* de 55/58°C a 52/50 °C del gen *optrA* y 48/50°C para el gen *poxtA*. Se observó amplificación en todos los rangos establecidos por lo cual se aceptó dentro del protocolo la temperatura de 50°C como se observa en la figura 7 basándose en la publicación “*Development of a multiplex-PCR to simultaneously detect acquired linezolid resistance genes cfr, optrA and poxtA in enterococci of clinical origin*” (Bender et al., 2019)



**Figura 7.** Evaluación de la temperatura de Hibridación de los genes *cfr*, *oprA* y *poxtA*. Carriles: (1) Ladder 1kb. (2) Gen *cfr* con un peso de 746pb, temperatura de 55°C. (3) Gen *oprA* con un peso de 422 pb, temperatura de 55°C. (4) Gen *poxtA* con un peso de 533 pb, temperatura de 55°C. (5) Gen *cfr* con un peso de 746 pb, temperatura de 52°C. (6) Gen *oprA* con un peso de 422 pb, temperatura de 52°C. (7) Gen *poxtA* con un peso de 533 pb, temperatura de 52°C. (8) Gen *cfr* con un peso de 746pb, temperatura de 50°C. (9) Gen *oprA* con un peso de 422 pb, temperatura de 50°C. (10) Gen *poxtA* con un peso de 533 pb, temperatura de 50°C.

#### 4.2.3. Número de ciclos

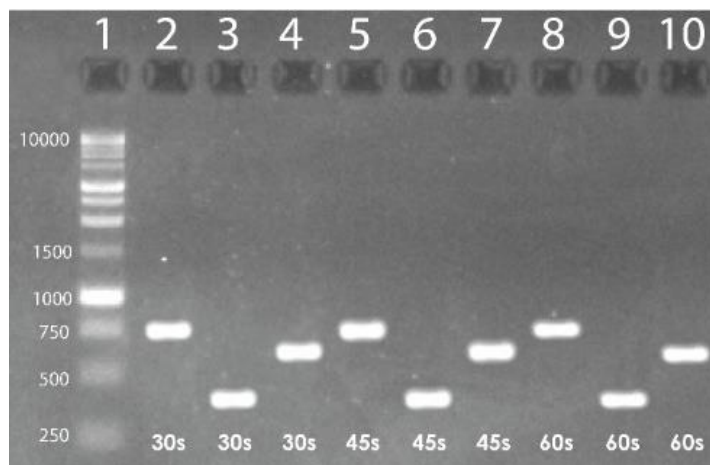
Para la determinación de número de ciclos se tomó el intervalo de 25 a 35 ciclos, con la finalidad de determinar los ciclos en los cuales existe amplificación y una buena calidad de la banda amplificada, se observó en ambos genes amplificación en los intervalos establecidos. El resultado de la banda de 35 ciclos obtuvo una mejor definición para ambos genes, por lo cual, se procedió a incluirla en el protocolo de amplificación como se observa en la figura 8



**Figura 8.** Evaluación del número de ciclos. Carriles: (1) Ladder 1kb. (2) Gen *cfr* con un peso de 746pb, número de ciclos 35. (3) Gen *optrA* con un peso de 422 pb, número de ciclos 35. (4) Gen *poxtA* con un peso de 533 pb, número de ciclos 35. (5) Gen *cfr* con un peso de 746 pb, número de ciclos 30. (6) Gen *optrA* con un peso de 422 pb, número de ciclos 30. (7) Gen *poxtA* con un peso de 533 pb, número de ciclos 30. (8) Gen *cfr* con un peso de 746pb, número de ciclos 25. (9) Gen *optrA* con un peso de 422 pb, número de ciclos 25 (10) Gen *poxtA* con un peso de 533 pb, número de ciclos 25.

#### 4.2.4. Tiempo de elongación

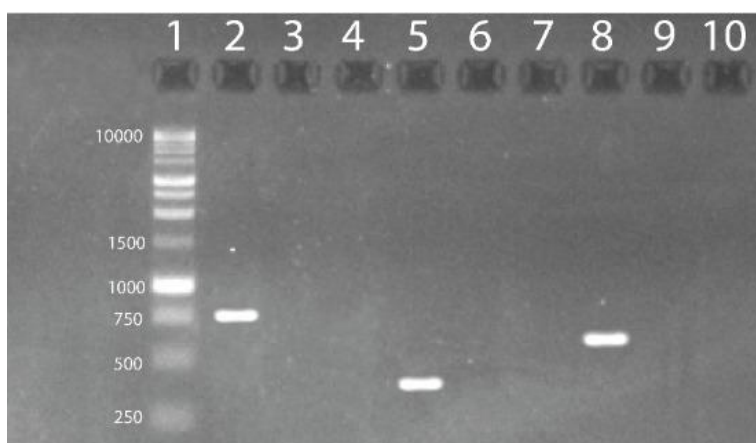
Se estableció el tiempo de elongación ideal, partiendo del cebador como soporte inicial, en la cual la cadena complementaria de ADN, se sintetizó de manera correcta. Se observó la amplificación en el intervalo de tiempo, de 30 a 60 segundos, no mostró amplificaciones inespecíficas y presentó una correcta definición de las bandas, como se observa en la figura 9. De esta manera se procedió a tomar como referencia el tiempo de 30 segundos, reduciendo la duración del proceso de amplificación, generando mayor eficacia en la detección de genes, ya que estas servirán para la vigilancia de enterococos resistentes al linezolid.



**Figura 9.** Evaluación del tiempo de elongación. Carriles: (1) Ladder 1kb. (2) Gen *cfr* con un peso de 746pb, tiempo de elongación 30 segundos. (3) Gen *oprA* con un peso de 422 pb, tiempo de elongación 30 segundos. (4) Gen *poxtA* con un peso de 533 pb, tiempo de elongación 30 segundos. (5) Gen *cfr* con un peso de 746 pb, tiempo de elongación 45 segundos. (6) Gen *oprA* con un peso de 422 pb, tiempo de elongación 45 segundos. (7) Gen *poxtA* con un peso de 533 pb, tiempo de elongación 45 segundos (8) Gen *cfr* con un peso de 746pb, tiempo de elongación 60 segundos (9) Gen *oprA* con un peso de 422 pb, tiempo de elongación 60 segundos (10) Gen *poxtA* con un peso de 533 pb, tiempo de elongación 60 segundos.

#### 4.2.5. Especificidad de los primers

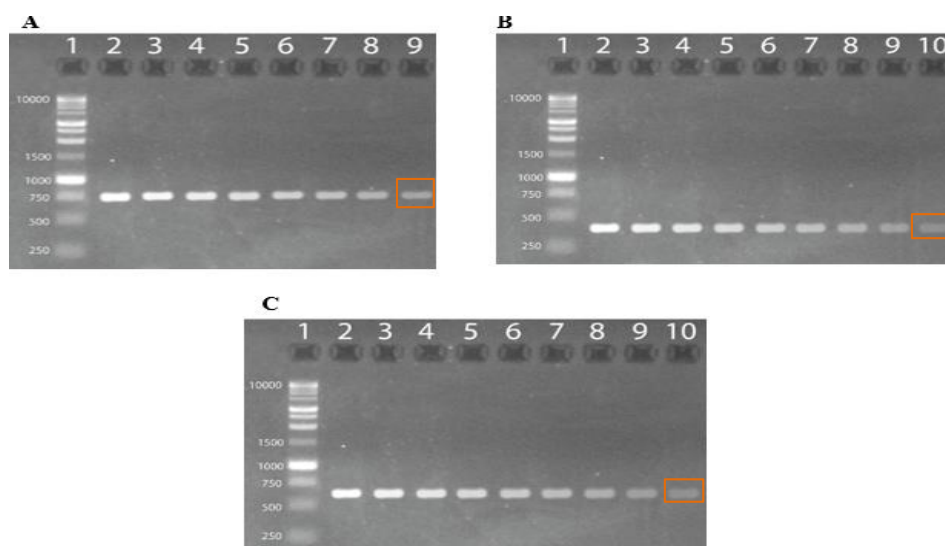
Para la identificación de la especificidad se realizó una Master mix, para la reacción de genes individuales de los genes *cfr*, *oprA* y *poxtA*, se procedió a adicionar ADN de otros genes con la finalidad de no obtener ninguna amplificación. En el ensayo no se obtuvo ninguna amplificación lo cual demuestra una alta especificidad de los primers como se observa en la figura 10.



**Figura 10.** Evaluación de la especificidad de los primers *cfr*, *oprA* y *poxtA*. Carriles: (1) Ladder 1kb. (2) Primer *cfr* control positivo. (3) Primer *cfr* con control *oprA* sin amplificación. (4) Primer *cfr* con control *poxtA* sin amplificación. (5) Primer *oprA*, control positivo. (6) Primer *oprA* con control *cfr* sin amplificación. (7) Primer *oprA* con control *poxtA* sin amplificación. (8) Primer *poxtA*, control positivo. (9) Primer *poxtA* con control *cfr* sin amplificación. (10) Primer *poxtA* con control *oprA* sin amplificación.

#### 4.2.6. Resultados de límite de detección

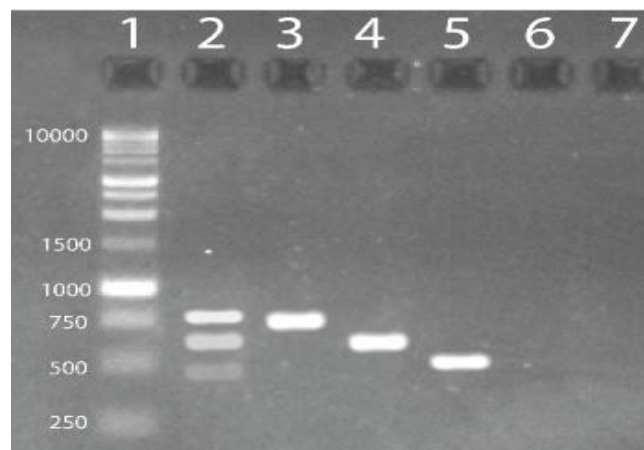
En el ensayo del límite de detección, se procedió a realizar una serie de diluciones mencionadas en la tabla 6. Se realizaron una serie de diluciones de ADN, los cuales fueron sometidos a PCR, con la finalidad de determinar la última concentración en el cual la técnica amplifique el ADN. Los resultados obtenidos del límite de detección para el gen *cfr* amplificó por última vez en la dilución 8 con una concentración de ADN de 0,006, mientras que los genes *optrA* y *poxxA* amplificaron por última vez a una concentración 0,003 en la dilución número 9 correspondiente a la dilución 1/512 demostrando que la técnica trabaja con bajas concentraciones ADN como se observa en la figura 11.



**Figura 11.** Ensayos del límite de detección. (A) Gen *cfr* con un peso de 746 pb, carril (9) última amplificación dilución 1/256, concentración ADN 0,006 ng. (B) Gen *optrA* con un peso de 422 pb, carril (10) última amplificación dilución 1/512, concentración de ADN 0,003 ng. (C) Gen *poxxA* con un peso de 522 pb, carril (10) última amplificación dilución 1/512, concentración de ADN 0,003 ng.

#### 4.2.7. Resultados PCR multiplex

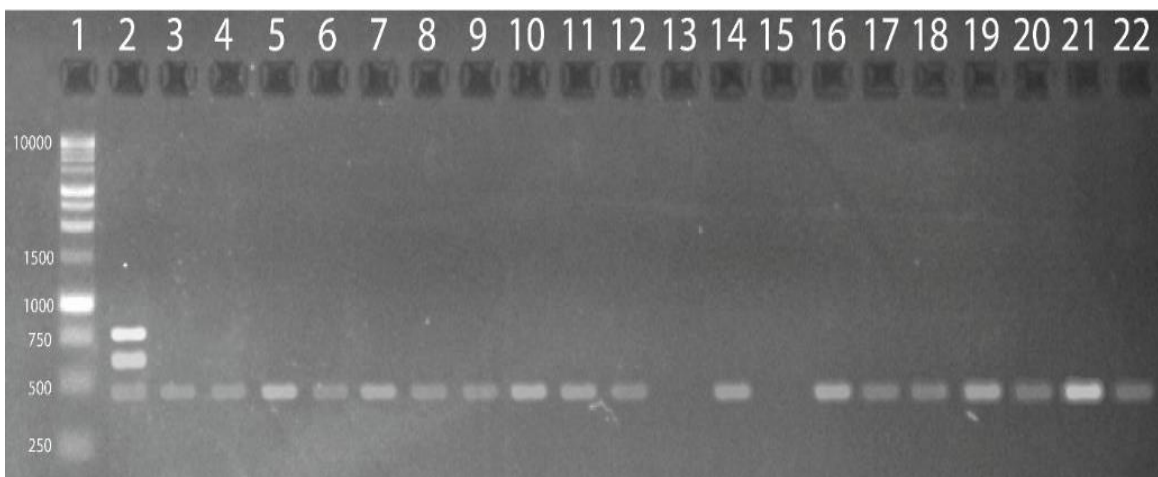
Una vez que se estableció las condiciones adecuadas individualmente de la técnica de PCR en la detección de los genes de interés *cfr*, *optrA* y *poxxA*, se procedió a realizar la Master Mix con las condiciones presentadas en la tabla 5. Los resultados obtenidos del ensayo de PCR multiplex mostraron bandas definidas como se muestra en la figura 12, demostrando un correcto funcionamiento del protocolo empleado en la técnica como se detalla en la tabla 4.



**Figura 12.** Ensayo PCR multiplex de los genes *cfr*, *optrA* y *poxxA*. Carriles: (1) Ladder 1kb. (2) PCR multiplex amplificación de los controles *cfr* con un peso de 746 pb, *poxxA* con 533 pb y *optrA* con 422 pb (3) PCR multiplex amplificación del control *cfr* con un peso de 746pb (4) PCR multiplex amplificación del control *poxxA* con un peso de 533pb (5) PCR multiplex amplificación del control *optrA* con un peso 422 pb.

#### **4.3.RESULTADOS GENOTIPIFICACIÓN DE *Enterococcus faecalis* Y *Enterococcus faecium* RESISTENTES AL LINEZOLID**

Fueron amplificados 42 aislados entre *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* a través de la técnica de PCR multiplex en gel de agarosa al 2% mediante electroforesis a 70V durante 70 minutos detallados en el Anexo 6. Entre los resultados obtenidos se muestra una predominancia del gen *optrA* en 36 aislados conformados por *Enterococcus faecalis* correspondientes a un 86% y un 2 % de *Enterococcus faecium*, mientras que 4 aislados de *Enterococcus faecalis* correspondientes a un 10% y un 2% de *Enterococcus faecium* no mostraron amplificación a ninguno de los genes de interés, no se observó la presencia de los genes *cfr* y *poxxA* en los aislados, los siguientes datos se detallan en la figura 13 y tabla 16.



**Figura 13.** Gel de agarosa al 2% productos de la PCR multiplex en la detección de los genes *cfr*, *optrA* y *poxtA*. Carilles. (1) Ladder 1kb, (2) Control *cfr*, *optrA* y *poxtA* Multiplex. Predominancia del gen *optrA* con un peso de 422 pb.

**Tabla 16.** Resultados genotípicos de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*

Especie	<i>cfr</i> % (n=42)	<i>optrA</i> % (n=42)	<i>poxtA</i> % (n=42)	Ausencia de los genes de resistencia
<i>Enterococcus faecalis</i>	(n=0/42) 0%	(n=36/42) 86%	(n=0/42) 0%	(n=4/42) 10%
<i>Enterococcus faecium</i>	(n=0/42) 0%	(n=1/42) 2%	(n=0/42) 0%	(n=1/42) 2%

#### 4.4.RESULTADOS FENOTÍPICOS Y GENOTÍPICOS DE *Enterococcus faecalis* Y *Enterococcus faecium*

##### 4.4.1.Correlación fenotípica y genotípica de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*

Se estableció la relación genotípica junto a los resultados fenotípicos de microdilución en caldo recuperados de la base de datos Whonet del Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos, obteniendo como resultado que el 57% de los aislados de *Enterococcus faecalis* con presencia de *optrA* presentaron valores de CMI  $\geq 16$  mg/L, el 28% valores de CMI  $\geq 8$  mg/L, 2% valores de CMI  $\geq 4$  mg/L, mientras que *Enterococcus faecalis* con ausencia de genes presentaron valores de CMI  $\geq 16$  mg/L correspondiente al

9%. Por otro lado, el 2% de los aislados de *Enterococcus faecium* con presencia de *optrA* presentan un valor de CMI  $\geq 16$ mg/L y un *Enterococcus faecium* sin presencia de genes resistencia presentó un CMI  $\geq 8$  mg/L como se observa en la tabla 17.

**Tabla 17.** Resultados fenotípicos y genotípicos de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*.

Especie	Gen	Microdilución en caldo (CIM)		
		Intermedio	Resistente	
		$\geq 4$ mg/L	$\geq 8$ mg/L	$\geq 16$ mg/L
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>optrA</i>	(n=1/42) 2%	(n=12/42) 28%	(n=23/42) 57%
	Ausencia de los genes			(n= 4/42) 9%
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>optrA</i>			(n= 1/42) 2%
	Ausencia de los genes		(n=1/42) 2%	

## CAPITULO V

### 5.1.DISCUSIÓN

Las especies de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* se encuentran entre los patógenos más frecuentes que causan infecciones intrahospitalarias gracias a su adaptabilidad y su diversa resistencia a los antibióticos entre ellos el linezolid, el cual es un antibiótico de último recurso frecuentemente utilizado en *Enterococcus* spp resistentes a la vancomicina. La prevalencia de *Enterococcus* spp resistentes al linezolid se encuentran en baja proporción a nivel mundial (Dadashi et al., 2021). Sin embargo, estos han sido reportados por la vigilancia en varios centros de referencia nacional a los antimicrobianos de otros países (Dadashi et al., 2021; Deshpande et al., 2018; Saavedra et al., 2020).

La resistencia se presenta a través de mutaciones cromosómicas que afectan la estructura ribosomal del ARNr 23s, y la adquisición de genes de resistencia como *cfr* o las proteínas de protección ribosomal *optrA* y *poxxA*, mediados por elementos genéticos móviles, albergados en plásmidos y en transposones compuestos en el cromosoma bacteriano. De esta manera, se evidencia la rápida diseminación mediante transferencia horizontal entre enterococos y entre miembros de una misma familia (Bender et al., 2019). Por lo cual, es de esperarse una rápida difusión de *cfr*, *optrA* y *poxxA* debido a la capacidad de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* de transmitirse mediante elementos genéticos móviles (Sadowy, 2018).

La expedita distribución de los genes implicados en la resistencia al linezolid ha generado la necesidad de su control epidemiológico, con la finalidad de conocer su frecuencia y su entorno genético a través de técnicas moleculares, las mismas que son utilizadas frecuentemente, ya que mantienen una alta sensibilidad y especificidad en la determinación genotípica de genes de interés como son *cfr*, *optrA* y *poxxA* en *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* resistentes al linezolid.

Para la genotipificación de los genes de resistencia se implementó una PCR multiplex implicada en la determinación de *cftr*, *optrA* y *poxA*, en la cual se establecieron las condiciones adecuadas para un correcto funcionamiento de la técnica. Actualmente, existe un solo estudio publicado por Bender (2019) del cual, se parte como referencia para el desarrollo del ensayo. Entre las variables tomadas en el desarrollo de la técnica, la extracción de DNA, la cual se realizó mediante ebullición, se presenta como una limitación, al no contar con un kit de extracción a comparación del estudio de Bender (2019), si bien la técnica de ebullición es un técnica de extracción que carece de pureza esta es útil al contar con primers con una alta especificidad, lo cual se justificó en el ensayo generando amplificaciones específicas de los controles de los genes de resistencia implicados en el estudio.

La concentración final de primers utilizada en el estudio fue de 0,2  $\mu\text{M}$  a diferencia del estudio de Bender (2019) el cual utilizó una concentración de 0.1  $\mu\text{M}$ , sin embargo, se obtuvo una amplificación con bandas definidas. El volumen de ADN utilizada en el estudio de Bender (2019) fue de 5-10  $\mu\text{L}$  a diferencia de este estudio el cual utilizo 2  $\mu\text{L}$  dando un buen resultado con un menor volumen evidenciando la amplificación de los genes de interés. La Taq polimerasa usada en este estudio es diferente a la utilizada por Bender (2019); sin embargo, se utilizó la misma concentración de 2X obteniendo una correcta amplificación.

El protocolo de trabajo se adecuo al Termociclador BioRad C1000® utilizado en el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública, el cual se basó en la publicación de Bender (2019) donde se mantuvo un tiempo de activación de 2 minutos, el cual fue suficiente para activar la Taq polimerasa. Las temperaturas de hibridación oscilaban entre 50-55°C que experimentalmente presentaron amplificación por lo cual se tomó la temperatura de 50 °C manifestada por Bender (2019). Los ciclos ensayados en la técnica se evaluaron en base a las recomendaciones de Promega Go Taq Green (Anexo 4) en 35 ciclos obteniendo una amplificación de bandas de buena calidad. El tiempo de elongación se realizó en un rango de 30-60 segundos, los cuales no mostraron amplificaciones inespecíficas, tras este resultado se tomó el tiempo de 30 segundos con el fin de reducir el tiempo de reacción para mayor eficacia del método.

La especificidad de la PCR multiplex se evaluó realizando ensayos moleculares a través del uso de primers específicos de los genes *cfr*, *optrA* y *poxtA*, pero con ADN de otros genes a diferencia de otros estudios en los que se utilizan cepas ATCC. El ensayo demostró una alta especificidad de los primers al no amplificar ninguno de ellos; cabe recalcar que el ADN fue medido, ya que concentraciones bajas pueden generar resultados erróneos al no descartar amplificación del gen por falta de ADN en la reacción; sin embargo, los resultados obtenidos en el ensayo del límite de detección donde se evaluó la última amplificación registrada en la prueba, arrojó valores de concentración entre 0.006 y 0.003 ng de ADN, lo cual indica que la técnica permite la amplificación de los genes de interés con cantidades bajas de ADN, lo que permite que el protocolo sea funcional y de ayuda en la vigilancia de los aislados resistentes al linezolid aumentando la eficacia del ensayo.

Dentro de este estudio se incluyeron 42 cepas aisladas del período 2017 al 2020 referidas al Centro de Referencia Nacional a los Antimicrobianos. Algunos estudios tales como el presentado por Dadashi (2021), manifiesta una baja prevalencia a nivel global de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* no susceptibles al linezolid. Sin embargo, esta resistencia se presenta en mayor proporción en *Enterococcus faecalis*, lo cual corrobora los datos obtenidos en este estudio, donde se demuestra una mayor frecuencia de *Enterococcus faecalis* resistentes al linezolid con un 95% y *Enterococcus faecium* con un 5% del total de la muestra en este estudio, estos resultados difieren de otros estudios de vigilancia tales como la plataforma global SENTRY en donde se menciona una mayoría de aislamientos de *Enterococcus faecium* resistentes al linezolid (Deshpande et al., 2018), al igual que el estudio planteado por Bender (2019), sin embargo, estos datos pueden variar dependiendo el área geográfica, de esta manera se deduce una predominancia de *Enterococcus faecalis* el cual mantiene una estrecha relación con el aumento de la diseminación horizontal del gen *optrA* con una alta predominancia en este estudio.

Entre los determinantes génicos que confieren resistencias al linezolid, se observa en este estudio una predominancia del gen *optrA* con un 86% presente en *Enterococcus faecalis*, un 2% en *Enterococcus faecium*. Por otro lado, un 10% de *Enterococcus faecalis* y un 2% de *Enterococcus faecium* no presentaron ningún gen de resistencia. Estos resultados demuestran una alta frecuencia del gen *optrA*, dato que se corrobora con otros estudios como la publicación de Bender (2019), la cual detalla una predominancia del gen *optrA* en

*Enterococcus faecalis*, al igual que la publicación de países vecinos como Colombia donde Saavedra (2020), menciona la presencia del gen *optrA* en un 96% de *Enterococcus faecalis* relacionándose con el estudio. Así mismo, la plataforma de vigilancia SENTRY manifiesta la presencia del gen *optrA* en un 72% presentes en *Enterococcus faecalis*, mientras que los genes *cfr* y *poxA* se asocian con mayor frecuencia en *Enterococcus faecium* de los cuales no se obtuvo amplificación de los mismos y hasta el momento no se han presentado casos en Latinoamérica. (Sadowi, 2018).

De igual manera, la plataforma de vigilancia SENTRY en su estudio manifiesta una mayor frecuencia de las mutaciones del ARNr 23s, y las proteínas L3 y L4 en *Enterococcus faecium* mencionado por Deshpande (2018) esto puede relacionarse al 12% restante de aislados que no presentaron ningún gen de resistencia, los cuales podrían mantener dichas mutaciones por lo cual es importante realizar estudios que confirmen la presencia de las mutaciones del ARNr 23s de los aislados estudiados.

Además, cabe recalcar que diversas investigaciones mencionan la rápida difusión del gen *optrA*, gracias a su fácil transmisión horizontal a través de plásmidos de tipo pE349 reportados en Colombia los cuales mantenían tres tipos similares al plásmido pEf-01 correspondientes a pEF123, pAF379 y pEF12 en carne de ganado avícola, y el plásmido aislado de una muestra humana en Ecuador 751,258 con una secuencia parcial (Cavaco et al., 2016; Deshpande et al., 2018), de esta manera se puede suponer la diseminación efectiva del gen *optrA* y la importancia de conocer su ambiente genético, con la finalidad de conocer el mecanismo de acción relacionado a su transmisión horizontal en los aislados que se refieren al Centro de Referencia Nacional a los Antimicrobianos.

Por último, la evaluación fenotípica de *Enterococcus faecalis* con presencia del gen *optrA* (57%) presentaron valores de (CMI  $\geq$  16 mg/dL), un (28%) (CMI  $\geq$  8 mg/dL), y un (2%) (CMI  $\geq$  4 mg/dL) estos resultados se corroboran con el estudio de la plataforma de vigilancia SENTRY, donde *Enterococcus faecalis* con presencia del gen *optrA* presento rangos de (CMI  $\geq$  4-16 mg/dL), mientras que en *Enterococcus faecium* con presencia de *optrA* en un (2%) presenta valores de (CMI  $\geq$  16 mg/dL) relacionándose con el estudio de la plataforma ZAAPS en la que se detalla valores de CIM  $\geq$  16 mg/L en *Enterococcus faecium* (Pfaller et al., 2017). Además, en este estudio *Enterococcus faecalis* sin presencia

de genes de resistencia (9%) muestran valores de (CIM  $\geq$ 16 mg/L), y un (2%) de *Enterococcus faecium* con ausencia de los genes de resistencia presentó valores de (CIM  $\geq$ 8 mg/L) los cuales pueden relacionarse estrechamente con la mutación de ARNr 23s o de las proteínas L3 y L4 tomando en cuenta que el estudio de la plataforma SENTRY (2018) establece rangos de (CIM  $\geq$ 8-16 mg/L) en *Enterococcus faecalis*, no obstante se presenta mayor resistencia en *Enterococcus faecium* con valores de (CIM  $\geq$  16- 64 mg/L), para lo cual se debe considerar continuar con el estudio para obtener datos fenotípicos de la relación de la CIM con la mutación ribosomal del ARNr 23s y las proteínas L3 y L4.

En este estudio se pudo comparar algunos criterios conforme a las diversas investigaciones implicadas en la resistencia al linezolid en *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, si bien la prevalencia es baja en los últimos años la diseminación de determinantes génicos como el gen *optrA* , albergado en diferentes plásmidos que fueron previamente mencionados, contribuyen a la fácil distribución en diferentes zonas geográficas, es por esta razón que se debe realizar una constante vigilancia epidemiológica con la finalidad de tener de una visión de clara de la resistencia al linezolid al ser un fármaco de última instancia contra infecciones de enterococos resistentes a la vancomicina.

## 5.2.CONCLUSIONES

La metodología utilizada en el desarrollo de una PCR multiplex para la detección de los genes *cfr*, *optrA* y *poxtA*, se identificaron mediante dos reacciones con la finalidad de obtener una correcta caracterización de los genes de resistencia y evitar errores al interpretar las bandas amplificadas. La evaluación individual de los genes previamente mencionados demostró una alta especificidad de los primers de cada gen de interés, de esta manera se evitó resultados falsos positivos asegurando la detección específica de los genes que confieren resistencia al linezolid.

El límite de detección de la técnica previamente ensayada corroboró que la técnica es capaz de amplificar de manera correcta hasta una concentración de ADN 0.006/ 0,003 ng, lo que demuestra la eficacia de la técnica al detectar y amplificar los genes implicados en la resistencia al linezolid de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* en concentraciones bajas de ADN

La resistencia al linezolid mantiene una baja prevalencia en varios estudios, no obstante, esta debe ser vigilada por los centros de referencia nacionales al ser un tratamiento de última instancia en infecciones por enterococos resistentes a la vancomicina. El primer avistamiento del gen *optrA* en Ecuador fue en el año 2019 sin embargo, mediante este estudio se evidencia su presencia desde el año 2017 con una gran predominancia en aislados de *Enterococcus faecalis* de origen hospitalario con altos niveles de CMI  $\geq 8-16$  mg/L, lo cual se corrobora con otros estudios de vigilancia global debido a su diseminación a través de elementos genéticos móviles, por lo cual recae su importancia de vigilar detalladamente este tipo de mecanismos de resistencia, con la finalidad de mantener un control epidemiológico de este tipo de resistencia en el sistema de salud pública. Finalmente, hasta el momento no se presentan los genes *cfr* y *poxtA* en el Ecuador, de esta manera es necesario seguir manteniendo un control de su posible diseminación lo cual recae en el aumento de la limitación de opciones terapéuticas en infecciones por *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* el cual mantienen un dominio de resistencia a la vancomicina que es el tratamiento de primera línea utilizado ante este tipo de infecciones.

### 5.3.RECOMENDACIONES

Se recomienda el uso de lisozima y proteinasa K en la extracción de ADN de bacterias Gram positivas como *Enterococcus* spp, al ser un método casero y no disponer de métodos comerciales de extracción los cuales utilizan soluciones de lisado y de purificación.

Se propone continuar con el estudio en la búsqueda de las diferentes mutaciones puntuales del ARN 23s, y la interacción de los plásmidos que albergan el gen *optrA* con la finalidad de realizar una vigilancia completa de la población de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* presentes en los hospitales del País.

De igual manera, se debe realizar un estudio comparativo de los diferentes métodos manuales como es la difusión en disco y E-test; los métodos automatizados como Vite y Sensititre, en conjunto con el análisis molecular para evaluar el desempeño de las diferentes técnicas en la determinación de la susceptibilidad de las cepas resistentes al linezolid.

## BIBLIOGRAFÍA

- Allergan, D., & Nordisk, N. (2019). Eficacia de las combinaciones antimicrobianas para el tratamiento de infecciones enterocócicas: una revisión crítica. 36(5), 556–564.
- Antonelli, A., Andrea, M. M. D., Brenciani, A., Galeotti, C. L., Morroni, G., Pollini, S., Varaldo, P. E., & Rossolini, G. M. (2018). Characterization of *poxtA*, a novel phenicol – oxazolidinone – tetracycline resistance gene from an MRSA of clinical origin. April, 4–10. <https://doi.org/10.1093/jac/dky088>
- Arias, C. A., Vallejo, M., Reyes, J., Panesso, D., Moreno, J., Villegas, M. V, Murray, B. E., & Quinn, J. P. (2008). Clinical and Microbiological Aspects of Linezolid Resistance Mediated by the *cfr* Gene Encoding a 23s rRNA Methyltransferase □. 46(3), 892–896. <https://doi.org/10.1128/JCM.01886-07>
- Arias, C. A., Contreras, G. A., & Murray, B. E. (2010). Management of multidrug-resistant enterococcal infections. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 16(6), 555–562. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03214.x>
- BD. (2014). BBL Brain Heart Infusion BBL Brain Heart Infusion with 6.5% Sodium Chloride. BBL Brain Heart Infusion BBL Brain Heart Infusion with 6.5% Sodium Chloride.
- Bender, J. K., Fleige, C., Klare, I., & Werner, G. (2019). Development of a multiplex-PCR to simultaneously detect acquired linezolid resistance genes *cfr*, *optrA* and *poxtA* in enterococci of clinical origin. *Journal of Microbiological Methods*, 160(February), 101–103. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.03.025>
- Betancor, L., Gadea, M., & Flores, K. (2008). Genética bacteriana. C, 59–80.
- Birmingham, M. C., Rayner, C. R., Meagher, A. K., Flavin, S. M., Batts, D. H., & Schentag, J. J. (2003). Linezolid for the treatment of multidrug-resistant, gram-positive infections: Experience from a compassionate-use program. *Clinical Infectious Diseases*, 36(2), 159–168. <https://doi.org/10.1086/345744>
- Cabezón, E., Ripoll-rozada, J., Peña, A., Cruz, F. De, & Arechaga, I. (2014). Towards an integrated model of bacterial conjugation. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12085>
- Cavaco, L. M., Bernal, J. F., Zankari, E., & Le, M. (2016). Detection of linezolid resistance due to the *optrA* gene in *Enterococcus faecalis* from poultry meat from the American continent ( Colombia ). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(A), 1–

6. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw490>
- CDC. (2018). Antibiotic / Antimicrobial Resistance. Antibiotic / Antimicrobial Resistance. <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>
- Chow, J. W., Thal, L. E. E. A. N. N., Perri, M. B., Vazquez, J. A., Donabedian, S. M., Clewell, D. O. N. B., & Zervos, M. J. (1993). Plasmid-Associated Hemolysin and Aggregation Substance Production Contribute to Virulence in Experimental Enterococcal Endocarditis. *37*(11), 2474–2477.
- Colca, J. R., McDonald, W. G., Waldon, D. J., Thomasco, L. M., Gadwood, R. C., Lund, E. T., Cavey, G. S., Mathews, W. R., Adams, L. D., Cecil, E. T., Pearson, J. D., Bock, J. H., Mott, J. E., Shinabarger, D. L., Xiong, L., & Mankin, A. S. (2003). Cross-linking in the living cell locates the site of action of oxazolidinone antibiotics. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(24), 21972–21979. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302109200>
- Dadashi, M., Sharifian, P., Bostanshirin, N., & Hajikhani, B. (2021). The Global Prevalence of Daptomycin , Tigecycline , and faecalis and *Enterococcus faecium* Strains From Human Clinical Samples : A Systematic Review and. *8*(September), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.720647>
- Deshpande, L. M., Castanheira, M., Flamm, R. K., & Mendes, R. E. (2018). Evolving oxazolidinone resistance mechanisms in a worldwide collection of enterococcal clinical isolates: Results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *73*(9), 2314–2322. <https://doi.org/10.1093/jac/dky188>
- Diaz, L., Kiratisin, P., Mendes, R. E., Panesso, D., Singh, K. V., & Arias, C. A. (2012). Transferable plasmid-mediated resistance to linezolid due to *cfp* in a human clinical isolate of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *56*(7), 3917–3922. <https://doi.org/10.1128/AAC.00419-12>
- Egan, S. A., Shore, A. C., Connell, B. O., Brennan, G. I., & Coleman, D. C. (2020). Linezolid resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from hospitalized patients in Ireland : high prevalence of the MDR genes *optrA* and *poxtA* in isolates with diverse genetic backgrounds. 4–11. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa075>
- Fang, H., Ohlsson, A. K., Ullberg, M., & Ozenci, V. (2012). Evaluation of species-specific PCR, Bruker MS, VITEK MS and the VITEK 2 system for the identification of

- clinical *Enterococcus* isolates. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 31(11), 3073–3077. <https://doi.org/10.1007/s10096-012-1667-x>
- Fiore, E., Van Tyne, D., & Gilmore, M. S. (2019). Pathogenicity of *Enterococci*. *Microbiology Spectrum*, 7(4), 1–23. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0053-2018>
- García-Solache, M., & Rice, L. B. (2019). The enterococcus: A model of adaptability to its environment. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 32, Issue 2, pp. 1–28). <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-18>
- Haas, W., Shepard, B. D., & Gilmore, M. S. (2002). Two-component regulator of *Enterococcus faecalis* cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction. 415(January), 3–6.
- Higuita, N. I. A., & Huycke, M. M. (2014). Enterococcal Disease , Epidemiology , and Implications for Treatment Enterococcal Disease. 1–26.
- Hirt, H., Manias, D. A., Bryan, E. M., Klein, J. R., Marklund, J. K., Staddon, J. H., Paustian, M. L., Kapur, V., & Dunny, G. M. (2005). Characterization of the pheromone response of the *Enterococcus faecalis* conjugative plasmid pCF10: complete sequence and comparative analysis of the transcriptional and phenotypic responses of pCF10-containing cells to pheromone induction. *Journal of bacteriology*, 187(3), 1044–1054. <https://doi.org/10.1128/JB.187.3.1044-1054.2005>
- INSPI. (2019). Alerta Epidemiológica *Enterococcus faecalis* resistente a linezolid por presencia del gen *Optra*. Alerta Epidemiológica *Enterococcus faecalis* Resistente a Linezolid Por Presencia Del Gen *Optra*. <http://www.investigacionsalud.gob.ec/webs/ram/wp-content/uploads/2019/09/Captura-de-pantalla-2019-09-10-a-las-3.58.01-p.m..png>
- INSPI. (2021). Control de Calidad Medios de Cultivo.
- Johnson, C. M., & Grossman, A. D. (2015). Integrative and Conjugative Elements (ICEs): What They Do and How They Work. *Annual review of genetics*, 49, 577–601. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-112414-055018>
- Jordi Cámara, Camoez, M., Pujol, M., & Ayats, J. (2018). Detection of the Novel *optra* Gene. 00(00). <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0028>
- Kristich, C. J., Rice, L. B., & Arias, C. A. (2014). *Enterococcal Infection-Treatment and Antibiotic Resistance*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/>

- Kehrenberg, C., Schwarz, S., Jacobsen, L., Hansen, L. H., & Vester, B. (2005). A new mechanism for chloramphenicol, florfenicol and clindamycin resistance: methylation of 23s ribosomal RNA at A2503. *57*, 1064–1073. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04754.x>
- Liu, Y., Wang, Y., Wu, C., Shen, Z., Schwarz, S., Du, X., Dai, L., & Zhang, W. (2012). First Report of the Multidrug Resistance Gene *cfr* in *Enterococcus faecalis* of Animal Origin. *1650–1654*. <https://doi.org/10.1128/AAC.06091-11>
- Marshall, S. H., Donskey, C. J., Salata, R. A., & Rice, L. B. (2002). Gene Dosage and Linezolid Resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *46(10)*, 3334–3336. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.10.3334>
- Martínez-Martínez, L., & Calvo, J. (2010). *Desarrollo de las resistencias a los antibióticos: causas, consecuencias y su importancia para la salud pública. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *28*, 4–9. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(10\)70035-5](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(10)70035-5)
- Mishra, A. K., Choi, J., Rabbee, M. F., & Baek, K. (2019). In Silico Genome-Wide Analysis of the ATP-Binding Cassette Transporter Gene Family in Soybean (*Glycine max L.*) and Their Expression Profiling. Hindawi, 2019.
- Murdoch, D. R., Corey, G. R., & Hoen, B. (2015). Clinical Presentation, Etiology, and Outcome of Infective Endocarditis in the 21st Century. *169(5)*, 463–473.
- Murray, B. E., Singh, K. V, Nallapareddy, S. R., & Sillanpa, J. (2010). Importance of the Collagen Adhesin Ace in Pathogenesis and Protection against *Enterococcus faecalis* Experimental Endocarditis. *6(1)*. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000716>
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2016). Murray medical microbiology. NIH. (2021). No Title. ADN (Ácido Desoxirribonucleico). <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/ADN-acido-Desoxirribonucleico>
- OMS. (2002). Prevención de las infecciones nosocomiales. Guía Práctica, 1–13.
- OMS. (2021). No Title. Resistencia a Los Antimicrobianos. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- Opal, S. M. (2021). 18 - Mecanismos moleculares de resistencia antimicrobiana en las bacterias. In Mandell, Douglas y Bennett. *Enfermedades infecciosas. Principios y práctica* (Ninth Ed). Elsevier España, S.L.U. <https://doi.org/10.1016/B978-84-9113-499-2/00018-7>
- Palmer, K. L., Kos, V. N., & Gilmore, M. S. (2010). Horizontal gene transfer and the

- genomics of enterococcal antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology*, 13(5), 632–639. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.08.004>
- Park, S. Y., Kim, K. M., Lee, J. H., Seo, S. J., Lee, I. H., Al, P. E. T., & Mmun, I. N. I. (2007). Extracellular Gelatinase of *Enterococcus faecalis* Destroys a Defense System in Insect Hemolymph and Human Serum □. 75(4), 1861–1869. <https://doi.org/10.1128/IAI.01473-06>
- Patti, J. M., & Hiiiik, M. (1994). Microbial adhesink recognizing extracellular macromolecules. *Current Opinion in Microbiology*, 752–758.
- Pfaller, M. A., Mendes, R. E., Streit, J. M., Hogan, P. A., & Flamm, R. K. (2017). ZAAPS Program results for 2015: An activity and spectrum analysis of linezolid using clinical isolates from medical centres in 32 countries. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(11), 3093–3099. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx251>
- Poyart, C., Quesnes, G., & Trieu-Cuot, P. (2000). Sequencing the gene encoding manganese-dependent superoxide dismutase for rapid species identification of enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(1), 415–418. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.1.415-418.2000>
- Rosvoll, TC, Pedersen, T., Sletvold, H., Johnsen, PJ, Sollid, JE, Simonsen, GS, Jensen, LB, Nielsen, KM y Sundsfjord, A. (2010). La tipificación de plásmidos basada en PCR en cepas de *Enterococcus faecium* revela replicones relacionados con pRE25, pRUM, pIP501 y pHTbeta ampliamente distribuidos asociados con resistencia a glicopéptidos y sistemas estabilizadores de toxina-antitoxina. *FEMS inmunología y microbiología médica*, 58 (2), 254–268. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2009.00633.x>
- Rubio, J. M., Tammam, M. A., & Ta-tang, T. H. (2011). Uso de PCR múltiple en el diagnóstico simultáneo de parasitosis. *Biomédica*, 31, 253–261.
- Ruiz-ripa, L., Feßler, A. T., Hanke, D., Eichhorn, I., Azcona-guti, M., P, M. O., Seral, C., Aspiroz, C., Alonso, C. A., Torres, L., Al, J., Schwarz, S., & Torres, C. (2020). Mechanisms of Linezolid Resistance Among Enterococci of Clinical Origin in Spain — Detection of *optrA* - and *cfr* ( D ) -Carrying E . faecalis. D.
- Saavedra, S. Y., Bernal, J. F., Montilla-Escudero, E., Torres, G., Rodríguez, M. K., Hidalgo, A. M., Ovalle, M. V., Rivera, S., Perez-Gutierrez, E., & Duarte, C. (2020). Vigilancia nacional de aislamientos clínicos de *Enterococcus faecalis* resistentes al linezolid portadores del gen *optrA* en Colombia, 2014-2019. *Revista Panamericana de*

- Salud Pública, 44, 1. <https://doi.org/10.26633/rpsp.2020.104>
- Sadowy, E. (2018). Plasmid Linezolid resistance genes and genetic elements enhancing their dissemination in enterococci and streptococci. *Plasmid*, May, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2018.09.011>
- Shaw, K. J., Rather, P. N., Hare, R. S., & Miller, G. H. (1993). Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiological reviews*, 57(1), 138–163. <https://doi.org/10.1128/mr.57.1.138-163.1993>
- Sara Cosgrove, M.D., M. ., Edina Avdic, Pharm.D., M. B. ., Kate Dzintars, P. D., & Janessa Smith, P. . (2015). Antibiotic guidelines [2]. In *Journal of the Royal College of Physicians of London* (Vol. 27, Issue 2). <https://doi.org/10.1136/pgmj.69.809.245>
- Seija, V. (2019). COCOS GRAM POSITIVOS: Aspectos prácticos. COCOS GRAM POSITIVOS: Aspectos Prácticos. <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap19.pdf>
- Shen, J., Wang, Y., & Schwarz, S. (2013). Presence and dissemination of the multiresistance gene *CFR* in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(8), 1697–1706. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt092>
- Sherman, J. M. (1937). the Streptococci. *Bacteriological Reviews*, 1(1), 3–97. <https://doi.org/10.1128/membr.1.1.3-97.1937>
- Tamay De Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2014). de la polimerasa ( PCR ) y de la PCR en tiempo real. *Investigación En Discapacidad*, 70–80.
- Taroco, R., Seija, V., & Vignoli, R. (2008). Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. Métodos de Estudio de La Sensibilidad Antibiótica. <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA36.pdf>
- Torres, C., Alonso, C. A., Ruiz-ripa, L., León-sampedro, R., Campo, R. D. E. L., & Coque, T. M. (2018). Antimicrobial Resistance in *Enterococcus* spp . of animal origin. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0032-2018>.Correspondence
- Travaglianti, M., Pérez, M., Sberna, N., Rousseau, M., Calle, G., & Gómez, S. (2007). Tratamiento de infecciones por *Enterococcus* resistente a vancomicina con linezolid en un hospital pediátrico. *Farmacia Hospitalaria*, 31(1), 43–47. [https://doi.org/10.1016/S1130-6343\(07\)75710-0](https://doi.org/10.1016/S1130-6343(07)75710-0)
- Vega, S., & Dowzicky, M. J. (2017). Antimicrobial susceptibility among Gram-positive and Gram-negative organisms collected from the Latin American region between

- 2004 and 2015 as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 16(1), 50. <https://doi.org/10.1186/s12941-017-0222-0>
- Vester, B. (2018). Research in Microbiology The *cfr* and *cfr*-like multiple resistance genes. *Research in Microbiology*, 169(2), 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2017.12.003>
- Vizváryová, M., & Valková, D. (2004). Transposons – the useful genetic tools. *Biologia*, Bratislava, 1981, 309–318.
- Wada, Y., Harun, A. B., & Yean, C. Y. (2020). Vancomycin-Resistant Enterococci ( VRE ) in Nigeria : The First Systematic Review and Meta-Analysis. 1–16.
- Wang, Y., Lv, Y., Cai, J., Schwarz, S., Cui, L., Hu, Z., Zhang, R., Li, J., Zhao, Q., He, T., Wang, D., Wang, Z., Shen, Y., Li, Y., Feßler, A. T., Wu, C., Yu, H., Deng, X., Xia, X., & Shen, J. (2015). A novel gene, *optrA*, that confers transferable resistance to oxazolidinones and phenicols and its presence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* of human and animal origin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(8), 2182–2190. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv116>
- Zscheck, K. K., & Murray, B. E. (1993). Genes Involved in the Regulation of , B-Lactamase Production in Enterococci and Staphylococci. 37(9), 1966–1970.

# ANEXOS

## Anexo 1. Carta de intención de interés institucional.



República  
del Ecuador

Instituto Nacional de Investigación  
en Salud Pública INSPI - Dr. Leopoldo Izquieta Pérez

COORDINACIÓN ZONAL 9

### CARTA DE INTERÉS INSTITUCIONAL

#### A QUIEN PUEDA INTERESAR

Por medio del presente manifiesto que el estudio observacional con uso de aislamientos bacteriológicos titulado: "Caracterización genotípica de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* resistentes al linezolid en aislados del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública en el periodo 2017-2020", es de interés institucional para el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública, en atención al perfil epidemiológico tomando en cuenta la generación de datos epidemiológicos de los genes *cfr*, *optrA* y *poxA* en *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* resistentes a linezolid.

Informo que este documento no es la autorización ni la aprobación del estudio observacional con uso de aislamientos bacteriológicos, por lo tanto estas deberían ser emitidas por un comité de ética de la investigación en seres humanos (CEISH).

Una vez que la investigación sea aprobada por la autoridad sanitaria nacional correspondiente podrá ser ejecutado en esta institución.

Quito, 23 de Noviembre del 2021

Ing. Isaac Armendariz Castillo MSc, PhD(c)  
Coordinador Zonal 9  
Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública



Dirección: Av. Iquique N° 14-265 y Yaguachi (BARRIO EL DORADO)  
Código postal: 170136 / Quito - Ecuador  
Teléfono: 593-02 2552715 - 02 2505058 - 02 3226268 - 02 2509025 - 02 2900235  
www.investigacion.salud.gob.ec - www.inspi.gob.ec

Gobierno  
del Encuentro | Juntos  
lo logramos

## Anexo 2. Acuerdo de entendimiento entre el investigador y la institución INSPI



República  
del Ecuador

Instituto Nacional de Investigación  
en Salud Pública INSPI - Dr. Leopoldo Izquieta Pérez

COORDINACIÓN ZONAL 9

### CERTIFICACIÓN

Quito, 23 de noviembre del 2021

Dr. Santiago Escalante Vanoni  
Coordinación-Carrera Bioquímica Clínica/Laboratorio Clínico  
Facultad de Medicina-PUCE

De nuestras consideraciones:

En atención a su Oficio N° BQC-0185-21 del 22 de noviembre de 2021, donde señala que “el señor Andrés Santiago Aguirre Palacios con C.C.: 1003742499, estudiante del 9 nivel de la Carrera de Bioquímica Clínica – Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, presentó el pre-plan del Trabajo de Titulación intitulado “**Caracterización genotípica de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* resistentes al linezolid en aislados del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública en el periodo 2017-2020**” para desarrollarlo previa a la obtención del grado académico de tercer nivel, pre-plan que fue aprobado por el Comité de la Unidad de Titulación de la carrera y por el Subcomité de Bioética de la Facultad de Medicina-PUCE.”

Me permito comunicarle que, en mi calidad de Coordinador Zonal 9 del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública, certifico que nuestra institución acepta, aprueba y permite al estudiante mencionado acceder a los registros para la realización del determinado estudio.

Muy atentamente.

Ing. Isaac Armendariz Castillo MSc, PhD(c)  
Coordinador Zonal 9  
Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública



### Anexo 3. Aprobación del protocolo por el CEISH



**PUCE** COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS  
CEISH - PUCE

Av. 12 de octubre 1076 y Veintimilla  
Apartado postal 17-01-2184  
Telf.: (593) 2 299 17 00  
Quito - Ecuador [www.puce.edu.ec](http://www.puce.edu.ec)

Quito, 20 de diciembre de 2021  
Oficio CEISH-208-2021

Señor  
**Andrés Santiago Aguirre Palacios**  
Estudiante de la carrera de Bioquímica Clínica  
Pontificia Universidad Católica del Ecuador

Estimado Sr. Aguirre:

El Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos de la PUCE, estudió el proyecto: **Caracterización genotípica de Enterococcus faecalis y Enterococcus faecium resistentes al Linezolid en aislados del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública en el periodo 2017-2020**, código EO-33-2021. Este estudio se recibió el 02.12.2021

Tomando en cuenta que este proyecto cumple con los criterios mínimos necesarios según el Acuerdo Ministerial 00015-2021 publicado en el Segundo Suplemento del Registro Oficial No. 573 del 09.11.2021, los cuales fueron evaluados por el CEISH, este proyecto se encuentra **EXENTO**<sup>1</sup> de una revisión expedita o en pleno por parte del CEISH-PUCE.

Con nuestra consideración y estima,

**Dr. Iván Guillermo Dueñas Espín**  
Presidente  
Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos



<sup>1</sup> "Aquella que el comité de ética exime de revisión expedita o en pleno por tener un riesgo mínimo para los sujetos participantes en la investigación y que no requieran de consentimiento informado. Se consideran a proyectos sin participación de sujetos de investigación o que no usan datos personales, datos sensibles, información privada ni muestras biológicas humanas." (2021, p. 14)



Anexo 4. Medición de concentración de ADN (Nanodrop)

#	Sample ID	Nucleic Acid	Unit	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	260/230	Sample Type	Factor
1	Blanco	0,0	ng/µl	-0,001	0,035	-0,02	-0,06	DNA	50,00
2	cfr (QC+)	105,4	ng/µl	2,109	1,500	1,41	0,79	DNA	50,00
3	optrA (QC+)	101,5	ng/µl	0,426	0,211	2,02	0,97	DNA	50,00
4	poxtA (QC+)	98,5	ng/µl	1,514	0,785	1,93	1,49	DNA	50,00
#	Sample ID	Nucleic Acid	Unit	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	260/230	Sample Type	Factor
1	Blanco	0,0	ng/µl	0,000	-0,005	-0,05	0,06	DNA	50,00
2	B523	26,7	ng/µl	0,533	0,225	2,37	1,72	DNA	50,00
3	H0006	37,8	ng/µl	0,756	0,361	2,10	1,16	DNA	50,00
4	968	37,2	ng/µl	0,743	0,341	2,18	0,79	DNA	50,00
5	1035	35,9	ng/µl	0,718	0,311	2,31	1,23	DNA	50,00
6	1494	124,4	ng/µl	2,488	1,178	2,11	0,99	DNA	50,00
7	1642	47,9	ng/µl	0,957	0,457	2,09	0,76	DNA	50,00
8	1923	49,6	ng/µl	0,992	0,423	2,35	1,44	DNA	50,00
9	136	59,2	ng/µl	1,184	0,569	2,08	1,18	DNA	50,00
10	261	36,6	ng/µl	0,733	0,346	2,12	1,33	DNA	50,00
11	324	17,8	ng/µl	0,356	0,164	2,17	1,26	DNA	50,00
12	354	26,3	ng/µl	0,527	0,235	2,24	1,43	DNA	50,00
13	392	48,5	ng/µl	0,969	0,398	2,44	1,26	DNA	50,00
14	476	156,9	ng/µl	3,138	1,412	2,22	0,51	DNA	50,00
15	588	64,1	ng/µl	1,283	0,619	2,07	1,01	DNA	50,00
16	737	78,4	ng/µl	1,567	0,756	2,07	0,82	DNA	50,00
17	995	4,7	ng/µl	0,093	0,055	1,70	0,56	DNA	50,00
18	1043	114,3	ng/µl	2,285	1,107	2,06	0,81	DNA	50,00
19	1168	387,9	ng/µl	7,758	3,698	2,10	0,98	DNA	50,00
20	1287	97,2	ng/µl	1,945	0,976	1,99	1,31	DNA	50,00
21	1364	15,5	ng/µl	0,310	0,133	2,34	1,60	DNA	50,00
22	1366	33,4	ng/µl	0,668	0,276	2,42	1,27	DNA	50,00
23	1495	139,4	ng/µl	2,787	1,321	2,11	1,05	DNA	50,00
24	1598	43,5	ng/µl	0,871	0,406	2,14	0,89	DNA	50,00
25	1809	169,0	ng/µl	3,379	1,616	2,09	0,87	DNA	50,00
26	1923	18,9	ng/µl	0,378	0,172	2,20	0,95	DNA	50,00
27	2119	65,0	ng/µl	1,300	0,556	2,34	1,24	DNA	50,00
28	2120	59,6	ng/µl	1,191	0,528	2,26	1,23	DNA	50,00
29	2121	35,8	ng/µl	0,715	0,322	2,22	0,75	DNA	50,00
30	2122	34,8	ng/µl	0,696	0,282	2,47	1,73	DNA	50,00
31	2123	72,5	ng/µl	1,451	0,653	2,22	0,89	DNA	50,00
32	332	18,5	ng/µl	0,371	0,178	2,08	0,75	DNA	50,00
33	1266	240,1	ng/µl	4,801	2,214	2,17	1,55	DNA	50,00
34	1782	149,5	ng/µl	2,989	1,362	2,20	1,13	DNA	50,00
35	1129	42,0	ng/µl	0,841	0,433	1,94	1,11	DNA	50,00
36	595	43,5	ng/µl	0,869	0,400	2,17	0,89	DNA	50,00
37	596	72,7	ng/µl	1,454	0,619	2,35	1,50	DNA	50,00
38	1050	9,3	ng/µl	0,187	0,090	2,08	12,36	DNA	50,00
39	1053	13,6	ng/µl	0,271	0,139	1,95	-13,27	DNA	50,00
40	1087	34,7	ng/µl	0,694	0,265	2,61	1,08	DNA	50,00
41	2218	36,1	ng/µl	0,722	0,356	2,03	2,19	DNA	50,00
42	2255	19,6	ng/µl	0,392	0,163	2,41	1,06	DNA	50,00
43	1567	34,6	ng/µl	0,691	0,288	2,40	0,51	DNA	50,00

## Anexo 5. Especificaciones de Go Taq Green Master Mix (Promega)

### Certificate of Analysis

#### GoTaq® Green Master Mix

Cat.#	Size
M7121	10 reactions
M7122	100 reactions
M7123	1,000 reactions
M712B-C	1 × 1,250µl

Cat.# M7121, M7122 and M7123 include GoTaq® Green Master Mix, 2X, and Nuclease-Free Water.

Cat.# M712B-C does not include Nuclease-Free Water.

**Description:** GoTaq® Green Master Mix<sup>(a,b)</sup> is a premixed ready-to-use solution containing bacterially derived *Taq* DNA polymerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> and reaction buffers at optimal concentrations for efficient amplification of DNA templates by PCR. GoTaq® Green Master Mix contains two dyes (blue and yellow) that allow monitoring of progress during electrophoresis. Reactions assembled with GoTaq® Green Master Mix have sufficient density for direct loading onto agarose gels.

GoTaq® Green Master Mix is recommended for any amplification reaction that will be visualized by agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining. The master mix is not recommended if any downstream applications use absorbance or fluorescence excitation, as the yellow and blue dyes in the reaction buffer may interfere with these applications. The dyes absorb between 225–300nm, making standard A<sub>260</sub> readings to determine DNA concentration unreliable. The dyes have excitation peaks at 488nm and between 600–700nm that correspond to the excitation wavelengths commonly used in fluorescence detection instrumentation. However, for some instrumentation, such as a fluorescent gel scanner that uses a 488nm excitation wavelength, there will be minimal interference since it is the yellow dye that absorbs at this wavelength. Gels scanned by this method will have a light grey dye front (corresponding to the yellow dye front) below the primers.

**GoTaq® Green Master Mix, 2X:** GoTaq® DNA Polymerase is supplied in 2X Green GoTaq® Reaction Buffer (pH 8.5), 400µM dATP, 400µM dGTP, 400µM dCTP, 400µM dTTP and 3mM MgCl<sub>2</sub>. Green GoTaq® Reaction Buffer is a proprietary buffer containing a compound that increases sample density, and yellow and blue dyes, which function as loading dyes when reaction products are analyzed by agarose gel electrophoresis. The blue dye migrates at the same rate as 3–5kb DNA fragments, and the yellow dye migrates at a rate faster than primers (<50bp), in a 1% agarose gel.

**Storage Conditions:** See the Product Information Label for storage recommendations.

Part# 9PIM712

Revised 4/18



AF9PIM712 0418M712



Promega Corporation	
2800 Woods Hollow Road	
Madison, WI 53711-5399 USA	
Telephone	608-274-4330
Toll Free	800-356-9526
Fax	608-277-2516
Internet	www.promega.com

### Quality Control Assays

**Functional Assay:** GoTaq® Green Master Mix is tested for performance in the polymerase chain reaction (PCR). GoTaq® Green Master Mix, 1X, is used to amplify a 360bp region of the  $\alpha$ -1-antitrypsin gene from 100 molecules of human genomic DNA. The resulting PCR product is visualized on an ethidium bromide-stained agarose gel.

**Nuclease Assays:** No contaminating endonuclease or exonuclease activity detected.

#### PRODUCT USE LIMITATIONS, WARRANTY DISCLAIMER

Promega manufactures products for a number of intended uses. Please refer to the product label for the intended use statements for specific products. Promega products contain chemicals which may be harmful if misused. Due care should be exercised with all Promega products to prevent direct human contact.

Each Promega product is shipped with documentation stating specifications and other technical information. Promega products are warranted to meet or exceed the stated specifications. Promega's sole obligation and the customer's sole remedy is limited to replacement of products free of charge in the event products fail to perform as warranted. Promega makes no other warranty of any kind whatsoever, and SPECIFICALLY DISCLAIMS AND EXCLUDES ALL OTHER WARRANTIES OF ANY KIND OR NATURE WHATSOEVER, DIRECTLY OR INDIRECTLY, EXPRESS OR IMPLIED, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, AS TO THE SUITABILITY, PRODUCTIVITY, DURABILITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE OR USE, MERCHANTABILITY, CONDITION, OR ANY OTHER MATTER WITH RESPECT TO PROMEGA PRODUCTS. In no event shall Promega be liable for claims for any other damages, whether direct, incidental, foreseeable, consequential, or special (including but not limited to loss of use, revenue or profit), whether based upon warranty, contract, tort (including negligence) or strict liability arising in connection with the sale or the failure of Promega products to perform in accordance with the stated specifications.

© 2012–2018 Promega Corporation. All Rights Reserved.

GoTaq and Wizard are registered trademarks of Promega Corporation.

Products may be covered by pending or issued patents or may have certain limitations. Please visit our Web site for more information.

All prices and specifications are subject to change without prior notice.

Product claims are subject to change. Please contact Promega Technical Services or access the Promega online catalog for the most up-to-date information on Promega products.

Part# 9PIM712  
Printed in USA. Revised 4/18.



#### PCR Satisfaction Guarantee

Promega's PCR Systems, enzymes and reagents are proven in PCR to ensure reliable, high performance results. Your success is important to us. Our products are backed by a worldwide team of Technical Support scientists. Please contact them for applications or technical assistance. If you are not completely satisfied with any Promega PCR product we will send a replacement or refund your account.

**That's Our PCR Guarantee!**

Product must be within expiration date and have been stored and used in accordance with product literature. See Promega Product insert for specific tests performed.

<sup>(a)</sup>Use of this product in the US for basic PCR is outside of any valid US patents assigned to Hoffman La-Roche or Applied. This product can be used in the US for basic PCR in research, commercial or diagnostic applications without any license or royalty fees.

<sup>(b)</sup>U.S. Pat. No. 6,242,235, Australian Pat. No. 761757, Canadian Pat. No. 2,335,153, Chinese Pat. No. ZL9908861.7, Hong Kong Pat. No. HK 1040262, Japanese Pat. No. 3673175, European Pat. No. 1088060 and other patents pending.

Signed by:

R. Wheeler, Quality Assurance

## I. Standard Application

### Reagents to be Supplied by the User

template DNA	downstream primer
upstream primer	mineral oil (optional)

1. Thaw the GoTaq® Green Master Mix at room temperature. Vortex the Master Mix, then spin it briefly in a microcentrifuge to collect the material at the bottom of the tube.
2. Prepare one of the following reaction mixes on ice:

#### For a 25µl reaction volume:

Component	Volume	Final Conc.
GoTaq® Green Master Mix, 2X	12.5µl	1X
upstream primer, 10µM	0.25–2.5µl	0.1–1.0µM
downstream primer, 10µM	0.25–2.5µl	0.1–1.0µM
DNA template	1–5µl	<250ng
Nuclease-Free Water to	25µl	N.A.

#### For a 50µl reaction volume:

Component	Volume	Final Conc.
GoTaq® Green Master Mix, 2X	25µl	1X
upstream primer, 10µM	0.5–5.0µl	0.1–1.0µM
downstream primer, 10µM	0.5–5.0µl	0.1–1.0µM
DNA template	1–5µl	<250ng
Nuclease-Free Water to	50µl	N.A.

#### For a 100µl reaction volume:

Component	Volume	Final Conc.
GoTaq® Green Master Mix, 2X	50µl	1X
upstream primer, 10µM	1.0–10.0µl	0.1–1.0µM
downstream primer, 10µM	1.0–10.0µl	0.1–1.0µM
DNA template	1–5µl	<250ng
Nuclease-Free Water to	100µl	N.A.

3. If using a thermal cycler without a heated lid, overlay the reaction mix with 1–2 drops (approximately 50µl) of mineral oil to prevent evaporation during thermal cycling. Centrifuge the reactions in a microcentrifuge for 5 seconds.
4. Place the reactions in a thermal cycler that has been preheated to 95°C. Perform PCR using your standard parameters.

## II. General Guidelines for Amplification by PCR

### A. Denaturation

- Generally, a 2-minute initial denaturation step at 95°C is sufficient.
- Subsequent denaturation steps will be between 30 seconds and 1 minute.

### B. Annealing

- Optimize the annealing conditions by performing the reaction starting approximately 5°C below the calculated melting temperature of the primers and increasing the temperature in increments of 1°C to the annealing temperature.
- The annealing step is typically 30 seconds to 1 minute.

### C. Extension

- The extension reaction is typically performed at the optimal temperature for Taq DNA polymerase, which is 72–74°C.
- Allow approximately 1 minute for every 1kb of DNA to be amplified.
- A final extension of 5 minutes at 72–74°C is recommended.

### D. Refrigeration

- If the thermal cycler has a refrigeration or "soak" cycle, the cycling reaction can be programmed to end by holding the tubes at 4°C for several hours.
- This cycle can minimize any polymerase activity that might occur at higher temperatures, although this is not usually a problem.

### E. Cycle Number

- Generally, 25–30 cycles result in optimal amplification of desired products.
- Occasionally, up to 40 cycles may be performed, especially for detection of low-copy targets.

## III. General Considerations

### A. GoTaq® Green Master Mix Compatibility

GoTaq® Green Master Mix is compatible with common PCR additives such as DMSO and betaine. These additives neither change the color of GoTaq® Green Master Mix nor affect dye migration.

If both agarose gel analysis and further downstream applications involving absorbance or fluorescence will be used, the two dyes can be removed from reactions using standard PCR clean-up systems such as the Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Cat.# A9281).

### B. Primer Design

PCR primers generally range in length from 15–30 bases and are designed to flank the region of interest. Primers should contain 40–60% (G + C), and care should be taken to avoid sequences that might produce internal secondary structure. The 3'-ends of the primers should not be complementary to avoid the production of primer-dimers. Primer-dimers unnecessarily deplete primers from the reaction and result in an unwanted polymerase reaction that competes with the desired reaction. Avoid three G or C nucleotides in a row near the 3'-end of the primer, as this may result in nonspecific primer annealing, increasing the synthesis of undesirable reaction products. Ideally, both primers should have nearly identical melting temperatures ( $T_m$ ); in this manner, the two primers should anneal roughly at the same temperature. The annealing temperature of the reaction is dependent upon the primer with the lowest  $T_m$ . For assistance with calculating the  $T_m$  of any primer, a  $T_m$  Calculator is provided on the BioMath page of the Promega web site at: [www.promega.com/biomath/](http://www.promega.com/biomath/)

### C. Amplification Troubleshooting

To overcome low yield or no yield in amplifications (e.g., mouse tail genotyping applications), we recommend the following suggestions:

- Adjust annealing temperature. The reaction buffer composition affects the melting properties of DNA. See BioMath Calculator to calculate the melting temperature for primers in the GoTaq® reaction ([www.promega.com/biomath/](http://www.promega.com/biomath/)).
- Minimize the effect of amplification inhibitors. Some DNA isolation procedures, particularly genomic DNA isolation, can result in the copurification of amplification inhibitors. Reduce the volume of template DNA in reaction or dilute template DNA prior to adding to reaction. Diluting samples even 1:10,000 has been shown to be effective in improving results, depending on initial DNA concentration.
- Increase template DNA purity. Include an ethanol precipitation and wash step prior to amplification to remove inhibitors that copurify with the DNA.
- Add PCR additives. Adding PCR-enhancing agents (e.g., DMSO or betaine) may improve yields. General stabilizing agents such as BSA (Sigma Cat.# A7030; final concentration 0.16mg/ml) also may help to overcome amplification failure.

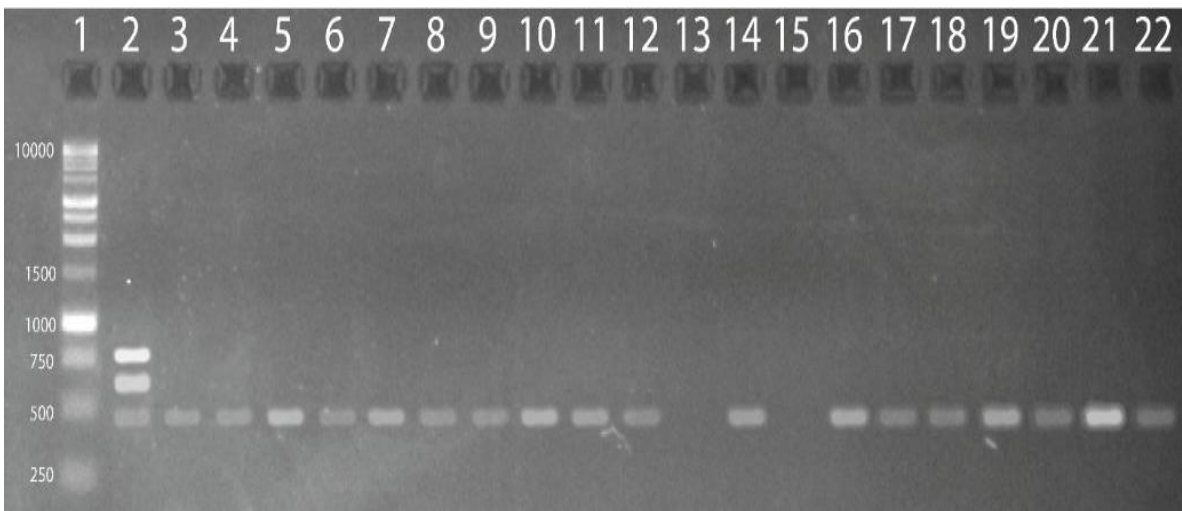
### D. More Information on Amplification

More information on amplification is available online at the Promega web site: [www.promega.com/products/pcr/](http://www.promega.com/products/pcr/)

**Anexo 6.** Resultados PCR multiplex en la detección de los genes de resistencia *cfr*, *optrA* y *poxtA*.

**Tabla 18.** Resultados genotípicos y fenotípicos de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*.

Nro.	CÓDIGO	ESPECIE	CIM LZD	Interpretación	<i>optrA</i>
1	523	<i>Enterococcus faecalis</i>	8	R	+
2	6	<i>Enterococcus faecalis</i>	16	R	+
3	968	<i>Enterococcus faecalis</i>	16	R	+
4	1035	<i>Enterococcus faecalis</i>	4	I	+
5	1464	<i>Enterococcus faecalis</i>	8	R	+
6	1642	<i>Enterococcus faecalis</i>	16	R	+
7	1923	<i>Enterococcus faecalis</i>	16	R	+
8	136	<i>Enterococcus faecalis</i>	8	R	+
9	261	<i>Enterococcus faecalis</i>	8	R	+
10	324	<i>Enterococcus faecalis</i>	16	R	+
11	354	<i>Enterococcus faecalis</i>	16	R	-
12	392	<i>Enterococcus faecalis</i>	8	R	+
13	476	<i>Enterococcus faecalis</i>	16	R	-
14	588	<i>Enterococcus faecalis</i>	16	R	+
15	737	<i>Enterococcus faecalis</i>	16	R	+
16	995	<i>Enterococcus faecalis</i>	16	R	+
17	1043	<i>Enterococcus faecalis</i>	16	R	+
18	1168	<i>Enterococcus faecalis</i>	16	R	+
19	1287	<i>Enterococcus faecalis</i>	16	R	+
20	1364	<i>Enterococcus faecalis</i>	16	R	+
21	1366	<i>Enterococcus faecalis</i>	8	R	+
22	1495	<i>Enterococcus faecalis</i>	8	R	+
23	1598	<i>Enterococcus faecalis</i>	8	R	+
24	1809	<i>Enterococcus faecalis</i>	16	R	+
25	1923	<i>Enterococcus faecalis</i>	16	R	+
26	2119	<i>Enterococcus faecalis</i>	16	R	+
27	2120	<i>Enterococcus faecalis</i>	8	R	+
28	2121	<i>Enterococcus faecalis</i>	8	R	+
29	2122	<i>Enterococcus faecalis</i>	16	R	+
30	2123	<i>Enterococcus faecalis</i>	16	R	+
31	332	<i>Enterococcus faecalis</i>	16	R	+
32	1266	<i>Enterococcus faecalis</i>	8	R	+
33	1782	<i>Enterococcus faecalis</i>	16	R	+
34	1129	<i>Enterococcus faecium</i>	16	R	+
35	595	<i>Enterococcus faecalis</i>	16	R	+
36	596	<i>Enterococcus faecalis</i>	16	R	-
37	1050	<i>Enterococcus faecalis</i>	8	R	+
38	1053	<i>Enterococcus faecalis</i>	16	R	-
39	1087	<i>Enterococcus faecalis</i>	16	R	+
40	2218	<i>Enterococcus faecalis</i>	16	R	+
41	2255	<i>Enterococcus faecalis</i>	16	R	+
42	1567	<i>Enterococcus faecium</i>	8	R	-



**Figura 14.** Resultados PCR multiplex *cfr*, *oprA* y *poxtA*. Carriles: (1) Ladder 1kb, (2) Control multiplex *cfr*, *oprA* y *poxtA*. (3) 523 *E. faecalis oprA*, (4) 006 *E. faecalis oprA*, (5) 968 *E. faecalis oprA*, (6) 1035 *E. faecalis oprA*, (7) 1464 *E. faecalis oprA*, (8) 1642 *E. faecalis oprA*, (9) 1923 *E. faecalis oprA*, (10) 136 *E. faecalis oprA*, (11) 261 *E. faecalis oprA*, (12) 324 *E. faecalis oprA*, (13) 354 *E. faecalis sin presencia de gen*, (14) 392 *E. faecalis oprA*, (15) 476 *E. faecalis sin presencia de gen*, (16) 588 *E. faecalis oprA*, (17) 737 *E. faecalis oprA*, (18) 995 *E. faecalis oprA*, (19) 1043 *E. faecalis oprA*, (20) 1168 *E. faecalis oprA*, (21) *E. faecalis oprA*, (22) 1287 *E. faecalis oprA*.



**Figura 15.** Resultados PCR multiplex *cfr*, *oprA* y *poxtA*. Carriles: (1) Ladder 1kb, (2) 1364 *E. faecalis oprA*. (3) 1366 *E. faecalis oprA*, (4) 1495 *E. faecalis oprA*, (5) 1598 *E. faecalis oprA*, (6) 1809 *E. faecalis oprA*, (7) 1923 *E. faecalis oprA*, (8) 2119 *E. faecalis oprA*, (9) 2120 *E. faecalis oprA*, (10) 2121 *E. faecalis oprA*, (11) 2122 *E. faecalis oprA*, (12) 2123 *E. faecalis oprA*, (13) 332 *E. faecalis sin presencia de gen*, (14) 1266 *E. faecalis oprA*, (15) 1782 *E. faecalis sin presencia de gen*, (16) 1129 *E. faecalis oprA*, (17) 595 *E. faecalis oprA*, (18) 596 *E. faecalis oprA*, (19) 1050 *E. faecalis oprA*, (20) 1053 *E. faecalis oprA*, (21) 1087 *E. faecalis oprA*, (22) 2218 *E. faecalis oprA*, (23) 2255 *E. faecalis oprA*, (24) 1567 *E. faecium sin presencia de gen*.

**Anexo 7.** Protocolo empleado en la PCR multiplex de los genes *cfr*, *optrA* y *poxA*

**Tabla 19.** Protocolo de la PCR multiplex empleada en la detección de los genes *cfr*, *optrA* y *poxA*

N°	ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN
1	Extracción de ADN	Suspender una asada del cultivo bacteriano de 24h en 500 $\mu$ L de solución TE1X estéril.
2		Calentar la suspensión por 10 minutos a 95°C en el Thermomixer Eppendorf®
3		Centrifugar por 5 minutos a 13000 rpm
4		Pipetear el sobrenadante y transferir a un tubo eppendorf de 1.5 mL.
5		Almacenar el ADN en un congelador a -20C°
6	Programación de	Preparar la Master Mix de acuerdo a la tabla 5.
7	PCR multiplex	Programar el termociclador siguiendo las indicaciones durante los periodos descritos en la tabla 4.
8	Electroforesis	Después de los ciclos empleados en la PCR realizar la corrida electroforética del producto de la PCR multiplex (5 $\mu$ L) en un gel de agarosa al 2% (100 mL de TAE 1X + 2g de agarosa + 2 $\mu$ L de intercalante de ADN) durante 70 minutos a 70V.
9	Revelación	Revelar los productos de la electroforesis en el fotodocumentador BioRad C1000®.