

Silenciamiento de la resistencia a los glicopéptidos en *Enterococcus faecalis* BM4405 por la novobiocina

Abadía Patiño, Lorena¹;
Chippaux, Marc²;
Courvalin, Patricé;
Périchon, Bruno³

¹IIBCA Universidad de
Oriente, Venezuela;
²Laboratoire de Chimie
Bactérienne, CNRS,
13402, Marseille Cedex
20, France;
³Unité des Agents
Antibactériens, Institut
Pasteur, 75724 Paris,
Cedex 15, France

OBJETIVO: Determinar la causa de la pérdida de la resistencia VanE en la cepa *Enterococcus faecalis* BM4405-1. **MATERIALES Y MÉTODOS:** la cura plasmídica se realizó con la novobiocina. Las CMI fueron realizadas por el método de Steers. La construcción del plásmido con los tres genes de resistencia se obtuvo por doble digestión del operón vanE con las enzimas SacI y XbaI, así como el plásmido para re-establecer la resistencia Van en BM4405-1. La extracción y análisis de los precursores del peptidoglicano y las actividades serina racemasa y D,D-peptidasa fueron realizadas por la metodología descrita. El estudio de la expresión del operón se logró mediante la hibridación del Northern y la extensión del iniciador. **RESULTADOS:** *E. faecalis* BM4405-1, es un derivado susceptible de la cepa *E. faecalis* BM4405 VanE, resistente a la vancomicina, fue obtenida después de hacerla crecer en presencia de novobiocina, un inhibidor de la subunidad GyrB de la ADN girasa. En contraste con BM4405, el pentapéptido -[D-Ala] fue el único precursor de peptidoglicano hallado en BM4405-1 y ninguna actividad VanXYE D,D-peptidasa ni serina racemasa VanT pudo ser detectada en esa cepa, aún después de inducir los cultivos con concentraciones subinhibitorias de vancomicina. Secuencia del operón vanE de BM4405-1 reveló dos mutaciones permitiendo sustituciones en VanE (D200N) y en el último amino ácido de VanRE (Y225F). La clonación de los genes vanE, vanXYE, y vanTE de BM4405-1 en una cepa susceptible *E. faecalis* JH2-2 confirmó resistencia a vancomicina indicando que la mutación en vanE no es responsable de la susceptibilidad. El análisis transcripcional del operón vanE por PCR transcripción reversa (RT-PCR) cuantitativa indicó que la novobiocina no afectó el nivel de expresión del operón vanE. La secuencia del gen gyrB de BM4405-1 reveló una mutación responsable por la sustitución de un residuo (K337Y) necesario para la actividad ATPasa y esto implicó un superenrollamiento del DNA. La clonación del gen gyrB de BM4405 restauró la resistencia a vancomicina a BM4405-1. **CONCLUSIÓN:** El tratamiento de la cepa BM4405 con la novobiocina es indirectamente responsable de la pérdida de la resistencia VanE. La mutación del residuo crítico (K337Y) en GyrB está involucrado en la hidrólisis del ATP lo cual afecta la expresión del operón vanE. Estos resultados sugieren que la alteración en el superenrollamiento del DNA debido a la mutación en GyrB fue responsable de la falta de expresión del operón vanE y por lo tanto de la susceptibilidad de BM4405-1 a la vancomicina.