



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PATRÍCIA DOMINGUES PIRES BOUÇAS

**ESTUDO DA ATIVIDADE GELATINOLÍTICA EM AMOSTRAS
CLÍNICAS DE *Enterococcus faecalis***

Londrina
2004

PATRÍCIA DOMINGUES PIRES BOUÇAS

**ESTUDO DA ATIVIDADE GELATINOLÍTICA EM AMOSTRAS
CLÍNICAS DE *Enterococcus faecalis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Sérgio Suzart dos Santos

Londrina
2004

"Na vida, há momentos de luz e de sombra: às vezes, tudo parece claro; outras vezes, não se vê bem quase nada.

Nossa fé passa também por períodos contrastantes que até se alternam num ciclo de presença e de ausência. Trata-se de uma pedagogia da vida, do próprio mistério de Deus que se dá a conhecer, mas nos indica que ele se ausenta sem deixar de estar presente.

Esse aparente paradoxo traz consigo uma possibilidade de nos fazer crescer na fé. Nossa fé deve corresponder a um crescimento contínuo em busca das exigências mais íntimas do nosso ser. Para quem crê, não é difícil descobrir a misteriosa mas real presença de Cristo entre nós com todo seu mistério revelado na sua vida visível.

Nossa alegria consiste em saber que não estamos sós e que nossa tristeza prometeu que "os que choram serão consolados."

(Oração de fé)

Ao meu esposo Joni, que desde que nos conhecemos representou a fortaleza mais segura e mais amorosa que eu pude encontrar. Muito obrigado pelo amor, respeito, compreensão e apoio que você doa constantemente a minha vida.

Aos meus pais por todo o amor, carinho, verdade e dedicação durante toda a minha existência.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Sérgio Suzart dos Santos pela dedicação, orientação, ética e apoio científico em todo o meu processo de iniciação científica, e principalmente na conquista do meu título de Mestre em Microbiologia.

A Prof^a Ms. Florister Elaine Cararra pelo isolamento, identificação e fornecimento das amostras microbianas utilizadas neste trabalho.

Ao Prof.Dr. Aloísio José Antunes e as Prof.^{as} Dra. Halha Ostrensky Saridaskis, Dra. Maria Angélica Watanabe e Dra. Sueli F. Ogatta pela disposição e colaboração para a avaliação da defesa de meu Mestrado. Aos Sr. e as Sras. meu muito obrigado.

As Prof^a Ms. Luciana Furlaneto, Prof^a Dr^a. Márcia C. Furlaneto, pela colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Nosawa e a Prof^a. Dr^a. Rosa Elisa Linhares, pela colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho.

As funcionárias Claci Sandra Stempinhaki, Iara Branco Ferreira, Marta S. A. Salvador, Valdelice dos Santos e Vânia Darc Castro, pelo apoio técnico e amizade construída durante toda a minha iniciação científica e o desenvolvimento do meu mestrado.

A Erika Izumi e Elisa B. de Marques, pela amizade, disponibilidade e apoio técnico no desenrolar deste trabalho. A vocês meu muito obrigado.

Ao meu amigo Rubens Tadeu Duarte pela disponibilidade e apoio técnico no desenvolvimento deste trabalho.

A Luis Fabrício, agente administrativo do Departamento de Matemática Aplicada e Estatística, da Universidade Estadual de Londrina, pela atenção e apoio na análise dos dados deste trabalho.

Aos meus irmãos Ana Paula Pires Oliveira e Rafael Domingues Pires, pelo amor, compreensão, apoio e dedicação a minha vida. Amo vocês e muito obrigado.

As minhas sobrinhas Juliane Thaíse Pires e Camila Bouças Godinho e ao meu sobrinho Pedro Bouças Godinho, por demonstrar a essência da vida pela suas existências.

Aos meus cunhados Ricardo Batista de Oliveira e Jader Luís Godinho, e a minha cunhada Jonice P. Bouças Godinho, pelo incentivo para minha formação profissional.

A Sra. Helenice B. Pereira Bouças e Sr. Elpídio Ferraz, por todo o incentivo e apoio emocional para o desempenho deste trabalho.

A todo o corpo docente do programa de Mestrado em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, que durante estes anos incentivaram a formação acadêmica, principalmente por minha conquista do título de mestre em Microbiologia.

*Tu, que habitas sob a proteção do
Altíssimo, que moras à sombra do
Onipotente, dize ao Senhor: "Sois
meu refugio e minha cidadela, meu
Deus, em que eu confio."
(Salmo 90)*

PIRES BOUÇAS, Patrícia Domingues. Estudo da Atividade Gelatinolítica em Amostras Clínicas de *Enterococcus faecalis*. 2004. Dissertação de Mestrado em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Paraná.

RESUMO

Gelatinase é um possível fator de virulência em *Enterococcus* sp., que são patógenos oportunistas causadores de várias infecções em humanos. A produção de gelatinase foi estudada em 95 amostras clínicas de *E. faecalis* isoladas de diversas origens. Parâmetros ambientais incluindo meio de cultura, temperatura, pH, cátions divalentes, e vários carboidratos foram testados para averiguar se os mesmos influenciam a produção de gelatinase. A atividade enzimática foi averiguada pela degradação da gelatina pelas células bacterianas impregnadas em discos de papel de filtro, e a atividade foi determinada pela presença de um halo opaco ao redor do disco. A produção de gelatinase foi sensível ao aumento da temperatura a partir de 50°C, mostrando a associação com o tempo de tratamento. Houve maior frequência de amostras produtoras de gelatinase em agar contendo extrato de carne e peptona suplementado com gelatina. A atividade gelatinolítica foi otimizada em meio de cultura ajustado em pH 8,0. A produção de gelatinase não foi influenciada pelo Mg^{2+} , mas foi reduzida na presença de Ca^{2+} e Zn^{2+} e inibida totalmente pelos cátions Fe^{2+} e Cu^{2+} . A atividade gelatinolítica variou grandemente quando ao cultivo celular foram adicionados carboidratos como fonte de carbono, aumentando a atividade na presença de arabinose, xilose, glicose, maltose e manose, enquanto outros não influenciaram ou diminuíram a atividade da enzima. Os resultados mostraram que a produção de gelatinase é fortemente influenciada por diferentes fatores ambientais. Estudos futuros serão necessários para determinar os mecanismos que controlam a produção deste possível fator de virulência em *Enterococcus* sp..

Palavras chaves: *Enterococcus faecalis*. Produção de gelatinase. Fatores físico-químicos.

PIRES BOUÇAS, Patrícia Domingues. Study of the Gelatinolytic activity in *Enterococcus faecalis* Clinical Strains. 2004. Dissertation of the Teacher in Microbiology, University State of the Londrina, Paraná.

ABSTRACT

Gelatinase is a potential virulence factor in Enterococci which are opportunistic pathogens that cause various types of infections in humans. The production of gelatinase was studied in 95 *Enterococcus faecalis* strains isolated from different types of clinical sources. Various environmental parameters including culture medium, temperature, pH, divalent cations, and carbon sources were examined for their effect on production of gelatinase. Enzyme activity was determined based on gelatin degradation in agar plates by filter-paper disks impregnated with bacterial cells, as evidenced by the formation of an opaque halo. Gelatinase production was sensitive to heat at a temperature greater than 50 °C, showing to associate with time of heat treatment. A greater number of enterococcal strains produced gelatinase when grown in medium containing beef extract and peptone as nutrient agar. Gelatinase activity was detected over wide pH range with an optimum at pH 8. Ca^{2+} and Zn^{2+} caused a reduction in gelatinase production while other common divalent cations (Fe^{2+} and Cu^{2+}) inhibited it or had no effect (Mg^{2+}). Gelatinolytic activity varied greatly when bacterial cells were supplemented with different carbohydrates as the carbon source, increasing with arabinose, xylose, glucose, maltose and mannose, while unchanged or decreasing with various other sugars. The results show that gelatinase production is strongly influenced by different environmental factors. Further studies are warranted to determine the mechanisms controlling the production of this potential virulence factor in Enterococci.

Keywords: *Enterococcus faecalis*. Gelatinase production. Physico-chemical factors.

SUMÁRIO

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
REFERÊNCIAS	20
OBJETIVOS	24
Objetivo Geral	24
Objetivos Específicos	24
TRABALHO CIENTÍFICO (Carta ao Editor)	25
TRABALHO CIENTÍFICO (Trabalho completo)	26
CONCLUSÕES	41
ANEXOS	43
Tab. 1. Table 1. Effect of different culture media on gelatinase production in <i>E. faecalis</i> strains isolated from clinical sources	44
Fig 1. Assay of gelatinolytic activity on plate with BG agar medium supplemented with with 1 % gelatin. Clearing zones formed around each sterile filter-paper disc (3 mm in diameter) impregnated with <i>E. faecalis</i> strains. The plate was incubated at 37°C for 24 h	45
Fig 2. Effect of different heat treatment on gelatinolytic activity produced by <i>E. faecalis</i> strains. Values are averages of two independent experiments that were performed in triplicate. The enzymatic activity was measured on BG agar (pH 7.0) at 37 °C. The control experiments were done in the absence of treatment by heat. The asterisk represents statistically significant differences (P < 0.05).....	46

Fig 3. Effect of the medium pH on gelatinolytic activity produced by *E. faecalis* strains. Values are averages of two independent experiments that were performed in triplicate. The enzymatic activity on BG agar at pH 7.0 was considered as 100 %. The asterisk represents statistically significant differences ($P < 0.05$).....47

Fig 4. Effect of divalent cations on gelatinolytic activity produced by *E. faecalis* strains. Values are averages of two independent experiments that were performed in triplicate. The enzymatic activity was measured on BG agar (pH 7.0) at 37 °C. The control experiments were done in the absence of divalent ions. The asterisk represents statistically significant differences ($P < 0.05$)48

Fig. 5. Effect of carbon sources on gelatinolytic activity produced by *E. faecalis* strains. Values are averages of two independent experiments that were performed in triplicate. The enzymatic activity was measured on BG agar (pH 7.0) at 37 °C. The control experiments were done in the absence of carbohydrates. The asterisk represents statistically significant differences ($P < 0.05$)49

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O gênero *Enterococcus* sp. é composto por um grupo de bactérias que se apresentam em pares ou em pequenas cadeias de cocos Gram positivos, são catalase negativos, não esporulados e anaeróbios facultativos. As espécies pertencentes a este gênero bacteriano apresentam a habilidade de desenvolver-se em presença de 6,5% de cloreto de sódio (NaCl) e em pH 9,6, são capazes de hidrolisar esculina na presença de sais biliares a 40% e produzem pirrolidonil arilamidase (PYR). A temperatura ideal para o crescimento destes microrganismos varia de 10°C a 45°C, mas podem resistir a 60°C por aproximadamente 30 minutos (MANERO; BLANCH, 1999; MORRISON et al., 1997). Além dessas características bioquímicas, as espécies de enterococos são homofermentativos sendo capazes de fermentar uma variedade de carboidratos incluindo sacarose, L-arabinose, sorbose, dentre outros (FRANZ et al., 2003). Através da análise comparativa das seqüências do rRNA 16S, este gênero é dividido atualmente em oito grupos compreendendo um total de vinte e sete espécies, dentre as quais destacam-se *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. mundi*, *E. avium*, *E. raffinosus*, dentre outros (FRANZ et al., 2003; MANERO; BLANCH, 1999).

Estes microrganismos são habitantes normais do trato gastrointestinal de humanos e animais, mas podem ser encontrados colonizando outros nichos como água, solo e alimentos (GIRRAFA, 2002; JOHNSON, 1994). No trato gastrointestinal de seres humanos, cepas de *Enterococcus* sp. estão distribuídas predominantemente no intestino grosso, mas podem ser encontradas

em menor proporção na vagina, uretra superior, pele, orofaringe e bile de indivíduos saudáveis (CHENOWETH; SCHARBERG, 1990).

Algumas espécies de enterococos podem causar uma diversidade de infecções humanas, sendo *E. faecalis* a espécie mais freqüente, ocorrendo em cerca de 80% entre os isolados nas infecções nosocomiais, seguida da espécie *E. faecium* que geralmente é isolada em 10% dos casos (FRANZ et al., 2003; GOLD et al., 2001). Estas infecções geralmente estão relacionadas a pacientes hospitalizadas e/ou imunodeprimidos (ELSNER et al., 2000) que se encontram por determinado tempo expostos a diversos medicamentos, principalmente a antimicrobianos de última geração (FRANZ et al., 2003; CETINKAYA et al., 2000). Nas duas últimas décadas o número de infecções nosocomiais causadas por *Enterococcus* sp. em pacientes hospitalizados tem aumentado substancialmente, passando de terceira (10%) para segunda (12%) causa de doenças nosocomiais nos Estados Unidos (*apud* FRANZ et al., 2003), dados que coincidem com o aumento no uso de cefalosporinas, particularmente cefalosporinas de terceira geração no ambiente hospitalar (*apud* FRANZ et al., 2003; MORRISON et al., 1997).

Dentre as principais infecções causadas por *E. faecalis* pode-se citar infecções do trato urinário (FRAIMOW et al., 1994, WONG et al., 2000), bacteremia (VERGIS et al., 2002, PESET et al., 2000), septicemia (ELSNER et al., 1997; BERGER et al., 1998), endocardite (JOHNSON, 1994; RYBAK; COYLE, 1999), ferida (HEGGERS et al., 1998; GIACOMETTI et al., 2000), entre outras (SHERPARD; GILMORE, 2002; MORRISON et al., 1997).

Um dos fatores que possivelmente possam contribuir para a patogenicidade de *E. faecalis* é o crescimento de isolados clínicos resistentes a

diversas classes de antimicrobianos. A resistência intrínseca a antimicrobianos como cefalosporinas, sulfonamidas, lincosaminas, penicilinas e carbapenams é uma característica do gênero (GIRRAFA, 2002; GOLD, 2001), além disso muitas espécies de enterococos podem adquirir resistência a tetraciclina, macrolídeos, glicopeptídeos e aminoglicosídeos através da aquisição de plasmídios e transposons (GOLD, 2001, SHERPARD; GILMORE, 2002).

A partir da década de 80 o aparecimento de *E. faecalis* resistentes a vancomicina, isolados de diversos sítios infectados tem reduzido consideravelmente as alternativas terapêuticas no tratamento das infecções por este microrganismo. A resistência a glicopeptídeos é uma característica heterogênea podendo a amostra clínica apresentar um ou cinco dos genes que codificam esta resistência, sendo estes *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD* ou *vanE* (LUKÁSOVÁ; SUSTÁCKOVÁ, 2003). Schouten et al. (2000) estudando diversas amostras clínicas de *Enterococcus* sp. isolados de vários países da Europa verificaram que 11% de *E. faecalis* apresentaram o gene *vanA*, e a característica fenotípica das amostras que apresentam este gene é o alto nível de resistência a vancomicina (MIC entre 64 µg/mL a 1.000 µg/mL) e a teicoplanina (MIC entre 16 µg/mL a 512 µg/mL) (apud CETINKAYA et al., 2000). No trabalho, desenvolvido por Coque et al. (2002), foi verificado que 6,2% de amostras de *E. faecalis* isoladas de diversas origens (sangue, fezes de indivíduos saudáveis, fluidos e trato respiratório) apresentaram resistência a vancomicina.

Outros fatores que poderiam contribuir para a patogenicidade de *E. faecalis* são os fatores de virulência, tais como citolisina/hemolisina (SEMEDO et al., 2003, VERGIS et al., 2002;), substância de agregação (CRETI et al., 2004), cápsula,

bacteriocina (FRANZ et al., 2002), produção de superóxido dismutase, gelatinase (ELSNER et al., 2000, CRETI et al., 2004, VERGIS et al., 2002), proteínas de superfície como Ace, EfaA e Esp (TOLEDO-ARANA et al., 2001; VERGIS et al., 2002).

A substância de agregação (AS), é uma proteína de superfície codificada pelo gene *asa1* localizado no plasmídio pAD1 que parece estar envolvida no processo conjugativo entre espécies de enterococos, pois este determinante é capaz de mediar a ligação da célula doadora com a célula potencialmente receptora promovendo a agregação celular e a transferência de plasmídios entre as células (DUNNY et al., 1995; *apud* SEMEDO et al., 2003). Alguns trabalhos têm demonstrado a incidência de AS em amostras clínicas de *E. faecalis* (CRETI et al., 2004; SEMEDO et al., 2003; ELSNER et al., 2000; COQUE et al., 1995), indicando esta proteína como fator de virulência importante na adesão da bactéria com a superfície da célula hospedeira, como as células dos túbulos renais e macrófagos humanos (KREFT et al. 1992; SÜßMUTH et al., 2000). SARTINGEN et al. (2000) demonstrou que AS também está associada à internalização de *E. faecalis* por enterócitos derivados do cólon e do duodeno.

Possivelmente as presenças dos domínios RGD (seqüências Arg-Gly-Asp-Ser e Arg-Gly-Asp-Val) em AS contribuem para o processo de aderência à fibrina, a fibronectina e moléculas da família das integrinas (SARTINGEN et al., 2000; HUYCKE; GILMORE et al., 1995). Na aderência aos macrófagos ou a leucócitos polimorfonucleares este domínio interage com a integrina CR3 facilitando a translocação e evasão do sistema imune sem indução da explosão respiratória

impossibilitando a morte da bactéria por oxigênio reativo (SÜßMUTH et al., 2000; VANEK et al., 1999).

Citolisina é outro determinante de virulência associado a *E. faecalis* e o gene que codifica para esta proteína pode estar localizado no plasmídeo pAD1 ou no DNA cromossomal da bactéria. A enzima é codificada por um operon que contém 5 genes, dos quais os genes *cyiL_L*, *cyiL_S*, *cyiM* e *cyiB*, são necessários para a expressão do precursor do fator lítico (ou componente L), entretanto, *cyiA* codifica uma serina protease necessária para a expressão do fator de ativação (ou componente A) (HAAS et al., 2002; HUYCKE & GILMORE et al., 1995). Citolisina é denominada de toxina, pois apresenta atividade bactericida contra várias espécies de bactérias Gram positivas e também apresenta a capacidade de lisar macrófago, neutrófilos polimorfonucleares e eritrócitos (HAAS et al., 2002; SEMEDO et al., 2003).

A hemolisina é outro determinante de virulência em *E. faecalis* codificado pelo plasmídeo pAD1, capaz de lisar eritrócitos de vários modelos animais, incluindo de humano, cavalo, coelho (*apud* COQUE et al., 1995). Alguns estudos apontam a contribuição da hemolisina na patogenicidade de *E. faecalis* em modelos animais, mas em infecções humanas a atividade desta enzima é bastante controversa (*apud* HUYCKE; GILMORE, 1995; ELSNER et al., 2000). Coque et al. (1995) verificaram uma frequência de 37% de atividade hemolítica em *E. faecalis* isolados de pacientes hospitalizados e de 16% dos isolados de pacientes com endocardite. Elsner et al. (2000) estudando a atividade hemolítica em 117 amostras de *E. faecalis* isoladas de sangue de pacientes, na Alemanha, observaram que somente 16% apresentaram capacidade de lisar eritrócitos. Outros trabalhos

também comprovaram a atividade hemolítica em cepas de *E. faecalis* isoladas de pacientes transplantados, com bacteremia, ou ainda de fezes de indivíduos sadios (WAAR et al., 2002; VERGIS et al., 2002; MUNDY; GILMORE, 2000).

Além dos determinantes de virulência descritos acima, a gelatinase tem sido constantemente relatada para amostras de *E. faecalis* isoladas de pacientes hospitalizados, pacientes com quadro de endocardite, bacteremia e fezes, dentre outros (SEMEDO et.al., 2003; KANEMITSU et al., 2001; COQUE et.al., 1995). Esta enzima apresenta homologia com proteases neutras encontradas no gênero *Bacillus* sp. e elastase isolada de *Pseudomonas aeruginosa* (NAKAYAMA et al., 2001; SU et al., 1991).

Segundo o Committee of International Union of Biochemistry and Molecular Biology as proteases são basicamente classificadas com base em três critérios: 1. Tipo de reação catalisada, 2. Natureza química do sítio catalítico, e 3. Relações evolucionárias com referência a estrutura. As endopeptidases se enquadram dentro do primeiro critério citado, sendo caracterizadas por sua ação preferencial em ligações peptídicas localizadas no interior da cadeia polipeptídica, ou seja fora dos domínios N- e C- terminal. Essas enzimas ainda são subdivididas em quatro subgrupos baseados no seu sítio catalítico - serina-, aspartico-, cisteína- e metaloproteases. As proteases têm por característica clivar ligações peptídicas catalisando a hidrólise total de proteínas. Essas enzimas têm alta especificidade e modificam seletivamente as proteínas executando grande variedade de funções, tanto a nível celular quanto para o órgão ou o organismo propriamente dito, agindo, por exemplo, na homeostase em processos inflamatórios. (vide RAO et.al., 1998).

Gelatinase é uma protease de aproximadamente 31,5 Kda, é extremamente hidrofóbica, com ponto isoelétrico ao redor de 4,6, e o pH ótimo de sua atividade está entre 6 – 8 (*apud* KANEMITSU et.al., 2001), é classificada dentro do grupo das endopeptidases, sendo uma metaloprotease que se caracteriza por apresentar seqüência de aminoácidos rica em resíduos de histidina (HHXXH) a qual serve de sítio de ligação para o íon zinco (*vide* RAO et al., 1998). Esta protease é capaz de hidrolisar diversos peptídeos bioativos como colágeno, caseína, gelatina, hemoglobina, insulina e outros peptídeos bioativos particularmente feromônios sexuais são alvos deste tipo de atividade enzimática (KANEMITSU et.al., 2001; SANNOMIYA et.al., 1990; COQUE et.al., 1995).

A gelatinase em amostras clínicas de *E. faecalis* tem sido associada principalmente a processos inflamatórios e alguns trabalhos revelam que ela pode aumentar a virulência em infecções sistêmicas humanas e em infecções utilizando modelo animais (NAKAYAMA et.al., 2002; PILAI et.al., 2002; COQUE et.al., 1995).

O gene responsável pela expressão da enzima gelatinase, *gelE*, foi mapeado e caracterizado a partir de um fragmento de DNA de 6 Kb originado do plasmídeo pAM1500. A análise da seqüência de nucleotídeos revelou a presença de um quadro de leitura aberto de 1527 nucleotídeos que codifica para uma proteína de aproximadamente 509 aminoácidos, que apresenta homologia para aureolisina de *Staphylococcus aureus* e elastase de *Pseudomonas aeruginosa* (*apud* SIFRI et.al., 2002).

Alguns autores demonstraram que a expressão de *gelE* é regulado por um sistema regulatório dependente da densidade celular que controla uma variedade de grupo comportamental da bactéria. Este sistema, denominado “quorum

sensing” geralmente é desencadeado a partir de pequenos peptídeos sinais denominados feromônios que medeiam a comunicação célula-célula. Estes sinalizadores são secretados e se acumulam fora da célula, e quando os níveis desses sinalizadores atingem concentrações adequadas um sensor intracelular responde desencadeando a expressão de certos genes, entre eles os genes de virulência (NAKAYAMA et.al. 2001; QIN et.al., 2000).

Em *E. faecalis* os produtos dos genes *fsrA*, *fsrB* e *fsrC* possivelmente regulam positivamente a expressão de gelatinase e uma serina protease (*sprE*), os quais se encontram imediatamente após o bloco gênico *fsr*. O locus *fsr* apresenta homologia com os genes *agrA*, *agrB* e *agrC* (*agr*, ‘accessory gene regulator’) de *Staphylococcus aureus* que são responsáveis pelo sistema de quorum sensing nesta bactéria regulando a expressão de genes de virulência (*apud* QIN et.al., 2000).

Ensaio realizados por NAKAYAMA et.al. (2001) revelaram que a biosíntese da gelatinase ocorre no final da fase log e começo da fase estacionária do crescimento, e que sua ativação deve-se a um “feromônio ativador da biosíntese da gelatinase” (GBAP – primeiro feromônio peptídico que apresenta um anel de lactona), sendo que mesmo em baixa concentração fora da célula, GBAP é suficiente para ativar a produção da enzima. A análise da seqüência de aminoácidos do bloco gênico *fsr* revela que GBAP está incluso na porção C-terminal de *fsrB*, sugerindo que a proteína FsrB seja traduzida como um precursor de GBAP capaz de sinalizar para a tradução dos outros dois componentes do sistema regulatório, as proteínas FsrC e FsrA. A proteína FsrC codifica para uma histidina quinase que, ao se ligar com GBAP, induz a expressão tanto de gelatinase quanto de serina

protease. A proteína FsrA é um regulador de resposta capaz de diminuir a expressão de GBAP.

De acordo com as características químicas e/ou bioquímicas inerentes às proteases sabemos que a atividade ótima da enzima depende de vários fatores físico-químicos, tais como temperatura, pH, concentrações adequadas de sais, íons e carboidratos, entre outros. Até o presente momento, somente o trabalho de Gardini et.al. (2001) descreve o efeito de pH, temperatura e concentração de NaCl na cinética de crescimento, atividade proteolítica e na produção biogênica de amino em *E. faecalis* EF37 (*vide* trabalho), no qual os autores verificam que o pH apresentou ser uma variável importante no crescimento celular quando associado a outras variáveis tais como temperatura e concentração de NaCl, enquanto que a atividade proteolítica foi influenciada por todos os parâmetros analisados.

É importante ressaltar que, embora seja bem conhecido que o processo de patogenicidade microbiana é essencialmente multifatorial, na grande maioria das espécies bacterianas, é ainda incipiente predizer que determinantes de virulência poderiam contribuir direta ou indiretamente na patogênese das infecções bacterianas envolvendo espécies de *Enterococcus* sp., particularmente *E. faecalis*. A ausência de estudos no Brasil sobre a ocorrência de determinantes de virulência (toxinas, adesinas, invasinas, etc.) entre amostras clínicas de *E. faecalis* oriundas de ambiente hospitalar e/ou pacientes imunodeprimidos, aponta para a necessidade de estudos a cerca da ocorrência destes determinantes em amostras clínicas envolvidas em infecções nosocomiais.

A produção de gelatinase em amostras de *E. faecalis* provoca indagações a respeito da distribuição desta metaloprotease extracelular entre

diferentes isolados clínicos, uma vez que esta enzima tem sido apontada como um dos principais determinantes de virulência associadas à peritonite e/ou endocardite induzida por cateter . Além disso, na literatura há relatos somente de detecção fenotípica e genotípica de amostras de *E. faecalis* gelatinolítica, não sendo descrito os possíveis fatores físico-químicos que possam estar influenciando negativa ou positivamente na atividade da gelatinase.

Por fim, este trabalho foi idealizado com o propósito de identificar a produção de gelatinase entre 95 amostras de *E. faecalis* isoladas de pacientes do Hospital Universitário Norte do Paraná (HURNP-Londrina) (originados de urina, exsudatos purulentos e swab retal) e verificar quais os possíveis fatores físico-químicos que possam influenciar na atividade enzimática dessas.

REFERÊNCIAS

BERGER, A. et al. Septicaemia in an Austrian Neonatal Intensive Care Unit: a 7-year Analysis. **Enferm. Infecç. Microbiol. Clin.**, v. 87, p. 1066-1069, 1998.

CETINKAYA, Y; FALK, P; MAYHALL, G. Vancomycin-Resistant Enterococci. **Clin. Microbiol. Rev.**, vol. 13, nº 4, p. 686-707, 2000.

COQUE, T. M. et al. Incidence of Hemolysin, Gelatinase, and Aggregation Substance among Enterococci Isolated from Patients with Endocarditis and other Infections and Feces of Hospitalized and Community-Based Persons. **J. Infect. Dis.**, v. 171, p. 1223-1229, 1995.

CHENOWETH, C.; SCHABERG, D. The Epidemiology of Enterococci. **Eur. J. Clin. Dis.**, v. 9, p. 80-89, 1990.

CRETI, R. et al. Survey for Virulence Determinants among *Enterococcus faecalis* Isolated from different sources. **J. Med. Microbiol.**, v. 53, p. 13-20, 2004.

DUNNY, G. M.; LEONARD, B. A. B.; HEDBERG, P. J. Pheromone-Inducible Conjugation in *Enterococcus faecalis*: Interbacterial and Host-Parasite Chemical Communication. **J. Bact.**, v. 177, p. 871-876, 1995.

DUPRÈ, I. et al. A. Incidence of Virulence Determinants in Clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Isolates Collected in Sardinia (Italy). **J. Med. Microbiol.**, v. 52, p. 491-498, 2003.

ELSNER, H. A. et al. Virulence Factors of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Blood Culture Isolates. **Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 19, p. 39-42, 2000.

FRAIMOW, H. S.; JUNGKIND, D. L.; LANDER, D. W.; DELSO, D. R.; DEAN, J. L. Urinary Tract Infections with an *Enterococcus faecalis* Isolated that Requires Vancomycin for Growth. **Ann. Intern. Med.**, v. 121, p. 22-26, 1994.

FRANZ, C. M. A. P. et al. Biochemical and Genetic Characterization of the Two-Peptide Bacteriocin Enterocin 1071 Produced by *Enterococcus faecalis* FAIR-E 309. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p. 2550-2554, 2002.

FRANZ, C. M. A. P. et al. Enterococci in Foods – a Conundrum for Food Safety. **Intern. J. of Food Microbiol.**, 2003.

GARDINI, F. et al. Effects of pH, Temperature and NaCl Concentration on the Growth Kinetics, Proteolytic Activity and Biogenic Amine Production of *Enterococcus faecalis*. **Intern. J. of Food Microbiol.**, v. 64, p. 105-117, 2001.

GIACOMETTI, A. et al. Epidemiology and Microbiology of Surgical Wound Infections. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 918-922, 2000.

GIRAFFA, G. Enterococci from Food. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 26, p. 163-171, 2002.

GOLD, H. S. Vancomycin-Resistant Enterococci: Mechanisms and Clinical Observations. **Clin. Infect. Dis.**, v. 33, p. 210-219, 2001.

GUZMAN, C. A. et al. Role of Adherence in Pathogenesis of *Enterococcus faecalis* Urinary Tract Infection and Endocarditis. **Infect. Immun.**, v. 57, p. 1834-1838, 1989.

GUZMAN, C. A. et al. Serum Dependent Expression of *Enterococcus faecalis* Adhesins Involved in the Colonization of heart cells. **Microb. Pathog.**, v. 11, p. 399-409, 1991.

HAAS, W.; SHEPARD, B. D.; GILMORE, M. S. Two-Component Regulator of *Enterococcus faecalis* Cytolysin Responds to Quorum-Sensing Autoinduction. **Nature**, v. 415, p. 84-87, 2002.

HEGGERS, J. P. et al. Alternate Antimicrobial Therapy for Vancomycin-Resistant Enterococci Burn Wound Infections. **J. Burn. Care Rehabil.**, v. 19, p. 339-403, 1998.

HUYCKE, M. M.; GILMORE, M. S. Frequency of Aggregation Substance and Cytolysin Genes among Enterococcal Endocarditis Isolates. **Plasmid**, v. 34, p. 152-156, 1995.

HUYCKE, M. M.; SAHM, D. F.; GILMORE, M. S. Multiple-Drug Resistant Enterococci: The Nature of The Problem and an Agenda for the Future. **Emerging Infect. Dis.**, v. 4, n. 2, 1998.

JETT, B. D.; HUYCKE, M. M.; GILMORE, M. S. Virulence of Enterococci. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 7, p. 462-478, 1994.

JOHNSON, A. P. The Pathogenicity of Enterococci. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 33, p. 1083-1089, 1994.

KANEMITSU, K. et al. Quantitative Determination of Gelatinase Activity among Enterococci. **J. Microbiol. Meth.**, v. 47, p. 11-16, 2001.

KREFT, B. Et al. Aggregation Substance of *Enterococcus faecalis* Mediates Adhesion to Cultured Renal Tubular Cells. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 25-30, 1992.

LUKÁSOVÀ, J.; SUSTÀCKOVÁ, A. Review Article: Enterococci and Antibiotic Resistance. **Acta Vet. Brno.**, v. 72, p. 315-323, 2003.

MANERO, A.; BLANCH, A. R. Identification of *Enterococcus* spp. With a Biochemical Key. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, n.10, p. 4425-4430, 1999.

MORRISON, D.; WOODFORD, N.; COOKSON, B. Enterococci as Emerging Pathogens of Humans. **J. Appl. Microbiol. Symp. Suppl.**, v. 83, p. 89S-99S 1997.

MUNDY, L. M.; GILMORE, M. Relationships between Enterococcal Virulence and Antimicrobial Resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 13, n. 4, p. 513-522, 2000.

MURRAY, B. E. Diversity among Multidrug-Resistant Enterococci. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 4, p. 37-47, 1998.

NAKAYAMA, J. et al. Gelatinase Biosynthesis-Activating Pheromone: a Peptide Lactone that Mediates a Quorum Sensing in *Enterococcus faecalis*. **Mol. Microbiol.**, v. 41, p. 145-154, 2001.

NAKAYAMA, J.; KARIYAMA, R., KUMON, H. Description of a 23,9-kilobase Chromosomal Deletion Containing a Region Encoding which Mainly Determines the Gelatinase-Negative Phenotype of Clinical Isolates of *Enterococcus faecalis* in Urine. **Appl. Environm. Microbiol.**, v. 68, n. 6, p. 3152-3155, 2002.

PESET, V. et al. Epidemiological, Microbiological, Clinical, and Prognostic Factors of Bacteremia caused by High-Level Vancomycin-Resistant Enterococcus species. **Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 19, p. 742-749, 2000.

PILAI, S. K. et al. Prevalence of the *fsr* Locus in *Enterococcus faecalis* Infections. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 7, p. 2651-2652, 2002.

QIN, X. et al. Effects of *Enterococcus faecalis* *frs* Genes on Production of Gelatinase and a Serine Protease and Virulence. **Infect. Immun.**, p. 2579-2586, 2000.

RAO, M. B. et al. Molecular and Biotechnological Aspect of Microbial Proteases. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 62, n. 3, p.597-635, 1998.

RYBAK, M. J.; COYLE, E. A. Vancomycin-Resistant *Enterococcus*: Infectious Endocarditis Treatment. **Curr. Infect. Dis. Rep**, v. 3, p. 148-152, 1999.

SANNOMIYA, P. A. et al. Characterization of a Class of Nonformylated *Enterococcus faecalis* - Derived Neutrophil Chemotactic Peptides: the Sex Pheromones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 87, p. 66-70, 1990.

SARTINGEN, S. et al. Aggregation Substance Increases Adherence and Internalization, but Not Translocation, of *Enterococcus faecalis* through Different Intestinal Epithelial Cells in Vitro. **Infect. Immun.**, v. 68, n.10, p. 6044-6047, 2000.

SEMEDO, T. et al. Virulence Factors in Food, Clinical and Reference Enterococci: A Common Trait in the Genus?. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 26, p. 13-22, 2003.

SCHOUTEN, M. A. et al. AND THE EUROPEAN VRE STUDY GROUP. Prevalence of Vancomycin-Resistant Enterococci in Europe. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 19, p. 816-822, 2000.

SHERPARD, B. D.; GILMORE, M. S. Differential Expression of Virulence-Related Genes in *Enterococcus faecalis* in Response to Biological Cues in Serum and Urine. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 8, p. 4344-4352, 2002.

SIFRI, C. D. et al. Virulence Effect of *Enterococcus faecalis* Protease Genes and the Quorum-Sensing Locus *fsr* in *Caenorhabditis elegans* and Mice. **Infect. Immun.**, v. 70, n.10, p. 5647-5650, 2002.

SU, Y. A. ; SULAVIK, M. C.; HE, P.; K MAKINEN, K.; MAKINEN, P. L.; FIEDLER, S. ; WIRTH, R.; CLEWELL, D. B. Nucleotide Sequence of the Gelatinase gene (*gelE*) from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. **Infect. Immun.**, v.59, p. 415-420, 1991.

SÜMUTH, S. D.; MUSCHOLL-SILBERHORN, A.; WIRTH, R.; SUSAN, M.; MARRE, R.; ROZDZINSKI, E. Aggregation Substance Promotes Adherence, Phagocytosis, and Intracellular Survival of *Enterococcus faecalis* within Human Macrophages and Suppresses Respiratory Burst. **Infect. Immun.**, v.68, n.9, p. 4900-4906, 2000.

TOLEDO-ARANA, A.; VALLE, J.; SOLANO, C.; ARRIZUBIETA, M. J.; CUCARELLA, C.; LAMATA, M.; AMORENA, B.; LEIVA, J.; PENADÉS, J. R.; LASA, I. The Enterococcal Surface Protein, Esp, Is Involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, n^o 10, p. 4538-4545, 2001.

VANEK, N. N.; SIMON, S. J.; JACQUES-PALAZ, K.; LONDON, N. H.; STOBBERINGH, E. E. *Enterococcus faecalis* Aggregation Substance Promotes Opsonin-Independent Binding to Human Neutrophils Via a Complement Receptor Type 3-Mediated Mechanism. **FEMS Immun. Med. Microbiol.**, v. 26, p. 49-60, 1999.

VERGIS, E. N.; SHANKAR, N.; CHOW, J. W.; HAYDEN, M. K.; SNYDMAN, D. R.; ZERVOS, M. J.; LINDEN, P. K.; WAGENER, M. M.; MUDER, R. R. Association between the Presence of Enterococcal Virulence Factors Gelatinase, Hemolysin, and Enterococcal Surface Protein and Mortality among Patients with Bacteremia Due to *Enterococcus faecalis*. **Clin. Infect. Dis.**, v. 35, p. 570-575, 2002.

WAAR, M., MUSCHOLL-SILBERHORN, A. B.; WILLEMS, R. J. L.; SLOOFF, M. J. H.; HARNSEN, H. J. M.; DEGENER, J. E. Genogrouping and Incidence of Virulence Factors of *Enterococcus faecalis* in Liver Transplant Patients Differ from Blood Culture and Fecal Isolates. **J. Infect. Dis.**, v.185, p.1121-1127, 2002.

WONG, A. H.; WENZEL, R. P.; EDMOND, M. B. Epidemiology of Bacteriuria Caused by Vancomycin-Resistant Enterococci – A Retrospective Study. **Am. J. Infect. Control.**, v. 28, p. 277-281, 2000.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Averiguar a atividade gelatinolítica em amostras clínicas de *Enterococcus faecalis* isoladas de pacientes do Hospital Universitário da Região Norte do Paraná (HURNP) e verificar a influência de fatores físico-químicos na atividade enzimática.

Objetivos Específicos

- a. Identificar as amostras de *E. faecalis* produtoras de gelatinase através de ensaios em placa contendo diferentes meios de cultura suplementado com gelatina a 1%.
- b. Averiguar a influência dos cátions divalentes na produção de gelatinase em amostras de *E. faecalis*.
- c. Averiguar a influência de carboidratos entre amostras de *E. faecalis* produtoras de gelatinase.
- d. Averiguar a influência do pH e da temperatura entre amostras de *E. faecalis* produtoras de gelatinase.

TRABALHO CIENTÍFICO (Carta ao Editor)

Study of the effects of temperature, pH, divalent cations, and carbon sources on gelatinase production by *Enterococcus faecalis*

Patrícia Domingues Pires-Bouças^a, Erika Izumi^a, Luciana Furlaneto^c, Leonardo Sturion^b, Sérgio Suzart^{a*}

^aDepartment of Microbiology, ^bDepartment of the Applied Mathematics, State University of Londrina (UEL), Londrina, Paraná, Brazil; ^c University North of Paraná (UNOPAR), Londrina, Paraná, Brazil

Abbreviated title: Gelatinase production in *Enterococcus faecalis* strains

*Corresponding author. Tel.: +55 43 3371 4788; +55 43 3371 5766

E-mail address: ssuzart@hotmail.com (Sérgio Suzart)

TRABALHO CIENTÍFICO

ABSTRACT

Gelatinase is a potential virulence factor in Enterococci which are opportunistic pathogens that cause various types of infections in humans. The production of gelatinase was studied in 95 *Enterococcus faecalis* strains isolated from different types of clinical sources. Various environmental parameters including culture medium, temperature, pH, divalent cations, and carbon sources were examined for their effect on production of gelatinase. Enzyme activity was determined based on gelatin degradation in agar plates by filter-paper disks impregnated with bacterial cells, as evidenced by the formation of an opaque halo. Gelatinase production was sensitive to heat at a temperature greater than 50 °C, showing an association with time of heat treatment. A greater number of enterococcal strains produced gelatinase when grown in medium containing beef extract and peptone as nutrient agar. Gelatinase activity was detected over wide pH range with an optimum at pH 8. Ca²⁺ and Zn²⁺ caused a reduction in gelatinase production while other common divalent cations (Fe²⁺ and Cu²⁺) inhibited it or had no effect (Mg²⁺). Gelatinolytic activity varied greatly when bacterial cells were supplemented with different carbohydrates as the carbon source, increasing with arabinose, xylose, glucose, maltose and mannose, while unchanged or decreasing with various other sugars. The results show that gelatinase production is strongly influenced by different environmental factors. Further studies are warranted to determine the mechanisms controlling the production of this potential virulence factor in Enterococci.

Keywords: *Enterococcus faecalis*; Gelatinase production; Physico-chemical factors

1. INTRODUCTION

Enterococci are widely distributed in nature and could be considered as opportunistic pathogens whose natural habitat is the intestinal tract of humans and animals [1,2]. The genus *Enterococcus* is also able to colonize other sites including the lower and upper genital tract and the oral cavity [2]. The two most important species, *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*, have attracted attention as potential pathogens, since they may frequently cause local or systemic infections, including urinary tract and abdominal infections, bacteremia, septicemia, wound infections and endocarditis [3,4,5].

Several studies have shown that *E. faecalis* strains can express diverse potential virulence factors including cytolysin (hemolysin/bacteriocin) [6], gelatinase [7], aggregation substance (AS) [8], enhanced level of pheromone (Eep) [9] and enterococcal surface proteins such as Ace [10], EfaA [11] and Esp [12]. Despite the efforts of several researchers to identify new virulence determinants, the role of these factors in enterococcal pathogenicity remains unclear.

Gelatinase is an extracellular metalloendopeptidase able to hydrolyze gelatin and other compounds such as pheromone, collagen, casein, and fibrinogen [13,14]. In a previous study [13], it was shown that this metalloprotease has a molecular weight of approximately 31.5 kDa and an enzymatic activity with in a broad pH optimum of 6 – 8. Amino acid sequence analysis of GelE revealed a high degree of similarity with sequences of neutral proteases from different species of

Bacillus. [15,16,17]. Enterococcal infection studies in experimental animal models have suggested that gelatinase-expressing strains could play a key role during a host infection [18,19].

Some studies have demonstrated that strains of *E. faecalis* display gelatinolytic activity in culture media such as TSA and Todd-Hewitt among others [20,21,22], but none of these studies have paid attention to the influence of nutritional and environmental factors on the production of gelatinase under different experimental conditions. Therefore, the main purpose of the present study was to investigate gelatinase production by *E. faecalis* isolated from different clinical sources and to determine the influence of environmental parameters such as temperature, pH, divalent cations, and carbon sources on the production of gelatinase.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and growth conditions

A total of 95 *E. faecalis* strains included in this study were previously identified and described elsewhere [23]. These clinical strains were from different patients seen at the Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná, Londrina, Brazil. The strains were obtained from different specimen sources: 50 from urine (patients with urinary tract infection), 26 from purulent exudates (purulent umbilical

cord, abdominal secretion, secretion of renal fistula, tracheal secretion, bone fragment, splenic aspirate and peritoneal fluid), and 19 from rectal swabs (colonized patients). Before testing gelatinase production, the cultures were routinely grown on brain heart infusion (BHI) agar plates or in BHI broth (Acumedia, Baltimore, USA) under aerobic conditions, without agitation, at a constant temperature of 37 °C for 18 h. The isolates were stored both on nutrient agar slant at room temperature and in cryogenic vials containing 15 % glycerol-BHI broth at –20 °C.

2.2. Influence of different culture media on gelatinase production

The gelatinolytic activity of *E. faecalis* strains was assayed by plating on bacteriological agar (Acumedia, Baltimore, USA) and nutrient agar (Biolife, Milano, Italy), both supplemented with 1% gelatin as substrate. The composition of the nutrient agar was as follows (g/l): 3.0 beef extract, 5.0 bacteriological peptone and 15.0 agar. All cultures were grown at a final pH of 7.0. Clinical strains were cultivated in BHI broth and incubated aerobically for 18 h at 37 °C. Briefly, bacterial pellets were collected by centrifugation at 12,000 rpm for 20 min in an Eppendorf microtube, washed twice with sterile saline, and adjusted to 10^8 CFU/ml. Ten microliters of the bacterial suspension were applied to a sterile filter-paper disc (3 mm in diameter) and placed at the center of both media supplemented with 1 % gelatin. The agar plates were incubated at 37 °C for 24 h, and the radius of the opaque zone around each paper disc impregnated with bacterial cells was measured. The measure of gelatinolytic activity was estimated as the ratio between the radius (mm) of the filter-

paper disc and the radius of the opaque halo corresponding to the degradation of gelatin.

2.3. Effect of temperature and pH on gelatinase production

To determine the influence of temperature and pH on gelatinase activity, twenty-two *E. faecalis* strains, which produced gelatinase activity on bacteriological agar supplemented with 1 % gelatin (BG agar), were selected for this assay and further experiments. Briefly, bacterial cells were cultured under the same culture conditions described above, pelleted by centrifugation, washed three times with sterile distilled water and resuspended in 300 µl BHI broth. The effect of temperature on enzymatic activity was investigated by pre-incubating each bacterial suspension at different temperatures (50 °C, 64 °C and 100 °C) for 10, 20 and 30 min in a water bath, before gelatinolytic assays. To determine the optimal pH for gelatinase production, the final pH on BG agar was adjusted to values ranging 5.0–9.0 by using universal buffer solutions. Gelatinolytic activity was determined as described above.

2.4. Effect of divalent cations on gelatinase production

To ascertain the influence of divalent cations on gelatinase activity, five divalent ions (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} and Fe^{2+}) were chosen for this purpose and incorporated separately into BG agar as their chloride salt from a stock solution at a final concentration of 5 mM. The medium pH was adjusted to 7.0. Plates were further incubated at 37 °C for 24 h. Culture medium without cation supplement was included as control. Gelatinase activity was determined as described previously.

2.5. Effect of carbon sources on gelatinase production

To investigate the effect of different carbon sources on gelatinase production, eleven sugars were chosen and included in this study. For this purpose, strains were initially grown in BHI broth supplemented with the following sugars: arabinose, fructose, galactose, glucose, lactose, maltose, mannose, raffinose, starch, sucrose, and xylose. All solutions were filtered through sterile 0.22 μm membrane filters before use. These sugars were added to the culture medium at a final concentration of 50 mM. The bacterial cultures were incubated at 37 °C for 24 h and then gelatinolytic activity was carried out on BG agar as described above.

2.6. Statistical analysis

In all experiments, the values represent the mean of two independent experiments that were performed in triplicate. The probabilities and statistical significance for chi-square analysis and two-tailed Student's *t*-test were calculated with the aid of Microsoft Excel software. Probability (P) values of less than 0.05 were considered statistically significant.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Influence of different culture media on gelatinase production

To investigate whether different culture media have an influence on gelatinase activity, we cultured the 95 *E. faecalis* strains from clinical sources on both nutrient agar (NG agar) and bacteriological agar (BG agar), both supplemented with 1 % gelatin. Figure 1 shows a plate of representative gelatinase-producing strains on BG agar medium. Based on the data presented in Table 1, almost half of the strains (48.4 %) produced gelatinase in NG agar, while only 23.2 % (22/95) produced gelatinolytic activity on BG agar. In relation to the distribution of this enzyme activity in different groups of specimens, most of the strains showed gelatinolytic activity in NG agar, which included those most frequently originated from purulent exudates (61.5 %), followed by rectal swab (52.6 %) and urinary (40.0 %) strains. In contrast, a careful examination of the results relative to the distribution of gelatinase-producing strains on BG agar indicates that strains showing the highest enzyme activity were from rectal swabs (36.8 %), followed by purulent exudate (23.1 %) and urinary (18.0 %) strains. The majority of studies that detected gelatinolytic activity in *E. faecalis* strains utilized culture media such as TSA, BHI and Todd-Hewitt agar [20,21,22]. It is possible that this difference in gelatinolytic activity in different culture media is due in part to the carbon and nitrogen sources (e.g., beef extract and peptone), which could stimulate the production of gelatinase and other classes of proteolytic enzymes as

well [24,25]. Our findings suggest that the enzyme activity detected in BG agar is exclusively gelatinolytic, because the bacteria were grown in the presence of gelatin as the only source of nutrition. It is important to note that there were no statistically significant differences when a comparison was made of enzyme activity in the different groups of strains (χ^2 , $p > 0.05$). On the other hand, the production of gelatinase differed significantly for the two types culture medium (*t test*, $p < 0.05$).

3.2. Effect of thermal treatment and pH

The effects of physico-chemical factors such as temperature and pH on the production of gelatinase by *E. faecalis* strains are shown in Fig 2 and 3. It is important to point out that only strains that produced gelatinase in BG agar were included in these experiments and in other series of assays described above. As shown by the data presented in Fig. 2, the increase in temperature (from 50 °C to 64 °C) and time of heat treatment (from 20 to 30 min) resulted in a substantial loss of capacity to produce gelatinase. Our results show a clear correlation between gelatinolytic activity and both parameters studied (temperature and treatment time) (*t test*, $p < 0.05$). We suppose that the effect of these parameters on enzyme activity is a result of the loss of viable bacterial cells during treatment, consequently leading to lower production of gelatinase. Another explanation is that the enzyme is thermo-labile and was inactivated by heat treatment after its secretion.

To study the influence of pH (5.0 to 9.0) on gelatinase production, only *E. faecalis* strains showing gelatinolytic activity on BG agar were included in these experiments. The results presented in Fig. 3 revealed that gelatinolytic activity was detected over a wide pH range, reaching a peak at about pH 8.0 (*t test*, $p < 0.05$). In general, enzyme activity was influenced by the pH of the culture medium, where we found a reduction in gelatinolytic activity at pH 5.0 and 9.0 when compared to control (pH 7.0) (*t test*, $p < 0.05$).

3.3. Effect of divalent cations

The majority of cations examined in the present study are cofactors in a large variety of cellular processes and play a role in the structural stability of macromolecules [26,27,28,29]. In addition, various authors have demonstrated that metal ions interfere in some way with the production of a variety of microbial enzymes such as amylase [30,31], lipase [32,33], collagenase [34], and keratinase [35], among others. As shown by the data presented in Fig. 4, some divalent cations selected for these experiments affected the production of gelatinase. In examining the results, Mg^{2+} did not have a significant effect, while the other cations influenced the production of gelatinase. It was seen that Ca^{2+} caused a slight decrease in gelatinolytic activity when compared to control (*t test*, $p < 0.05$). On the other hand, it is interesting to note that the addition of Fe^{2+} and Cu^{2+} salts to BG agar inhibited gelatinolytic activity completely (*t test*, $p < 0.05$). When Zn^{2+} salt was incorporated into

the medium, we observed that this metal ion caused a dramatic reduction in enzyme activity, representing a statistically significant reduction when compared to control (*t test*, $p < 0.05$).

3.4. Effect of carbon sources

In an attempt to determine whether the production of gelatinase could be stimulated by the presence of different carbohydrates, the bacterial strains were previously cultivated in BHI broth supplemented with each carbon source at a final concentration of 50 mM, instead adding it directly to the BG agar. As can be seen clearly from Fig. 5, the separate addition of arabinose, glucose, maltose, mannose and xylose to BG agar increased gelatinolytic activity significantly among the strains analyzed when compared with the group control (*t test*, $p < 0.05$). Contrary to previous observations, our results suggest that the presence of carbon sources such as starch, galactose and sucrose diminished enzyme activity significantly (*t test*, $p < 0.05$). In addition, it is interesting to note that the carbohydrates fructose, lactose and raffinose did not influence significantly the production of gelatinase (*t test*, $p > 0.05$). In summary, we can state that arabinose and xylose induce enzyme activity efficiently, while galactose causes a significant decrease in activity. Future studies need to be conducted to delineate the mechanisms controlling the production of gelatinase in *E. faecalis*, because it is likely that this metalloprotease is subject to induction or repression processes or both events.

4. Conclusions

Our knowledge, this is the first paper that describe the influence of different physico-chemical factors on gelatinase activity of *E. faecalis* strains from clinical sources. The gelatinolytic activity of enterococcal isolates varies with environmental conditions related to temperature, pH, divalent cations and carbon source. These findings suggest that variation in such conditions could impact the virulence of this opportunistic pathogen associated with several human infections.

Acknowledgements

This study was supported in part by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná, and Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da Universidade Estadual de Londrina (PROPPG/UEL). We thank Dr. Albert Leyva for helpful discussion and for critical reading of this manuscript.

REFERENCES

- [1] Moellering, RC. Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. *Clin. Infect. Dis.* 1992, **14**, 1173-78.
- [2] Devriese, LA, Pot, B, Van Damme, L, Kersters, K, Haesebrouck, F. Identification of *Enterococcus* species isolated from foods of animal origin. *Int. J. Food Microbiol.* 1995, **26**, 187-97.
- [3] Cotter, G and Adley, CC. Ciprofloxacin susceptibility testing of enterococcal urinary isolates in accordance with BSAC guidelines. *J. Antimicrob. Chemother.* 2001, **48**, 324-5.
- [4] Giacometti, A, Cirioni, O, Schimizzi, AM, Del Prete, MS, Barchiesi, F, D'Errico, P, and Scalise, G. Epidemiology and microbiology of surgical wound infections. *J. Clin. Microbiol.* 2000, **38**, 918-22.
- [5] Jones, RN, Marshall, SA, Pfaller, MA, Wilke, WW, Hollis, RJ, Erwin, ME, Edmond, MB, and Wenzel, RP. Nosocomial enterococcal bloodstream infections in the SCOPE program: antimicrobial resistance, species occurrence, molecular testing results and laboratory testing accuracy. SCOPE Hospital Study Group. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 1997, **29**, 95–102.
- [6] Ike, Y, Clewell, DB, Segarra, R A, and Gilmore, MS. Genetic analysis of the pAD1 hemolysin/bacteriocin determinant in *Enterococcus faecalis*: insertional mutagenesis and cloning. *J. Bacteriol.* 1990, **172**, 155-63.
- [7] Su, YA, Sulavik, MC, He, P, Makinen, KK, Makinen, PL, Fiedler, SS, Wirth, R, and Clewell, DB. Nucleotide sequence of the gelatinase gene (*gelE*) from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. *Infect. Immun.* 1991, **59**, 415-20.
- [8] Galli, D, Lottspeich, F, and Wirth, R. Sequence analysis of *Enterococcus faecalis* aggregation substance encoded by the sex pheromone plasmid pAD1. *Mol. Microbiol.* 1990, **4**, 895–904.
- [9] An, FY, Sulavik, MC, and Clewell, DB. Identification and characterization of a determinant (*eep*) on the *Enterococcus faecalis* chromosome that is involved in production of the peptide sex pheromone cAD1. *J. Bacteriol.* 1999, **181**, 5915-21.
- [10] Nallapareddy, SR, Qin, X, Weinstock, GM, Hook, M, and Murray, BE. *Enterococcus faecalis* adhesin, Ace, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I. *Infect. Immun.* 2000, **68**, 5218-24.
- [11] Lowe, AM, Lambert, PA, and Smith, R. Cloning of an *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen: homology with adhesins from some oral streptococci. *Infect. Immun.* 1995, **63**, 703-06.

- [12] Shankar, V, Baghdayan, AS, Huycke, MM, Lindahl, G, and Gilmore, MS. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infect. Immun.* 1999, **67**, 193-200.
- [13] Makinen, P, Clewell, F, An, F, and Makinen, KK. Purification and substrate specificity of a strongly hydrophobic extracellular metalloendopeptidase ("gelatinase") from *Streptococcus faecalis* (strain OG1-10). *J. Biol. Chem.* 1989, **264**, 3325-34.
- [14] Makinen, P and Makinen, KK. The *Enterococcus faecalis* extracellular metalloendopeptidase (EC 3.4.24.30; coccolysin) inactivates human endothelin at bonds involving hydrophobic amino acid residues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994, **200**, 981-85.
- [15] Vasantha, N, Thompson, LD, Rhodes, C, Banner, C, Nagle, J, and Filpula, D. Genes for alkaline protease and neutral protease from *Bacillus amyloliquefaciens* contain a large open reading frame between the regions coding for signal sequence and mature protein. *J. Bacteriol.* 1984, **159**, 811-19.
- [16] Takagi, M, Imanaka, T, and Aiba, S. Nucleotide sequence and promoter region for the neutral protease gene from *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bacteriol.* 1985, **163**, 824-31.
- [17] Sidler, W, Niederer, E, Suter, F, and Zuber, H. The primary structure of *Bacillus cereus* neutral proteinase and comparison with thermolysin and *Bacillus subtilis* neutral proteinase. *J. Biol. Chem.* 1986, **367**, 643-57.
- [18] Sigh, KV, Qin, X, Weinstock, GM, and Murray, BE. Generation and testing of mutants of *Enterococcus faecalis* in a mouse peritonitis model. *J. Infect. Dis.* 1998, **178**, 1416-20.
- [19] Qin, X, Singh, KV, Weinstock, GM, and Murray, BE. Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. *Infect. Immun.* 2000, **68**, 2579-86.
- [20] Vergis, EN, Shankar, N, Chow, JW, Hayden, MK, Snyderman, DR, Zervos, MJ, Linden, PK, Wagener, MM, and Muder, RR. Association between the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin, and enterococcal surface protein and mortality among patients with bacteremia due to *Enterococcus faecalis*. *Clin. Infect. Dis.* 2002, **35**, 570-5.
- [21] Creti, R, Imperi, M, Bertuccini, L, Fabretti, F, Orefici, G, Di Rosa, R, and Baldassarri, L. Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources. *J. Med. Microbiol.* 2004, **53**, 13-20.
- [22] Sedgley, CM, Lennan, SL, and Clewell, DB. Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci. *Oral Microbiol. Immunol.* 2004, **19**, 95-101.
- [23] Marques, EB and Suzart, S. Occurrence of virulence-associated genes in clinical *Enterococcus faecalis* strains isolated in Londrina, Brazil. *J. Med. Microbiol.* 2004, **53**, 1069-73.

- [24] Daatselaar, MCC and Harder, W. Some aspects of the regulation of the production of extracellular proteolytic enzymes by a marine bacterium. *Arch. Microbiol.* 1974, **101**, 21-34.
- [25] Boethling, RS. Regulation of extracellular protease secretion in *Pseudomonas maltophilia*. *J. Bacteriol.* 1975, **123**, 954-61.
- [26] Sato, A, Takagi, K, Kano, K, Kato, N, Duine, JA, and Ikeda T. Ca²⁺ stabilizes the semiquinone radical of pyrroloquinoline quinone. *Biochem. J.* 2001, **357**, 893-8.
- [27] Ye, D, Wei, M, McGuire, M, Huang, K, Kapadia, G, Herzberg, O, Martin, BM, and Dunaway-Mariano, D. Investigation of the catalytic site within the ATP-grasp domain of *Clostridium symbiosum* pyruvate phosphate dikinase. *J. Biol. Chem.* 2001, **276**, 37630-9.
- [28] Kishishita, S, Okajima, T, Kim, M, Yamaguchi, H, Hirota, S, Suzuki, S, Kuroda, S, Tanizawa, K, and Mure, M.. Role of copper ion in bacterial copper amine oxidase: spectroscopic and crystallographic studies of metal-substituted enzymes. *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 1041-55.
- [29] Mulrooney, SB and Hausinger, RP. Metal ion dependence of recombinant *Escherichia coli* allantoinase. *J. Bacteriol.* 2003, **185**, 126-34.
- [30] Cordeiro, CAM, Martins, MLL, and Luciano, AB. Production and properties of α -amylase from thermophilic *Bacillus* sp. *Braz. J. Microbiol.* 2002, **33**, 57-61.
- [31] Falih, AM. Effect of heavy-metals on amylolytic activity of the soil yeasts *Geotrichum capitatum* and *Geotrichum candidum*. *Bioresour. Technol.* 1998, **66**, 213-7.
- [32] Yadav, RP, Saxena, RK, Gupta, R, and Davidson, WS. Purification and characterization of a regiospecific lipase from *Aspergillus terreus*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1998, **28**, 243-9.
- [33] Rashid, N, Shimada, Y, Ezaki, S, Atomi, H, and Imanaka, T. Low-temperature lipase from psychrotrophic *Pseudomonas* sp. strain KB700A. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001, **67**, 4064-9.
- [34] Okamoto, M, Yonejima, Y, Tsujimoto, Y., Suzuki, Y, and Wanatabe, K. A thermostable collagenolytic protease with a very large molecular mass produced by thermophilic *Bacillus* sp. Strain MO-1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001, **57**, 103-8.
- [35] Letourneau, F, Soussotte, V, Bressollier, P, Branland, P, and Verneuil, B. Keratinolytic activity of *Streptomyces* sp. S.K₁₋₀₂: a new isolated strain. *Lett. Appl. Microbiol.* 1998, **26**, 77-80.

CONCLUSÕES

a. A frequência da atividade gelatinolítica em amostras de *E. faecalis* foi maior no meio agar nutriente (48,42%) do que em relação ao meio agar bacteriológico, ambos suplementados com gelatina (23,1%).

b. Não houve diferenças significativas na atividade gelatinolítica entre os diferentes isolados e os meios de cultura.

c. Houve diferenças significativas na atividade gelatinolítica entre as amostras produtoras de gelatinase em ambos os meios de cultura.

d. A produção de gelatinase foi sensível ao aumento da temperatura a partir de 50°C, mostrando associação com o tempo de exposição ao tratamento proposto.

e. A atividade gelatinolítica foi influenciada pelo pH do meio de cultura, pois em relação ao controle, apresentou um pico da atividade enzimática em pH 8,0 e uma diminuição da atividade nos pHs 5,0 e 9,0.

f. Em agar BG, o cátion divalente Mg^{2+} não influenciou a atividade gelatinolítica. Por outro lado, os cátions Ca^{2+} e Zn^{2+} diminuíram significativamente a atividade da gelatinase, enquanto que Cu^{2+} e Fe^{2+} inibem totalmente a atividade da enzima em *E. faecalis*.

g. Dentre os carboidratos que aumentaram a atividade gelatinolítica, arabinose e xilose apresentaram-se mais significativos quanto à eficiência da gelatinase entre as amostras de *E. faecalis*. Por outro lado, amido, galactose e sacarose diminuíram significativamente a atividade gelatinolítica das amostras analisadas.

ANEXOS

Table 1. Effect of different culture media on gelatinase production in *E. faecalis* strains isolated from clinical sources

Clinical sites (N ^o of isolates)	N ^o (%) of gelatinase-producing <i>E. faecalis</i> strains ^a	
	Nutrient agar	Bacteriological agar
Urine (50)	20 (40.0 %)	09 (18.0 %)
Purulent exudates (26)	16 (61.5 %)	06 (23.1 %)
Rectal swabs (19)	10 (52.6 %)	07 (36.8 %)
TOTAL	46 (48.4 %)	22 (23.2 %)

^aBoth culture media were supplemented with 1 % gelatin. The data represent two independent experiments performed in triplicate.



Fig 1. Assay of gelatinolytic activity on plate with BG agar medium supplemented with with 1 % gelatin. Clearing zones formed around each sterile filter-paper disc (3 mm in diameter) impregnated with *E. faecalis* strains. The plate was incubated at 37°C for 24 h.

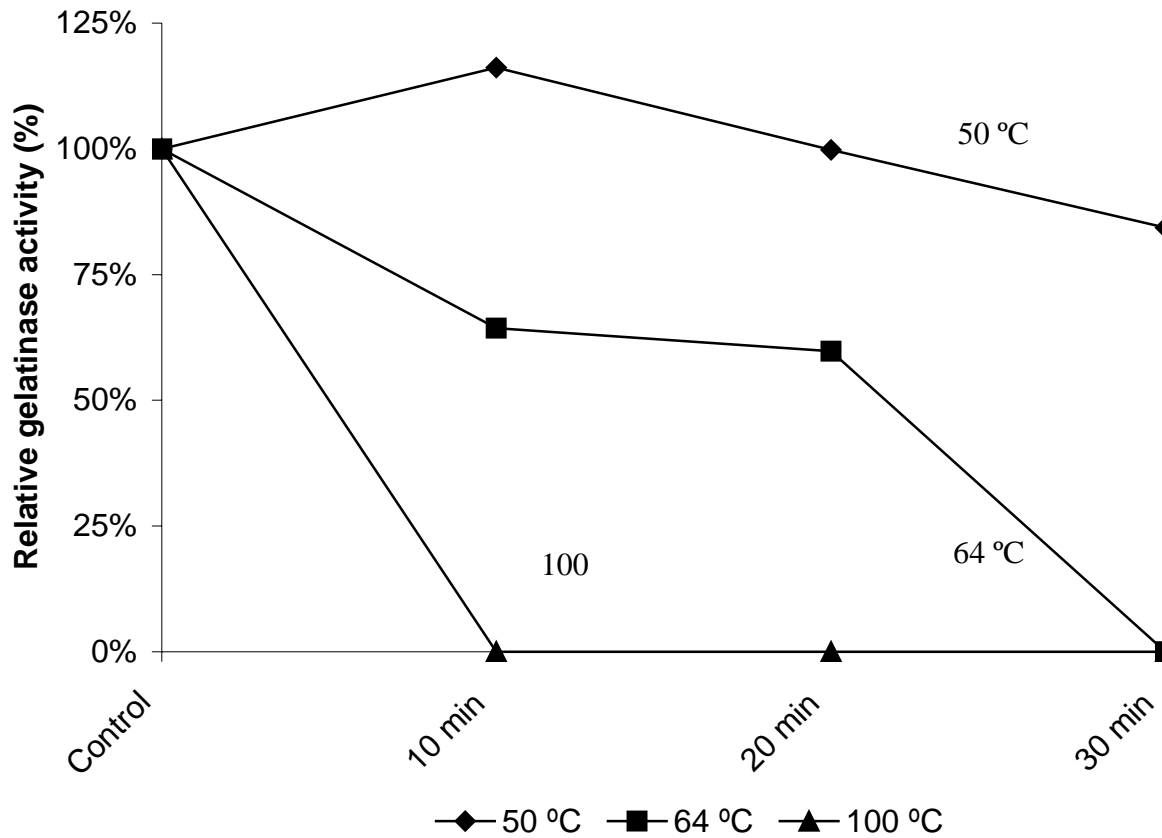


Fig 2. Effect of different heat treatment on gelatinolytic activity produced by *E. faecalis* strains. Values are averages of two independent experiments that were performed in triplicate. The enzymatic activity was measured on BG agar (pH 7.0) at 37 °C. The control experiments were done in the absence of treatment by heat. The asterisk represents statistically significant differences ($P < 0.05$).

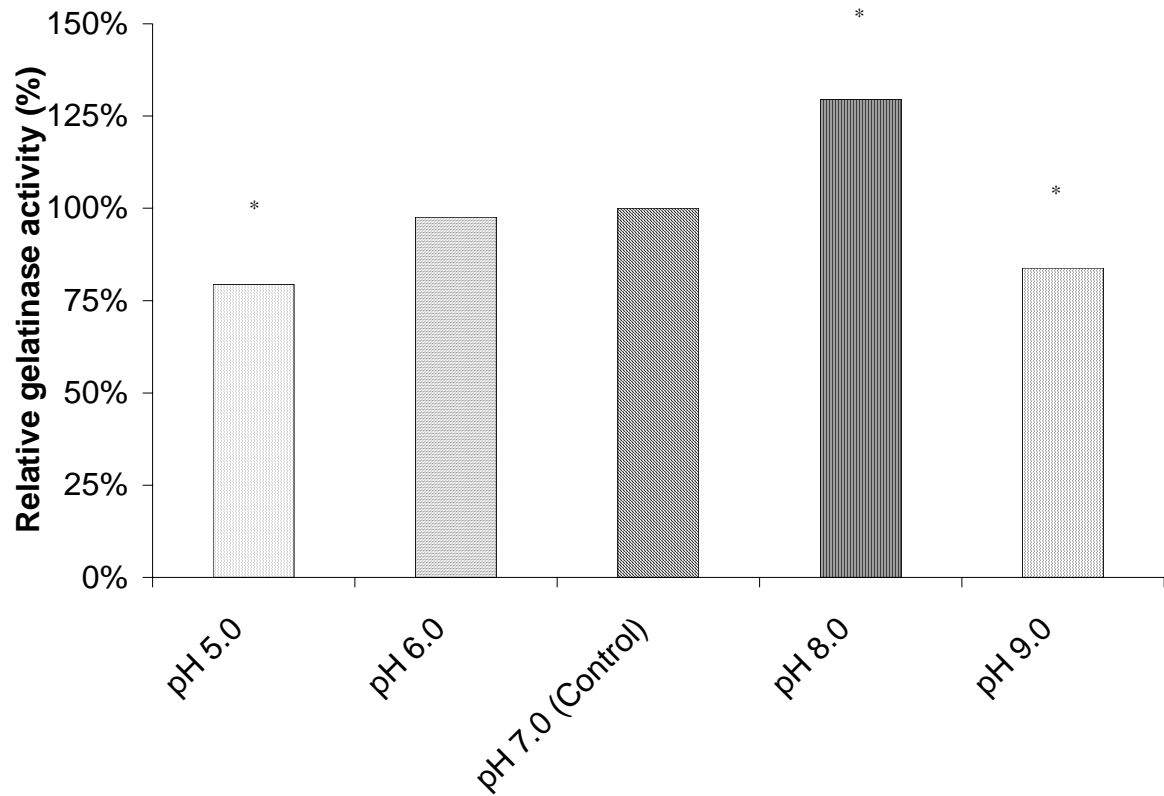


Fig 3. Effect of the medium pH on gelatinolytic activity produced by *E. faecalis* strains. Values are averages of two independent experiments that were performed in triplicate. The enzymatic activity on BG agar at pH 7.0 was considered as 100 %. The asterisk represents statistically significant differences ($P < 0.05$).

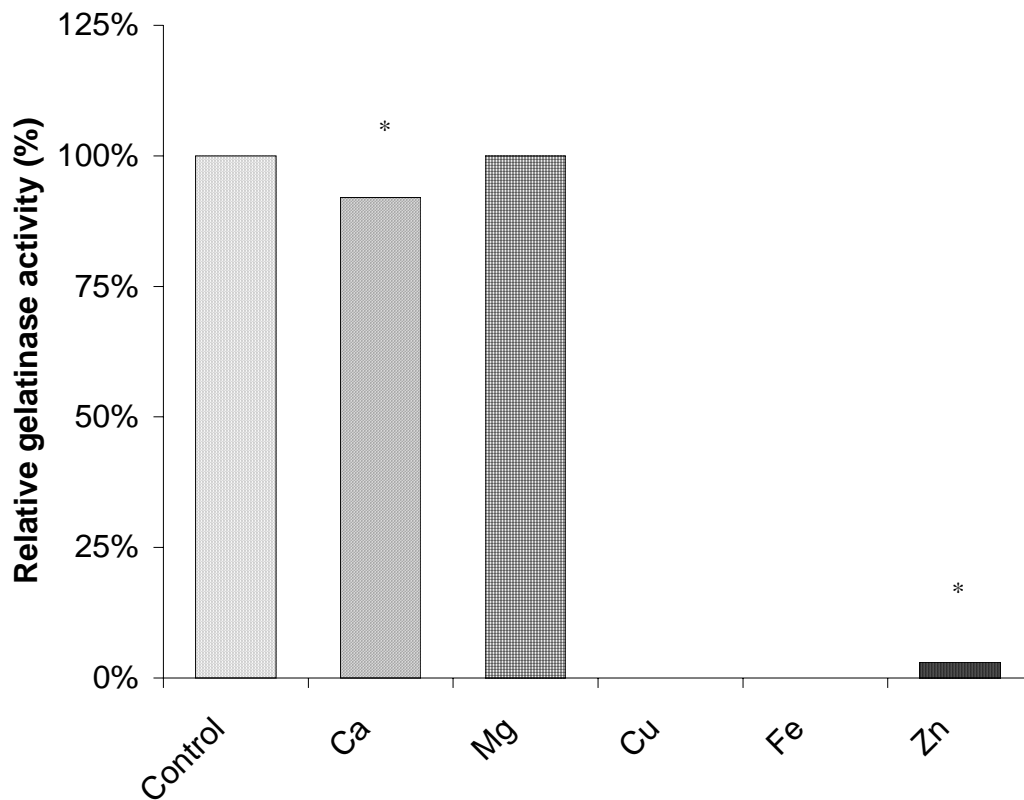


Fig 4. Effect of divalent cations on gelatinolytic activity produced by *E. faecalis* strains. Values are averages of two independent experiments that were performed in triplicate. The enzymatic activity was measured on BG agar (pH 7.0) at 37 °C. The control experiments were done in the absence of divalent ions. The asterisk represents statistically significant differences ($P < 0.05$).

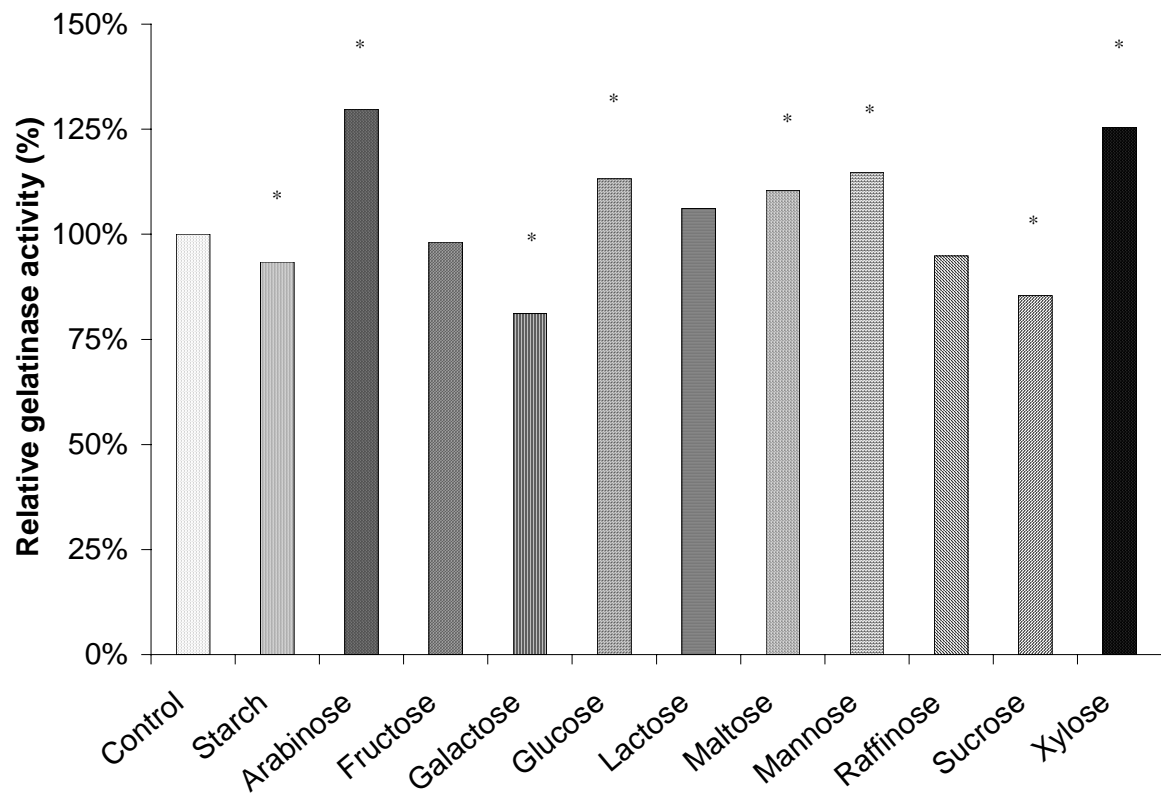


Fig. 5. Effect of carbon sources on gelatinolytic activity produced by *E. faecalis* strains. Values are averages of two independent experiments that were performed in triplicate. The enzymatic activity was measured on BG agar (pH 7.0) at 37 °C. The control experiments were done in the absence of carbohydrates. The asterisk represents statistically significant differences ($P < 0.05$).