

DEMONSTRAÇÃO QUALITATIVA E SEMIQUANTITATIVA DA IMUNOGLOBULINA G-Fc-RECEPTOR-ATIVIDADE DOS ESTREPTOCOCOS¹

FERNANDO GOMES F. LIMA² E HANS BLOBEL³

ABSTRACT. - Lima F.G.F. & Blobel H. 1984. [Qualitative and semiquantitative studies on the immunoglobulin G-Fc-receptor activity of streptococci.] Demonstração qualitativa e semiquantitativa da imunoglobulina G-Fc-receptor-atividade dos estreptococos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 4(4):119-122. Inst. f. Bakteriol. Immunol., Univ. Giessen, Frankfurter Str. 107, D-6300 Giessen, W.-Germany.

These studies were conducted, in order to determine the nonimmune binding of human immunoglobulin (Ig) G to streptococci by qualitative and semiquantitative tests. In the qualitative slide method 28 (30.4%) of the 92 streptococcal cultures belonging to the serological group A bound IgG as well as 118 (50.2%) of the 235 group C cultures and 25 (31.6%) of the 79 group G cultures. The semiquantitative microtiter procedure revealed IgG-Fc-receptor activity in 31 (33.6%) of the 92 group A cultures, 171 (72.7%) of the 235 group C cultures and 32 (40.5%) of the 79 group G cultures in dilutions up to 1:16000. Extraction of the streptococci by boiling or concentrated formic acid were suitable to obtain free IgG-Fc-receptors for the test. The semiquantitative microtiter procedure proved to be more sensitive for the demonstration of nonimmune IgG-binding to streptococci than the qualitative slide method and indicated the degree of IgG-Fc-receptor activity.

INDEX TERMS: Immunoglobulin G-Fc-receptor activity, nonimmune binding of IgG, streptococcal binding of IgG, demonstration of IgG-Fc-receptors.

SINOPSE. - Foi conduzido um estudo qualitativo e semi-quantitativo para verificar a incidência de Fc-receptores para imunoglobulina G (IgG) humana em *Streptococcus spp.* Na prova qualitativa em lâmina verificou-se Fc-receptor-atividade em 28 (30,4%) das 92 culturas do grupo sorológico A, em 118 (50,2%) das 235 culturas do grupo sorológico C e em 25 (31,6%) das 79 culturas do grupo sorológico G. Nas provas semiquantitativas em placas de microtitulação, 31 (33,6%) das 92 culturas do grupo A, 171 (82,7%) das 235 culturas do grupo sorológico C e 32 (40,5%) das 79 culturas do grupo sorológico G mostraram-se positivas, em diluições até 1:16000. De um total de 611 culturas testadas, as provas semiquantitativas em placa de microtitulação detectaram 234 (38,3%) culturas positivas, enquanto a prova qualitativa em lâmina 171 (28,0%). Dentre as provas semiquantitativas, a extração por fervura das bactérias e o tratamento com ácido fórmico mostraram-se eficientes na detecção da IgG-Fc-receptor-atividade. Conclui-se que as provas semiquantitativas em placas de microtitulação são eficientes na determinação do grau da IgG-

Fc-receptor-atividade.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Imunoglobulina (Ig) G-Fc-receptor-atividade, não imune ligação da IgG, estreptococos ligação da IgG, demonstração dos IgG-receptores.

INTRODUÇÃO

A importância da Fc-receptor-atividade de *Staphylococcus aureus* tem sido amplamente divulgada. Jensen (1958, 1959) descreveu um antígeno, contido nos extratos obtidos de *S. aureus*, que foi precipitado por todos os soros sanguíneos humanos examinados. Grov et al. (1964) denominaram esse antígeno de proteína A (PA). Forsgren & Sjöquist (1966) observaram que a PA de *S. aureus* se liga ao componente Fc da imunoglobulina G (IgG) humana. A PA está localizada na superfície das bactérias e pode ser isolada dos caldos de cultivo (Forsgren 1969, 1970; Movitz 1976). Kronvall & Williams (1969) observaram que a PA somente reage com as subclasse 1, 2 e 4 da IgG humana, mas não com a subclasse 3. Goudswaard et al. (1978), no entanto, relataram a reação da PA com quase todas as imunoglobulinas de mamíferos estudadas, assim como com a IgA e IgM monoclonal humana. Oeding & Haukenes (1963) e Forsgren (1970) observaram a incidência da PA em estafilococos patogênicos isolados do homem. Müller et al. (1973) verificaram que 341 (98,8%) das 345 culturas de *S. aureus* de bovinos estudadas produziram PA, o que os levou a concluir que a PA é formada por quase todos os estafilo-

¹ Aceito para publicação em 28 de maio de 1984.

Este trabalho é, em parte, um resumo da tese de doutoramento do primeiro autor, com apoio da Deutsche Forschungsgemeinschaft, Bonn, República Federal da Alemanha (RFA).

² Bolsista do Serviço Alemão de Intercâmbio Acadêmico (DAAD), Bonn, RFA.

³ Instituto de Bacteriologia e Imunologia da Justus-Liebig-Universität Giessen, Frankfurter Str. 107, 6300 Giessen, RFA.

cocos patogênicos de bovinos. Amitsberg (1979), Philipp et al. (1980) e Müller et al. (1981) verificaram também a incidência da PA em culturas de *S. hyicus*. A PA de *S. aureus* pode ser utilizada para diferentes provas sorológicas (Kronvall 1973a, Austin & Daniels 1974, Jonsson & Kronvall 1974, Kitzrow et al. 1979).

Uma PA-receptor-atividade semelhante à de *S. aureus* foi recentemente descrita para os estreptococos dos grupos sorológicos A, C e G, sendo que estes reagem com as 4 subclases de IgG humana (Kronvall 1973b, Christensen & Oxelius 1974, Christensen et al. 1976). Os mesmos autores observaram que os estreptococos não reagiram com IgA, IgM, IgD e IgE. Schalen (1980) relatou a reação dos estreptococos do grupo sorológico A com a IgA humana. Myhre & Kronvall (1980a) demonstraram, no estudo feito em 47 culturas de estreptococos do grupo sorológico C (*S. equisimilis*, *S. dysgalactiae*, *S. zooepidemicus* e *S. equi*), especificidade dos Fc-receptores para as reações com a IgG da espécie humana e dos animais. Assim como a PA de *S. aureus* (IgG-Fc-receptor tipo I) os Fc-receptores de *S. zooepidemicus* (IgG-Fc-receptor tipo V) somente reagiram com as subclasses 1, 2 e 4 da IgG humana. Estreptococos do grupo sorológico A (IgG-Fc-receptor tipo II) ligaram-se às 4 subclasses da IgG humana (Myhre & Kronvall 1977). *S. equisimilis*, *S. dysgalactiae* é estreptococos do grupo sorológico G do homem e de eqüino (IgG-Fc-receptor tipo III) reagiram com todas as subclasses de IgG dos animais estudados, porém, estreptococos do grupo sorológico G de bovino (IgG-Fc-receptor tipo IV), somente com IgG₁ e IgG₄ humana (Myhre et al. 1979, Myhre & Kronvall 1980b, 1982, Lima 1984).

O presente trabalho objetivou verificar a incidência de IgG-Fc-receptores em estreptococos isolados da espécie humana e dos animais, qualitativamente no teste de lâminas e semiquantitativamente em placas de microtitulação, utilizando os eritrócitos sensibilizados com IgG.

MATERIAL E MÉTODOS

Culturas de estreptococos

Para a verificação da incidência de Fc-receptores para IgG humana foram examinadas 611 culturas de estreptococos do Instituto de Bacteriologia e Imunologia da Justus-Liebig-Universität, Giessen. Essas culturas foram identificadas segundo Buchman & Gibbons (1974). Foram estudadas a hemólise, coloração de Gram, prova de catalase, hidrólise de esculinha e hipurato de sódio, teste de CAMP, fermentação dos carboidratos, solubilidade da bile e sensibilidade à optoquina (Lennette et al. 1980). O grupamento sorológico foi feito utilizando-se os métodos de Latex-aglutinação⁴ (Hahn 1980) e co-aglutinação⁵ (Hahn & Nyberg 1976). Para o cultivo e manutenção das culturas foram utilizados os meios de ágar-sangue de carneiro preparado segundo Blobel & Schliesser (1979) e Todd Hewitt-Broth (THB)⁶ adicionado de fermento (3%) e de solução vitaminada estéril⁷ contendo ácido fólico⁸ (60 mg), ácido

nicotínico⁹ (60 mg), cloridrato de hidropirodoxal¹⁰ (60 mg), biotina¹¹ (15 mg), ácido pantotênico¹² (60 mg), riboflavina¹³ (10 mg), cloridrato de tiamina¹⁴ (60 mg), meso-inositol¹⁵ (60 mg) e ácido p-hidroxibenzóico¹³ (60 mg) por ml.

Detecção qualitativa da Fc-receptor-atividade

Esta prova foi feita essencialmente com base no método de Winblad e Ericson (1973). Algumas colônias de estreptococos foram retiradas diretamente da placa de ágar-sangue com alça de platina e uniformemente misturadas em 1 gota de solução salina estéril (0,14 M) sobre uma lâmina de vidro (76 x 26 mm). Após homogeneização foram acrescentadas 1 gota da suspensão de eritrócitos humanos (grupo O, Rh positivo) (Sangocell C¹⁵) sensibilizados com IgG. As leituras foram feitas após 5 min, utilizando-se uma lupa estereoscópica binocular (20 x).

Prova semiquantitativa

A Fc-receptor-atividade foi determinada semiquantitativamente em placas (V-forma) de microtitulação (Takatsy 1956, Conrath 1972, Kroemer et al. 1977), utilizando-se extratos obtidos dos estreptococos por fervura por 1 hora (Jensen 1958, 1959), por ácido fórmico (Schaege et al. 1979) ou sobrenadantes das culturas após cultivo das bactérias por 18 horas a 37°C e posterior centrifugação (23000 g) por 20 min (Lima 1984).

RESULTADOS

A identidade dos estreptococos foi confirmada, através de suas características morfológicas, bioquímicas e sorológicas (Buchanan & Gibbons 1974). Das 611 culturas estudadas, 92 foram classificadas no grupo sorológico A, 94 no grupo B, 235 no grupo C, 71 no grupo D, 79 no grupo G e 30 culturas eram *Streptococcus pneumoniae*.

Quadro 1. Resultado da prova qualitativa em lâmina da Fc-receptor-atividade dos estreptococos

Grupo sorológico	Nº de culturas	% reações positivas ^(a)	% reações negativas ^(a)	% reações espontâneas ^(b)
A	92	30,4	60,9	8,7
B	94	—	88,4	11,6
C	235	50,2	33,7	16,1
D	71	—	90,1	9,9
G	79	31,6	68,4	—

S. pneumoniae 30 — — —

(a) Eritrócitos humanos (Grupo O, Rh-positivo) sensibilizados com imunoglobulina G (IgG).

(b) Eritrócitos humanos não sensibilizados.

⁹ Fa. Schuchhardt, München, RFA

¹⁰ Fa. Fluka, Buchs, Schweiz

¹¹ Fa. Sigma, St. Louis, USA

¹² Fa. Merck, Darmstadt, RFA

¹³ Fa. Riedel De Haen, Hannover, RFA

¹⁴ Fa. Greiner, Nürtingen, RFA

¹⁵ Behringwerke AG, Marburg, RFA

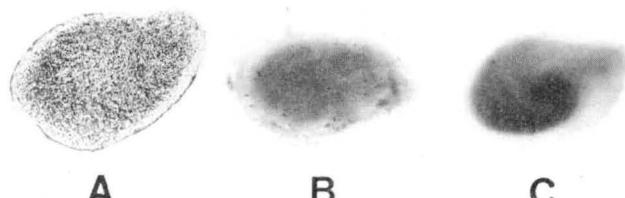


Fig. 1. Demonstração qualitativa da Fc-receptor-atividade dos estreptococos por hemagglutinação com eritrócitos sensibilizados com IgG em lâminas, segundo Winblad & Ericson (1973): A) reação positiva com proteína A-positivo *Staphylococcus aureus*; B) reação positiva com Fc-receptor-positivos estreptococos; C) reação negativa com Fc-receptor-negativos estreptococos.

Na prova qualitativa em lâmina mostraram-se positivas 28 (30,4%) das 92 culturas do grupo A, 118 (50,2%) das 235 culturas do grupo C e 25 (31,6%) das 79 culturas do grupo G, reagindo com eritrócitos sensibilizados com IgG. As culturas dos grupos sorológicos B, D e *S. pneumoniae* não apresentaram IgG-Fc-receptor-atividade (Fig. 1, Quadro 1).

Nas provas semiquantitativas constatou-se IgG-Fc-receptor-atividade nos extratos obtidos por fervura das bactérias por 1 hora em 20 (21,7%) das 92 culturas do grupo A, 116 (49,3%) das 235 do grupo C e 21 (26,5%) das 79 culturas do grupo G. Após tratamento com ácido fórmico, 21,7% das culturas do grupo A, 45,5% das culturas do grupo C e 26,5% das culturas do grupo G mostraram-se positivas em diluições até 1:16000 (Fig. 2). Verificou-se ainda IgG-Fc-receptor-atividade nos sobrenadantes dos caldos após incubação das bactérias por 18 horas a 37°C em 12 (13%) das culturas do grupo A, 83 (35,3%) das 235 culturas do grupo C e 12 (15,1%) das 79 culturas do grupo G em diluições até 1:128 (Quadro 2).

DISCUSSÃO

Na detecção qualitativa da IgG-Fc-receptor-atividade em lâmina segundo Winblad & Ericson (1973) verificou-se que 171 (28,0%) das 611 culturas de *Streptococcus spp.* examinadas possuíam Fc-receptores para IgG humana. Kronvall (1973b), trabalhando com estreptococos dos grupos sorológicos A, C e G, chegou a resultados idênticos. Das 57 culturas de estreptococos estudadas por Kronvall, 15 (26,3%) mostraram-se posi-

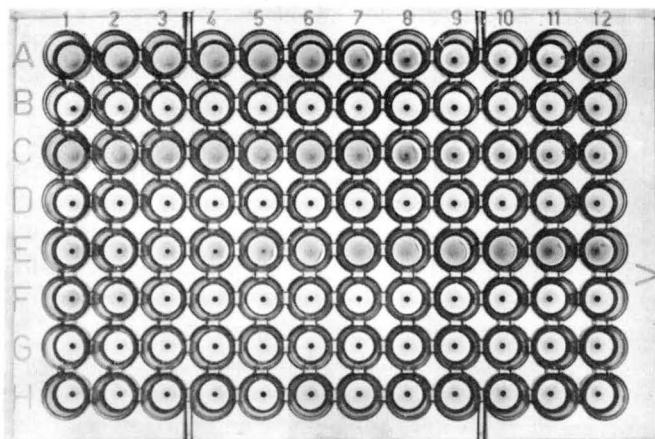


Fig. 2. Reações de hemagglutinação no teste semiqualitativo em placas de microtitulação com eritrócitos humanos sensibilizados com IgG (Sangocell C). Exemplos da titulação^{a)} dos extratos obtidos com ácido fórmico de diferentes estreptococos do grupo sorológico C.

- AB¹⁾ - pouca Fc-receptor-atividade
- A₁-A₇ - reações positivas (hemagglutinação)
- A₈-A₁₂ - reações negativas (sem hemagglutinação)
- CD²⁾ - pouca Fc-receptor-atividade
- C₁-C₈ - reações positivas (hemagglutinação)
- C₉-C₁₂ - reações negativas (sem hemagglutinação)
- EF³⁾ - muita Fc-receptor-atividade
- E₁-E₅ - "prózona" (sem hemagglutinação)
- E₆-E₁₂ - reações positivas (hemagglutinação)
- G⁴⁾ - ausência de Fc-receptor-atividade
- G₁-G₁₂ - reações negativas (sem hemagglutinação)
- H - controle-eritrócitos humanos sensibilizados com IgG

- a) Foram feitas diluições, começando com 1:2 da esquerda para a direita
- 1) *S. equisimilis* isolado do homem
- 2) *S. zooepidemicus* isolado de equino
- 3) *S. dysgalactiae* isolado de bovino
- 4) *S. equi* isolado de equino

vas, reagindo com eritrócitos de carneiro sensibilizados com IgG.

Em placas de microtitulação comprovou-se IgG-Fc-receptor-atividade nos sobrenadantes dos caldos obtidos após incubação das bactérias. Kronvall (1973b) já observara IgG-Fc-receptor-atividade em 25 (43,8%) dos 57 sobrenadantes examinados.

Quadro 2. Resultados das provas semiqualitativas da imunoglobulina G (IgG)-Fc-receptor-atividade dos estreptococos em placas de microtitulação

Grupos sorológicos	Nº de culturas	Nº(a)	Nos extratos por fervura % ^(b)	M ^(c)	IgG-Fc-receptor-atividade			Nos sobrenadantes das culturas		
					Nº	%	M	Nº	%	M
A	92	20	(21,7%)	3,9	20	(21,7%)	3,5	12	(13%)	1,8
C	235	116	(49,3%)	5,7	107	(45,5%)	5,4	83	(35,3%)	4,8
G	79	21	(26,5%)	3,5	21	(26,5%)	3,3	12	(15,1%)	3,5

(a) Números absolutos das reações positivas.

(b) Percentuais das reações positivas.

(c) Médias aritméticas do grau da IgG-Fc-receptor-atividade por hemagglutinação dos eritrócitos sensibilizados com imunoglobulina G.

O método de extração dos IgG-Fc-receptores por fervura das bactérias foi uma prova eficiente já observada por Jensen (1958, 1959), na extração de proteína A (IgG-Fc-receptor tipo I) de *Staphylococcus aureus*.

A extração com ácido fórmico mostrou-se bastante vantajosa, pois permitiu isolar, em pouco tempo, IgG-Fc-receptores dos estreptococos diretamente das placas de ágar-sangue, sem que fosse necessária a incubação em caldos. Schaeg et al. (1979) também verificaram a alta eficiência do tratamento com ácido fórmico para a extração de PA de *S. aureus*, em relação à extração por fervura dos estafilococos.

O uso de eritrócitos humanos sensibilizados com IgG tanto na prova qualitativa em lâmina como nas provas semiquantitativas em placas de microtitulação permitiram o aumento da sensibilidade e da qualidade dos testes. Conclui-se que as provas semiquantitativas em placas de microtitulação com os eritrócitos sensibilizados são eficientes para a determinação do grau da IgG-Fc-receptor-atividade dos estreptococos.

REFERÊNCIAS

- Amtsberg G. 1979. Vergleichende biochemische und serologische Untersuchungen an Staphylokokken von Schwein und Rindern unter besonderer Berücksichtigung von *Staphylococcus hyicus* bzw. *Staphylococcus epidermidis* Biotyp 2. Zbl. Vet. Med. B 26: 137-152.
- Austin R.M. & Daniels C.A. 1974. Interaction of staphylococcal protein A with virus-IgG complexes. J. Immunol. 113: 1568-1574.
- Blobel H. & Schliesser T. (Hrsg.). 1979. Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren. Bd. 1. Gustav Fischer, Jena.
- Buchanan R.E. & Gibbons N.E. (eds.). 1974. Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th ed. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Christensen P., Johansson B.G. & Kronvall G. 1976. Interaction of streptococci with the Fc fragment of IgG. Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. C 84: 73-76.
- Christensen P. & Oxelius V.-A. 1974. Quantitation of the uptake of human IgG by some streptococci groups A, B, C and G. Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B 82: 475-483.
- Conrath T.B. 1972. Handbook of microtiter procedures. Dynatech Corp., Cambridge, Mass., USA.
- Forsgren A. 1969. Protein A from *Staphylococcus aureus*. VII. Production of protein A by bacterial and L-forms of *S. aureus*. Acta Path. Microbiol. Scand. 75: 481-490.
- Forsgren A. 1970. Significance of protein A production by staphylococci. Infect. Immun. 2: 672-673.
- Forsgren A. & Sjöquist J. 1966. "Protein A" from *S. aureus*. I. Pseudoinnate reaction with human γ -globulin. J. Immunol. 97: 822-827.
- Goudswaard J., Van der Donk J.A., Noordzij A., Van Dam R.H., Vaerman J.P. 1978. Protein A reactivity of various mammalian immunoglobulins. Scand. J. Immunol. 8: 21-28.
- Grov A., Myklestad B. & Oeding P. 1964. Immunochemical studies on antigen preparations from *Staphylococcus aureus*. I. Isolation and chemical characterization of antigen A. Acta Path. Microbiol. Scand. 61: 588-596.
- Hahn G. 1980. Identifizierung von Streptokokken verschiedener serologischer Gruppen unter Verwendung der Latex-Agglutination. Lab. Med. 4: 102-106.
- Hahn G. & Nyberg I. 1976. Identification of streptococcal groups A, B, C and G by slide co-agglutination of antibody-sensitized protein A-containing staphylococci. J. Clin. Microbiol. 4: 99-101.
- Jensen K. 1958. A normally occurring staphylococcus antibody in human serum. Acta Path. Microbiol. Scand. 44: 421-428.
- Jensen K. 1959. Undersögelser over staphylococcus antigenstruktur. Thesis, Munksgaard, Copenhagen.
- Jonsson S. & Kronwall G. 1974. The use of protein A-containing *Staphylococcus aureus* as a solid phase anti-IgG reagent in radioimmunoassay as exemplified in quantitation of α -feto-protein in normal human adult serum. Europ. J. Immunol. 4: 29-33.
- Kitzrow D., Brückler J. & Blobel H. 1979. Serologischer Nachweis der "Contagious Equine Metritis" (CEM)-Bakterien unter Verwendung Protein A-positiver Staphylokokken. Tierärztl. Umsch. 1: 32-36.
- Kroemer G., Blobel H. & Brückler J. 1977. Charakterisierung von Staphylokokken in Mikrotitrierplatten. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 237: 183-188.
- Kronvall G. 1973a. A rapid slide-agglutination method for typing pneumococci by means of specific antibody adsorbed to protein A-containing staphylococci. J. Med. Microbiol. 6: 187-189.
- Kronvall G. 1973b. A surface component of groups A, C and G streptococci with non-immune reactivity for immunoglobulin G. J. Immunol. 111: 1401-1406.
- Kronvall G. & Williams R. 1969. Differences in antiprotein A activity among IgG subgroups. Immunol. 103: 828-833.
- Lennette E.H., Balows A., Hausler W.J. & Truant J.P. (ed.). 1980. Manual of clinical microbiology. 3rd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Lima F.G.F. 1984. Fc-Rezeptoraktivität von Streptokokken für Immunoglobulin G von Mensch und Tier. Inaug.-Diss. Vet. Med., Universität Giessen.
- Movitz J. 1976. Formation of extracellular protein A by *Staphylococcus aureus*. Europ. J. Biochem. 68: 291-299.
- Müller E.E., Brückler J., Schaeg W. & Blobel H. 1973. Incidência e purificação da proteína A em culturas de *Staphylococcus aureus* isolados de bovinos. Pesq. Agropec. Bras., Sér. Vet., 8: 115-119.
- Müller H.-P., Schaeg W. & Blobel H. 1981. Protein A-Aktivität von *Staphylococcus hyicus* im Vergleich zu Protein A von *Staphylococcus aureus*. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 249: 443-451.
- Myhre E.B., Holmberg O. & Kronvall G. 1979. Immunoglobulinbinding structure on bovine group G streptococci different from type III Fc receptors on human group G streptococci. Infect. Immun. 23: 1-7.
- Myhre E.B. & Kronvall G. 1977. Heterogeneity of nonimmune immunoglobulin Fc reactivity among gram-positive cocci: description of three major types of receptors for human immunoglobulin G. Infect. Immun. 17: 475-482.
- Myhre E.B. & Kronvall G. 1980a. Demonstration of new type of immunoglobulin G receptor in *Streptococcus zooepidemicus* strains. Infect. Immun. 27: 808-816.
- Myhre E.B. & Kronvall G. 1980b. Binding of murine myeloma proteins of different IgG classes and subclasses to Fc-reactive surface structures in gram-positive cocci. Scand. J. Immunol. 11: 37-46.
- Myhre E.B. & Kronvall G. 1982. Immunoglobulin specificities of defined types of streptococci IgG receptors, p. 209-210. In: Holm S.E. & Christensen P. (ed.). Basic concept of streptococci and streptococcal diseases. Reedbooks, Fox Lane North, Chertsey, Surrey.
- Oeding P. & Haukenes G. 1963. Identification of *Staphylococcus aureus* antigens and antibodies by means of the gel precipitation technique. Acta Path. Microbiol. Scand. 57: 438-450.
- Phillips W.E., King R.E. & Kloos W.E. 1980. Isolation of *Staphylococcus hyicus* from a pig with septic polyarthritis. Am. J. Vet. Res. 41: 274-286.
- Schaeg W., Brückler J. & Blobel H. 1979. Verbessertes Verfahren zum Nachweis von Protein A bei *Staphylococcus aureus*. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 245: 442-449.
- Schalen C. 1980. The group A streptococcal receptor for human IgA binds IgA via the Fc-fragment. Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. C 88: 271-274.
- Takatsy G. 1956. The use of spiral loops in serological and virological micro-method. Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 3: 191.
- Winblad S. & Ericson C. 1973. Sensitized sheep red cells as a reactant for *Staphylococcus aureus* protein A. Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B 81: 150-156.