

INCIDÊNCIA E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA A EM CULTURAS DE *Staphylococcus aureus* ISOLADAS DE BOVINOS¹

ERNST ECHEHARDT MÜLLER², JÖRG BRÜCKLER³, WERNER SCHAEG⁴ e HANS BLOBEL⁵

SINOPSE.— Foram estudadas 345 culturas de *Staphylococcus aureus*, tipo cristal-violeta A, isoladas de bovinos com mastite, quanto à sua propriedade de produzir proteína A. Destas culturas, 341 (98,8%) se mostraram positivas no teste de hemaglutinação, 182 (52,7%) no teste de Ouchterlony e 180 (52,2%) na prova de precipitação em tubos capilares. Um extrato cru de proteína A obteve-se por extração com ácido fórmico e uma pré-purificação pelo tratamento deste extrato com fosfato de celulose. Proteína A, com um grau de pureza bastante elevado, conseguiu-se pela cromatografia de afinidade. Por focalização isoeletrica determinou-se um ponto isoeletrico ao redor de pH 4,4.

INTRODUÇÃO

As mastites causadas por *Staphylococcus aureus* nem sempre são combatidas com eficácia apesar do uso de modernos produtos terapêuticos. Isto se deve em parte à crescente resistência dos estafilococos frente a antibióticos. O combate eficaz destas infecções depende, cada vez mais, do exato conhecimento dos fatores de patogenidade destas bactérias, entre eles a proteína A.

Jensen (1958, 1959) descreveu um antígeno, contido em extratos obtidos de *S. aureus*, que foi precipitado em ágar-gel por todos os soros sanguíneos humanos examinados. Este antígeno foi posteriormente denominado de proteína A por Grov *et al.* (1964). Forsgren e Sjöquist (1966), Forsgren (1968) e Grov *et al.* (1970) constataram que a proteína A reagia com o soro sanguíneo humano e o soro de diversas espécies animais, ligando-se as partículas de Fc da imunoglobulina G (IgG). Marandon e Oeding (1967) demonstraram proteína A em 54 culturas de *S. aureus* das 120 examinadas. Forsgren (1970), usando um teste mais sensível, a hemaglutinação, examinou 700 culturas de *S. aureus* isoladas em seres humanos, achando 692 culturas positivas enquanto que das 100 culturas de *S. epidermidis* somente duas produziram proteína A.

Löfkvist e Sjöquist (1962) extraíram proteína A de *S. aureus* pela fervura. Os mesmos autores (1963) usaram posteriormente, para a extração, água destilada, enquanto que Yoshida *et al.* (1963) obtiveram um extrato de proteína A por digestão do *S. aureus* com dormase. Löfkvist e Sjöquist (1962, 1963) conseguiram uma purificação parcial da proteína A por precipitação ácida e posterior eletroforese. Yoshida *et al.* (1963) e Grov *et al.* (1964) purificaram a proteína A por cromatografia em coluna e gel-filtração com "Sephadex".

Quanto à patogenidade da proteína A, Gustafson *et al.* (1967) observaram em coelhos uma reação seme-

lhante à de Arthus, quando da injeção simultânea de proteína A e γ -globulinas. Em cobaias não imunizadas, Gustafson *et al.* (1968) produziram uma reação de hipersensibilidade cutânea com a injeção de proteína A. Martin *et al.* (1967) verificaram reações semelhantes no homem. Sjöquist e Stalenheim (1969), Kronvall e Frommel (1970) e Stalenheim (1971) observaram que a proteína A fixava o complemento de diversas espécies animais. Um estudo mais completo da literatura existente sobre a proteína A está contido na tese de doutoramento (Müller 1973).

Neste trabalho procurou-se verificar a incidência da proteína A em estafilococos isolados de bovinos e, ao mesmo tempo, isolar esta proteína com base na reação desta com as partículas de Fc da imunoglobulina G.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a verificação da incidência de proteína A foram utilizadas 345 culturas de estafilococos da coleção do Instituto de Bacteriologia e Imunologia da Justus Liebig-Universität, Giessen. Estas culturas, todas isoladas de bovinos, foram coagulase positivas (Meyer 1966), fermentaram o manitol (Elek 1950) e mostraram no ágar cristal-violeta a coloração característica do tipo A, bovino (Meyer 1967).

A proteína A foi testada qualitativamente pela ágar-gel-difusão (Ouchterlony 1948) e por precipitação em tubos capilares (Haukenes *et al.* 1961) com anti-soros ou soluções de γ -globulinas. Como teste quantitativo usou-se a hemaglutinação baseada no método de Forsgren (1970). Para este teste foram sensibilizados eritrócitos de ovino com um anti-soro de coelho contra eritrócitos de ovinos. Para o teste propriamente dito diluiu-se a proteína A até uma diluição final de 1:260.000, adicionando então a suspensão de eritrócitos sensibilizados. A atividade da proteína A foi expressa em unidades (U), sendo que 1 U estava contida na mais alta diluição de uma solução de proteína A que ainda apresentava uma hemaglutinação claramente visível. A atividade específica foi dada em U/mg proteína.

Fibrinolinsina foi testada de acordo com o método de Hentschel e Blobel (1968); hemotoxinas, segundo Gladstone (1966); a DNase, em meio com ácidos nucleicos (Baltimore Biological Laboratory, Baltimore, Maryland, USA); fosfatase, pelo método de Schaege *et al.* (1972); o fator gema de ovo, em um meio contendo 2% de ágar e 10% de emulsão de gema de ovo (Oxoid, Londres); o "Clumping Factor", pelo método de Duthie

¹ Aceito para publicação em 15 jun. 1973.

Este trabalho é, em parte, um resumo da tese de doutoramento do primeiro autor.

² Veterinário do Instituto de Bacteriologia e Imunologia da Justus Liebig-Universität (JLU), 63.000 Giessen, Schubertstr. 1, República Federal da Alemanha, e bolsista do "Deutscher Akademischer Austauschdienst".

³ Veterinário do Instituto de Bacteriologia e Imunologia da JLU.

⁴ Bioquímico do Instituto de Bacteriologia e Imunologia da JLU.

⁵ Veterinário e Diretor do Instituto de Bacteriologia e Imunologia da JLU.

(1955), e PV leucocidinas, conforme o método de Gladstone e Van Heningen (1957).

As cepas de *S. aureus* foram cultivadas em frascos de Erlenmeyer contendo 100 ml de "Caseinpepton Sojamehlpepton-Bouillon" (E. Merck AG, Darmstadt) ou em um fermentador ("Laborfermenter", Eschweiler, Kiel) contendo 15 l de meio de cultura. O cultivo se deu por 18 horas a 37°C. Após o cultivo as bactérias foram lavadas 3 vezes em solução salina estéril (0,14 M) e posteriormente liofilizadas. As condições ótimas de cultivo foram determinadas no fermentador levando em consideração o pH, a densidade ótica (620 nm), número de bactérias com capacidade de reprodução (determinado pelo sistema de contagem em placa de cultura) e a produção de proteína A. Para a tomada destes dados foram coletadas provas durante as diversas fases de incubação.

Para a extração da proteína A foram usados os seguintes métodos: 1) para o exame da ocorrência de proteína A nas diversas culturas de *S. aureus*, utilizou-se um extrato obtido por fervura das bactérias por 1 hora e posterior precipitação com HCl (Jensen 1958, 1959); 2) para o isolamento de proteína A usou-se a cepa *S. aureus* K 807. Estas bactérias foram tratadas com ácido fórmico p. a. (9,8% a 100%) baseado no método de Brückler *et al.* (1973), que utilizaram esta forma de extração para o isolamento do "Clumping Factor". Após o tratamento com ácido fórmico, o sobrenadante obtido foi precipitado com acetona, e este precipitado, por sua vez, ressuspenso em solução salina (0,14M).

Para uma pré-purificação, este extrato foi tratado com fosfato de celulose (Whatman Biochemicals Ltd., Londres) por 30 min. e depois filtrado. Para 140 ml de extrato foram utilizados 3 g de fosfato de celulose. O filtrado foi utilizado para a posterior purificação da proteína A enquanto que do fosfato de celulose isolou-se o "Clumping Factor".

Para a purificação da proteína A utilizou-se um método de cromatografia por afinidade com "Sephrose" 4 B (Pharmacia, Uppsala, Suécia). Esta "Sephrose" foi ativada com cianeto de bromo (Schuchard, München) e posteriormente conjugada com γ -globulina de soro humano (Cohn Fract. II). O método de ativação e sensibilização da "Sephrose" foi descrito por Cuatrecasas e Anfinsen (1971). Para 20 ml de "Sephrose" foi utilizado 1 g de γ -globulina. A "Sephrose" sensibilizada foi introduzida em uma coluna de cromatografia e o extrato de proteína A passado passivamente por esta coluna. Finda a absorção separou-se a proteína A da "Sephrose" com ácido acético 0,1 N, coletando frações de 4 ml.

Anti-soros foram obtidos de coelhos pelo método de Kretschmar (1967). Para a determinação quantitativa de proteínas foi utilizado o método da biureta segundo Beisenherz *et al.* (1953). A eletroforese vertical em poliacrilamida-gel, para proteínas com ponto isoelétrico ácido, foi efetuada de acordo com o método de Davis (1964) e Schmitt (1968) e a eletroforese para proteínas com ponto isoelétrico alcalino de acordo com Reisfeld *et al.* (1962). Para a imunoeletroforese utilizou-se uma solução tamponada de veronal (pH 8,6) e "special agar Noble" a 1%. Aplicadas as soluções de proteína A a serem testadas, realizou-se a separação eletroforética por 3 horas a 250 V e 4°C. Para a imunoprecipitação foram usados anti-soros, soro humano e soluções de γ -globulina. As reações foram interpretadas 48 horas após e fotografadas. A focalização isoelétrica efetuou-se de acordo com o método modificado por Schaeg *et al.* (1972).

RESULTADOS

Das 345 culturas de *S. aureus* examinadas quanto à sua propriedade de produzir proteína A, 341 (98,8%) mostraram-se positivas no teste de hemaglutinação com diferentes títulos finais (Fig. 1), 182 (52,7%) no teste de Ouchterlony e 180 (52,2%) na prova de precipitação em tubos capilares.

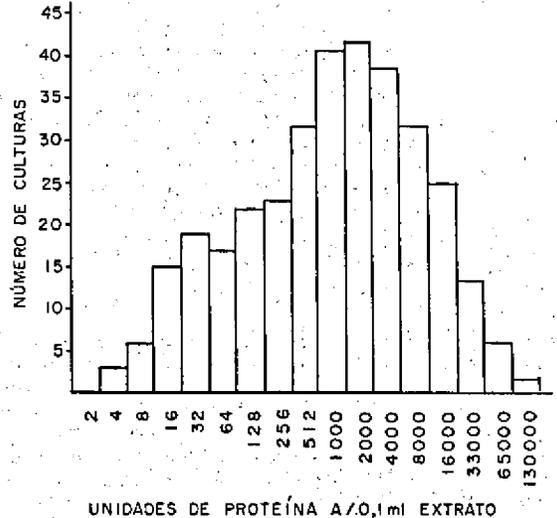


Fig. 1. Títulos finais de proteína A, expressos em unidades, das 345 culturas de *Staphylococcus aureus* examinadas no teste de hemaglutinação.

A cepa *S. aureus* K 807 utilizada para a produção de proteína A produziu "Clumping Factor", coagulase, α e β hemotoxinas, fosfatase e nuclease mas não fibrinolinsina, PV-leucocidina e fator gema de ovo. As condições ótimas de cultivo para a produção de proteína A no fermentador foram obtidas após uma incubação de 18 horas a 37°C (Fig. 2). O extrato desta cepa obtido por ácido fórmico continha 8.000 U de proteína A/0,1 ml = 54.000 U/mg proteína. Pelo tratamento deste extrato de proteína A com fosfato de celulose obteve-se uma considerável pré-purificação, já que 60% das proteínas contidas no extrato, principalmente proteínas alcalinas, foram absorvidas pelo fosfato de celu-

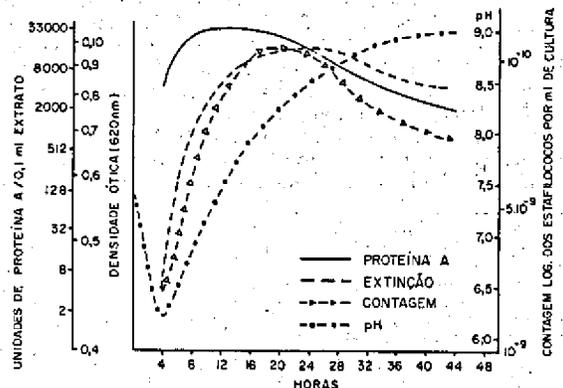


Fig. 2. Crescimento, densidade ótica, pH e produção de proteína A da cepa *Staphylococcus aureus* K 807 no fermentador a 37°C.

lose. A proteína A, uma proteína ácida, não foi absorvida apresentando agora uma atividade de 8.000 U/0,1 ml de extrato = 160.000 U/mg proteína.

Um grau de pureza bastante elevado obteve-se pela cromatografia de afinidade. Toda a proteína A contida no extrato foi absorvida pela "Sepharose" conjugada com γ -globulina, já que após a passagem pela "Sepharose" o extrato não apresentou mais atividade alguma no teste de hemaglutinação. Com ácido acético 0,1 N foi possível romper a ligação da proteína A às γ -globulinas conjugadas à "Sepharose". A proteína A foi reencontrada na 2.^a, 3.^a e 4.^a fração coletada com uma atividade de $2 \cdot 10^{10}$ U/0,1 ml = $3 \cdot 10^{11}$ U/mg proteína. A densidade ótica das frações coletadas foi medida a 280 nm, sendo que a extinção máxima medida correspondeu à atividade máxima da proteína A (Fig. 3). Nesta solução de proteína A não havia mais "Clumping Factor", coagulase, α e β hemotoxinas, fosfatase e nuclease.

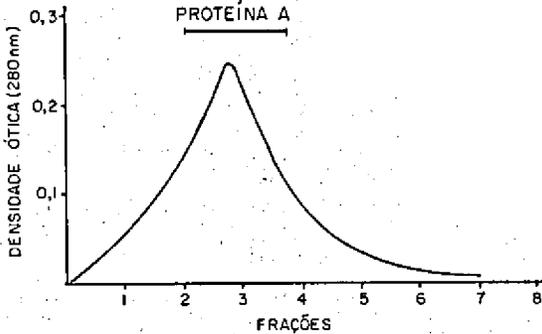


FIG. 3. Cromatografia de afinidade da proteína A.

A proteína A obtida por cromatografia de afinidade mostrou na eletroforese vertical em poliácridamida-gel para proteínas ácidas 2 bandas de proteína e na eletroforese para proteínas básicas 1 banda difusa (Fig. 4). Nesta mesma figura podem ser observadas igualmente as fases de purificação anteriores à cromatografia de afinidade.



FIG. 4. Eletroforese vertical em poliácridamida-gel do extrato de proteína A obtido com ácido fórmico (a, b), extrato tratado com fosfato de celulose (c, d) e proteína A após a cromatografia de afinidade (e, f). I. Eletroforese para proteínas ácidas (- \rightarrow +). II. Eletroforese para proteínas básicas (+ \rightarrow -).

No teste de Ouchterlony a proteína A purificada produziu somente 1 linha de precipitação com os anti-soros contra as cepas de *S. aureus* K 807 e Cowan I, 1 linha com soro sanguíneo humano e 1 linha com γ -globulina de soro humano (Fig. 5).

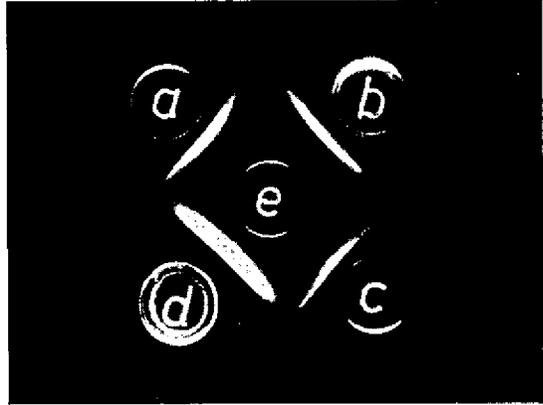


FIG. 5. Proteína A no teste de Ouchterlony: a) Anti-soro contra o *Staphylococcus aureus* K 807; b) γ -globulina de soro humano; c) anti-soro contra o *Staphylococcus aureus* Cowan I; d) soro humano; e) proteína A.

Na imunoeletroforese a proteína A formou 2 linhas de precipitação com o anti-soro contra o *S. aureus* K 807, 3 contra o *S. aureus* Cowan I, 1 linha com soro humano e 1 com γ -globulina extraída de soro humano (Fig. 6).

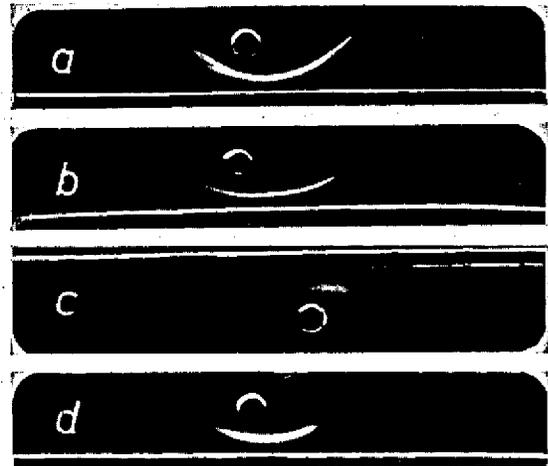


FIG. 6. Imunoeletroforese da proteína A com anti-soro contra o *Staphylococcus aureus* K 807 (a), com anti-soro contra o *Staphylococcus aureus* Cowan I (b), com soro humano (c) e com γ -globulina de soro humano (e).

Através da focalização isoeletrica foi possível determinar um ponto isoeletrico entre o pI 4,25 e 4,65 (Fig. 7).

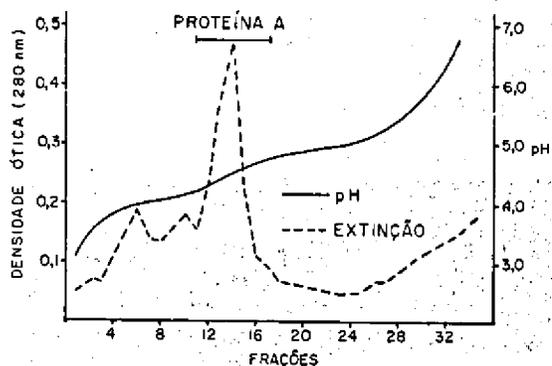


Fig. 7. A focalização isoclétrica da proteína A obtida por cromatografia de afinidade.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Nos testes de hemaglutinação verificou-se que 98,8% das culturas de *S. aureus*, tipo A bovino, produziram proteína A, o que nos levou a concluir que a proteína A é formada por quase todos os estafilococos patogênicos de bovinos. A resultados idênticos chegaram Oeding e Haukenes (1963) e Forsgren (1970) sobre a incidência da proteína A em estafilococos patogênicos isolados do homem. A extração da proteína A com ácido fórmico mostrou-se bastante vantajosa, pois permitiu isolar deste mesmo extrato em um projeto paralelo a este, o "Clumping Factor". O tratamento deste extrato cru de proteína A com fosfato de celulose resultou em uma pré-purificação acentuada, já que 60% das proteínas alcalinas foram absorvidas pelo fosfato de celulose. A cromatografia de afinidade, como método de purificação para a proteína A, apresentou uma grande simplificação metodológica em relação aos tradicionais métodos de purificação com "Sephadex" G 100 ou G 150 (Forsgren & Sjöquist 1966, 1969). A razão de não termos obtido uma proteína A altamente purificada, acreditamos estar no fato de que usamos para a cromatografia de afinidade γ -globulina de soro sanguíneo humano (Cohn-Fract. II) e não IgG puro. Estas nossas suspeitas foram confirmadas por um trabalho de Hjelm *et al.* (1972), publicado após o término da parte experimental deste trabalho. Estes autores utilizaram para a cromatografia de afinidade IgG e obtiveram uma proteína A com alto grau de pureza.

AGRADECIMENTOS

Queremos registrar os nossos agradecimentos a "Deutsche Forschungsgemeinschaft" e ao "Deutscher Akademischer Austauschdienst" pelo apoio financeiro dado para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

Beisenherz, G., Boltze, H. J., Bücher, T., Czok, R., Garbade, H., Meyer-Arendt, E. & Pfeleiderer, G. 1953. Di-Phosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceralddehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang. Z. Naturf. 8B:555-577.

Brückler, J., Schaeg, W. & Blobel, H. 1973. Clumping - Factor von *Staphylococcus aureus*. (Dados ainda não publicados)

Cuatrecasas, P. & Anfinsen, C.B. 1971. Affinity Chromatography. Ann. Rev. Biochem. 40:259-278.

Davis, B.J. 1964. Disk-electrophoresis. II. Method and application in human serum proteins. Ann. N.Y. Acad. Sci. 121: 404-427.

Duthie, E.S. 1955. The action of fibrinogen on certain pathogenic cocci. J. gen. Microbiol. 13:385-393.

Elek, S.D. 1950. Distribution of haemolysis in pathogenic staphylococci. J. Path. Bact. 62:541-554.

Forsgren, A. 1968. Protein A from *Staphylococcus aureus*. VI. Reaction with subunits from guinea pig γ - and γ -globulin. J. Immun. 100:927-930.

Forsgren, A. 1970. Significance of protein A production by staphylococci. Infect. Immunity 2:672-673.

Forsgren, A. & Sjöquist, J. 1966. "Protein A" from *S. aureus*. Pseudo-immune reaction with human γ -globulin. J. Immun. 97:822-827.

Forsgren, A. & Sjöquist, J. 1969. Protein A from *Staphylococcus aureus*. VII. Physicochemical and immunological characterization. Acta path. microbiol. scand. 75:466-480.

Gladstone, G.P. 1966. Staphylococcal haemolysins. Postepy Mikrobiologii t. v. 2:145-161.

Gladstone, G.P. & Van Heyningen, N.E. 1957. Staphylococcal leucocidins. Br. J. exp. Path. 33:123-137.

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.

Grov, A., Oeding, P., Myklestad, B. & Aasen, J. 1970. Reactions of staphylococcal antigens with normal sera, γ G-globulins and γ G-globulin fragments of various species origin. Acta path. microbiol. scand. 78B:106-111.

Gustafson, G.T., Sjöquist, J. & Stalenheim, G. 1967. "Protein A" from *Staphylococcus aureus*. II. Arthus-like reaction produced in rabbits by interaction of protein A and human γ -globulin. J. Immun. 98:1178-1181.

Gustafson, G.T., Stalenheim, G., Forsgren, A. & Sjöquist, J. 1968. "Protein A" from *Staphylococcus aureus*. IV. Production of anaphylaxis-like cutaneous and systemic reactions in nonimmunized guinea-pigs. J. Immun. 100:530-534.

Haukenes, G., Losnegard, N. & Oeding, P. 1961. Extraction and fractionation of antigenic material from *Staphylococcus aureus*. Acta path. microbiol. scand. 53:84-94.

Hentschel, G. & Blobel, H. 1968. Untersuchung über Staphylokokken-Fibrinolysin. Zentbl. Bakt. ParasitKde I. 206:193-201.

Hjelm, H., Hjelm, K. & Sjöquist, J. 1972. Protein A from *Staphylococcus aureus*. Its isolation by affinity chromatography and its use as an immunosorbent for isolation of immunoglobulins. Febs Letters 28:73-76.

Jensen, K. 1958. A normally occurring staphylococcus antibody in human serum. Acta path. microbiol. scand. 44:421-428.

Jensen, K. 1959. Undersøgelse over staphylococcerens antigenstruktur. Thesis, Munksgaard, Copenhagen.

Kretschmar, W. 1967. Die modifizierte Technik der Staphylokokken-Agglutination. Zentbl. Bakt. ParasitKde I. 204:323-334.

Kronvall, G. & Frommel, D. 1970. Definition of staphylococcal protein A reactivity for human immunoglobulin G fragments. Immunochemistry 7:124-127.

Löfkvist, T. & Sjöquist, J. 1962. Chemical and serological analysis of antigen preparations from *Staphylococcus aureus*. A comparison between the products obtained by Verwey's and Jensen's techniques. Acta path. microbiol. scand. 56:295-304.

Löfkvist, T. & Sjöquist, J. 1963. Purification of staphylococcal antigens, with special reference to antigen A (Jensen). Int. Archs. Allergy 23:289-305.

Marandon, J.L. & Oeding, P. 1967. Investigations on animal *Staphylococcus aureus* strains. 2 antigens. Acta path. microbiol. scand. 70:300-304.

Martin, R.R., Crowder, J.G. & White, A. 1967. Human reactions to staphylococcal antigens. A possible role of leukocyte lysosomal enzymes. J. Immun. 99:269-275.

Meyer, W. 1966. Über die Brauchbarkeit des Koagulasetestes mit verschiedenen Plasmaarten zur Differenzierung von *Staphylococcus aureus*-Stämmen. Zentbl. Bakt. ParasitKde I. 201: 465-481.

Meyer, W. 1967. Über die Brauchbarkeit des Kristallviolett-Testes zur Differenzierung von *Staphylococcus aureus*-Stämmen. Z. med. Mikrobiol. Immun. 153:158-168.

Oeding, P. & Haukenes, G. 1963. Identification of *Staphylococcus aureus* antigens and antibodies by means of the gel precipitation technique. Acta pathol. microbiol. scand. 57:438-450.

Ouchterlony, Ö. 1948. Antigen-antibody reactions in gels. Ark. Kemi. Mineral. Geol. 26B, No.14:1-9.

- Reisfeld, R.A., Lewis, U.J. & Williams, D.E. 1962. Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. *Nature* 195:281-283.
- Schaeg, W., Bingöl, R. & Blobel, H. 1972. Purification of penicillinase (β -lactamase) and acid phosphatase from *Staphylococcus aureus* in one procedure. *Biochim. biophys. Acta* 268: 542-549.
- Schmitt, J. 1968. Das Differenzieren tierischer Proteine mit der vertikalen Polyacrylamidgel-Elektrophorese. 1. Mitteilung, Grundlagen, Methodik, Serumproteine des Rindes. *Dt. tierärztl. Wschr.* 75:87-91.
- Sjöquist, J. & Stalenheim, G. 1969. Protein A from *Staphylococcus aureus*. IX. Complement-fixing activity of protein A-IgG complexes. *J. Immun.* 103:467-473.
- Stalenheim, G. 1971. Protein A from *Staphylococcus aureus*. XI. Fixation of human complement and of complement from guinea pig and rabbit. *Acta path. microbiol. scand.* 79B:665-672.
- Yoshida, A., Mudd, S. & Lenhart, W.A. 1963. The common protein agglutinin of *Staphylococcus aureus*. II. Purification, chemical characterization, and serologic comparison with Jensen's antigen. *J. Immun.* 91:777-782.

ABSTRACT.- Müller, E.E.; Brückler, J.; Schaeg, W.; Blobel, H. [*Production and purification of protein A in cultures of Staphylococcus aureus from cattle.*]. Incidência e purificação da proteína A em culturas de *Staphylococcus aureus* isoladas de bovinos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Veterinária* (1973) 8, 115-119 [Pt, en] *Inst. Bakt. Immunol., Univ. Giessen, Schubertstr. 1, Fed. Repub. Germany.*

Of 345 cultures of *Staphylococcus aureus*, crystal-violettyp A, from cattle, 341 (98.8%) were protein A-positive in the hemagglutination test, 182 (52.7%) in the Ouchterlony double immune diffusion test and 180 (52.2%) in the precipitin ring test. Protein A was produced by growing the staphylococci for 18 hours at 37°C in fermenters with respectively 15 l caseine-peptone broth. The staphylococci were sedimented by continuous-flow centrifugation at 73,700 x g, washed repeatedly in sterile 0.14M NaCl and extracted with formic acid to obtain protein A. Partial purification of protein A in the formic acid extract could be achieved by absorbing basic proteins without protein A-activity onto cellulose phosphate and subsequent affinity-chromatography with human γ -globuline, fraction II of Cohn. The final product had an isoelectric point at about pH 4.4, as shown by isoelectric focussing.