

IGA1 PROTEASES — OCORRÊNCIA EM AGENTES ETIOLÓGICOS DE MENINGITE

Ilka Maria LANDGRAF *
Maria das Graças Adelino ALKMIN **
Sônia França Correia BARBOSA **

RIALA 07/834

LANDGRAF, I.M.; ALKMIN, M.G.A. & BARBOSA, S.F.C. — IgA1 proteases — Ocorrência em agentes etiológicos de meningite. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 57 (2): 27-30, 1998.

RESUMO: Dentre os fatores de virulência em bactérias investigados na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, tem sido avaliada a ocorrência de proteases à imunoglobulina A (IgA1 proteases) em agentes etiológicos de meningite. Estas enzimas extracelulares são produzidas por diferentes patógenos de mucosa, incluindo os três principais agentes das meningites bacterianas: *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae*. IgA1 proteases foram detectadas por imunoelektroforese em 28 de 39 cepas estudadas, bactérias e leveduras. Com exceção de 7 bactérias obtidas de coleção de cultura, todos os microrganismos foram isolados de líquido cefalorraquidiano. Nos três agentes etiológicos mais frequentes de meningite foi observada a presença de IgA1 proteases, como também em quatro outras bactérias, das quais duas de coleção, e não citadas na literatura como produtoras destas enzimas.

DESCRITORES: IgA1 proteases, meningite, fatores de virulência.

INTRODUÇÃO

Muitas bactérias podem produzir uma infecção meníngea, sendo mais prevalentes *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae* ⁷.

Estes agentes atuam por vários mecanismos de virulência, sendo que a produção de IgA1 proteases tem sido bastante estudada ^{4,12,14}.

As IgA1 proteases são enzimas extracelulares que clivam a imunoglobulina A1 na região da dobradiça da cadeia pesada, liberando fragmentos intactos de Fab e Fc. Esta clivagem ocorre na subclasse IgA1 do soro, mas não na subclasse IgA2 ⁵. A IgA secretora (IgAs) é a principal defesa humoral da superfície da mucosa e raramente suscetível à digestão por IgA1 proteases. A não suscetibilidade relativa pode ser explicada pela presença de uma maior proporção de IgA2 na IgA secretora do que na IgA do soro ¹². Foi observado por imunoelektroforese que os fragmentos Fab e Fc liberados pela ação de proteases diferem conforme o substrato. A clivagem de

IgA1 por estas enzimas resulta numa considerável perda da atividade do anticorpo, representando, desta forma, um importante fator de virulência ^{5,9}.

A presença de IgA1 proteases foi demonstrada em líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com infecção meníngea por *N. meningitidis*, *H. influenzae* e *S. pneumoniae* ¹²; em líquido pleural ⁶; na saliva humana, atividade enzimática esta semelhante à observada no *Streptococcus sanguis* isolado de saliva ¹³; em suspensões de placa dentária de humanos ¹³; no lavado vaginal de mulheres com infecção por *N. gonorrhoeae* ¹; em sobrenadante, livre de células, das fezes de pessoas sãs ¹¹.

Espécies bacterianas que possuem esta atividade estão associadas a grupos distintos de doenças infecciosas e não são mutuamente relacionadas por critérios taxonômicos. Elas incluem os três agentes etiológicos principais de meningites bacterianas, e outras como *H. aegyptius* (Febre Purpúrica Brasileira e conjuntivite epidêmica), *N. gonorrhoeae* (gonorréia), bactérias envolvidas em doença periodontal destrutiva, e algumas que também atacam ou têm as membranas mucosas como

* Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

porta de entrada (*Porphiromonas*, *Capnocytophaga*, *Gemella*, *Ureaplasma*)^{4,10,12}.

A incapacidade de causar a degradação proteolítica da IgA1 humana foi observada em algumas espécies comensais de *Neisseria* (*cinerea*, *flava*, *flavescens*, *perflava*, *subflava*, *lactamica*, *mucosa*, *sicca*), de espécies de *Haemophilus*, algumas delas de baixo poder patogênico (*aphrophilus*, *ducrey*, *haemoliticus*, *parainfluenzae*, *parahaemolyticus*, *segnis*), de cepas de *E. coli* (sorotipos: O1:K1:H7, O2:H5:, O2:K2ac:H1, O4:K12:H5, O6:K13:H1, O18ac:K1, O83:K1, O112ac:H46), *Klebsiella* (*pneumoniae*, *aerogenes*, *oxitoca*), *Salmonella* (*enteritidis*, *typhi*, *typhimurium*), *Shigella* (*boydii*, *dysenteriae*, *flexneri*, *sonnei*), *Proteus* (*mirabilis*), *Staphylococcus* (*aureus*, *epidermidis*) e *Streptococcus* (*acidominimus*, *agalactiae*, *anginosus*, *bovis*, *milleri*, *mitis*, *mutans*, *pyogenes*, *uberis*) *Listeria* (*monocytogenes*)^{3,4,8,12}. Segundo Kilian³, apenas algumas cepas de *S. mitis*, *S. sanguis*, *H. parahaemolyticus*, *H. parainfluenzae* podem produzir IgA1 protease². Em outros microrganismos como fungos ou leveduras, protozoários e vírus também não tem sido detectada a presença da enzima IgA1 protease⁴.

O objetivo deste trabalho é comprovar a presença de enzimas IgA1 proteases em agentes de meningite, pois estas enzimas, além de serem consideradas um fator de virulência em algumas bactérias patogênicas, podem ter uma potente aplicabilidade em vacinas^{2,8}.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Microrganismos

Foram investigadas, por imunoeletroforese¹⁰, 36 cepas de bactérias (*Haemophilus influenzae* -14, *Neisseria meningitidis* -5, *Streptococcus pneumoniae* -3, *Acinetobacter calcoaceticus* — 1, *Enterobacter cloacae* — 1, *Klebsiella pneumoniae* -1, *Proteus mirabilis* -2, *Listeria monocytogenes* — 2) e 3 de leveduras (*Candida albicans* — 2 e *Cryptococcus neoformans* — 1), todas isoladas de líquido cefalorraquidiano de pacientes com meningite. Obtidas de coleção de cultura foram estudadas também as cepas bacterianas: *Shigella flexneri* — 1, *Shigella sonnei* — 1, *H. parainfluenzae* — 1, *Streptococcus mitis* — 1, *Staphylococcus aureus* — 1, *Citrobacter freundii* -1 e *Providencia stuartii* — 1.

2. Imunoglobulina e anti-soro

A IgA foi obtida de soro de pacientes com mieloma de IgA e também de colostro, e ambos submetidos à purificação em cromatografia de coluna de jacalina¹⁶. O soro apresentou uma concentração de 7,5 mg/mL de IgA1

purificada. Coelhos foram imunizados segundo metodologia descrita¹⁰ para produção do soro anti-IgA1. Além deste anti-soro, nas reações foi utilizado também um soro anti-IgA1 de procedência Sigma (Anti-Human IgA-alfachain specific, n. I-9506), como controle.

3. Ensaio de IgA1 proteases

A metodologia empregada para pesquisar a presença da IgA1 proteases foi baseada na descrita por Mestecky & Kilian¹⁰.

Inóculos abundantes obtidos através de uma alça bacteriológica bem carregada de culturas recentes (18-24 horas) das cepas em estudo, foram acrescentados em 40mL de IgA1 purificado e incubados a 37°C por 18-24 horas. O conjunto IgA1 e cultura foi a seguir centrifugado a 2.000 rpm (rotações por minuto), durante 10 minutos e o sobrenadante mantido a -20°C até o momento do teste. A imunoeletroforese foi realizada, a seguir, a fim de se caracterizar a digestão da IgA1 nas frações Fab e Fc, empregando-se anti-soro de coelho anti-IgA não absorvido e o soro anti-IgA comercial.

RESULTADOS

Na Tabela 1 estão apresentadas as bactérias e leveduras nas quais a presença ou ausência de enzimas IgA1 proteases foi observada.

TABELA 1
Positividade de IgA1 proteases em
39 microrganismos estudados

Microrganismos	Origem	Nº Estudado	Nº Positivo (%)
<i>Haemophilus influenzae</i>	LCR ¹	14	14 (100)
<i>Neisseria meningitidis</i>	LCR	5	5 (100)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	LCR	3	3 (100)
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	LCR	1	1 (100)
<i>Enterobacter cloacae</i>	LCR	1	1 (100)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	LCR	1	0 (0)
<i>Proteus mirabilis</i>	LCR	2	2 (100)
<i>Listeria monocytogenes</i>	LCR	2	0 (0)

TABELA 1 (continuação)
Positividade de IgA1 proteases em
39 microrganismos estudados

Microrganismos	Origem	Nº Estudado	Nº Positivo (%)
<i>Shigella flexneri</i>	Fezes	1	1 (100)
<i>Shigella sonnei</i>	Fezes	1	1 (100)
<i>H. parainfluenzae</i>	Oro-faringe	1	0 (0)
<i>Streptococcus mitis</i>	Placa dentária	1	0 (0)
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538P	1	0 (0)
<i>Citrobacter freundii</i>	Fezes	1	0 (0)
<i>Providencia stuartii</i>	Fezes	1	0 (0)
<i>Candida albicans</i>	LCR	2	0 (0)
<i>Cryptococcus neoformans</i>	LCR	1	0 (0)
TOTAL		39	28 (72)

¹ LCR = Líquido cefalorraquidiano

DISCUSSÃO

O sistema imune de mucosa desempenha um papel importante como barreira da extensa área superficial dos tratos respiratório, gastrointestinal e geniturinário ($.400m^2$). Por outro lado, a imunoglobulina A (IgA), o principal isótipo das mucosas e secreções, é superior aos outros isótipos de imunoglobulinas na proteção contra vírus e patógenos de mucosas. Portanto, a IgA secretora (IgAs) é o principal mediador de imunidade específica das superfícies de mucosa humana ⁵.

Seres humanos, chimpanzés e gorilas expressam duas subclasses de IgA, ou seja, IgA1 e IgA2. A IgA1 é protegida contra enzimas proteolíticas por possuir, na região da dobradiça da cadeia pesada, uma seqüência dupla incomum de 13 aminoácidos, prolinas serinas e treoleínas, e por apresentar uma glicosilação de resíduos de serina. Contudo, um número de importantes patógenos bacterianos de mucosa e membros bem sucedidos da flora comensal humana, mas que podem estar associados com distúrbios patológicos, desenvolveram proteases extremamente específicas que clivam a IgA1 humana ⁵.

Tanto a IgA sérica obtida de soro de paciente com mieloma, como a IgA secretora de colostro foram utilizadas como substrato. A análise qualitativa do colostro para a presença de subclasses de IgA1 e IgA2 pelo teste de suscetibilidade à clivagem por IgA1 proteases revelou

que a IgA obtida de colostro não foi clivada. Além de possuir IgA1 em quantidades menores do que IgA2, o colostro contém anticorpos neutralizantes à maioria das IgA1 proteases bacterianas. Consequentemente, IgAs purificadas de colostro humano é resistente à maioria das IgA1 proteases, a menos que seja acrescentada em quantidades excessivas ⁵.

Nossos resultados foram compatíveis com os de outros autores quanto aos agentes mais frequentes das meningites bacterianas, *N. meningitidis*, *H. influenzae*, e *S. pneumoniae*. Com relação a outros agentes desta infecção, alguns apresentaram enzimas IgA1 proteases, embora na literatura tenham sido citados como não produtores destas enzimas, como *Proteus mirabilis*¹⁰. Outras bactérias de coleção, como *Shigella flexneri* e *S. sonnei*, também não citadas na literatura como apresentando estas enzimas ^{4,10,12}, foram positivas em nosso trabalho. Atribuímos estes resultados divergentes a uma concentração maior de inóculo, pois em alguns ensaios duplicados da mesma bactéria, resultados diferentes foram obtidos, como ocorreu ao se testar cepas de *S. pneumoniae*. Colônias de *S. pneumoniae*, como de outros estreptococos, são muito pequenas e se não for conseguido uma alçada bem carregada de inóculo, o resultado pode ser negativo. Alguns autores observaram que em *S. mitis* e *S. sanguis*, e em *H. parainfluenzae* apenas algumas cepas desenvolvem esta enzima ⁵.

De acordo com Lomholt ⁸, a IgA1 se constitui em um antígeno comum e merece avaliação futura para uma possível aplicação em vacinas a fim de prevenir doenças causadas pelo microrganismo produtor da enzima. Este mesmo autor afirma que ainda existe muito para ser aprendido sobre a função molecular das IgA1 proteases bacterianas e o papel que elas desempenham durante a colonização e infecção.

A presença de IgA1 proteases poderá ajudar a entender propriedades do hospedeiro e do microrganismo. Estas propriedades, quando combinadas formam a base para infecção, e esta informação tem importância clínica e pode contribuir no controle da doença ¹⁵.

Tendo em conta que estas enzimas são elaboradas somente por bactérias e não por outros microrganismos, em estudos futuros será analisada a presença destas enzimas em fluidos biológicos, como o líquido cefalorraquidiano, visando reduzir a grande porcentagem de meningites definidas como indeterminadas, quando pelas técnicas de identificação atualmente em desenvolvimento, não se detecta um agente bacteriano, principalmente devido ao uso prévio de antibióticos que muitas vezes inviabilizam o diagnóstico laboratorial da infecção.

LANDGRAF, I.M.; ALKMIN, M.G.A. & BARBOSA, S.F.C. — IgA1 Proteases — Occurrence in Meningitis Etiological Agents. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 57(2):27-30, 1998.

ABSTRACT: Among virulence factors in bacteria investigated in the Seção de Bacteriologia of the Instituto Adolfo Lutz, the occurrence of immunoglobulin A proteases (IgA 1 proteases) has been evaluated. These extracellular enzymes are produced by different mucosal pathogens, including the three major agents of bacterial meningitis: *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*. IgA1 proteases were detected by immunoelectrophoresis in 28 of 39 strains studied, bacteria and yeasts. Except for 7 bacteria from collection, all organisms were isolated from cerebrospinal fluid. In the three most frequent etiological agents of meningitis, IgA1 proteases were observed, as well as in four other bacteria, two of which from collection, and not cited in the literature as enzyme producers.

DESCRIPTORS: IgA1 proteases, meningitis, virulence factors.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. BLAKE, M.; HOLMES, K.K. & SWANSON, J. — Studies on gonococcus infection. XVII. IgA1-cleaving protease in vaginal washings from women with gonorrhoea. *J. Inf. Dis.* **139**: 89-92, 1979.
2. KILIAN, M.; MESTECKY, J. & SCHROHENLOHER, R.E. — Pathogenic species of the genus *Haemophilus* and *Streptococcus pneumoniae* produce immunoglobuline A1 protease. *Infect. immunol.*, **26(1)**: 143-149, 1979.
3. KILIAN, M., THOMSEN, B., PETERSEN, T.E. & BLEEG, H. — Molecular biology of *Haemophilus influenzae* IgA1 proteases. *Mol. Immunol.*, **20**: 1051-1058, 1983.
4. KILIAN, M., THOMSEN, B., PETERSEN, T.E. & BLEEG, H. — Occurrence and nature of bacterial IgA proteases. *Ann. New York Acad. Sc.*, **409**: 612-624, 1983.
5. KILIAN, M.; REINHOLDT, J.; LOMHOLT, H.; POULSEN, K. & FRANDBSEN, E.V.G. - Biological significance of IgA1 proteases in bacterial colonization and pathogenesis: critical evaluation of experimental evidence. *APMIS*, **104**: 321-338, 1996.
6. INSEL, R.A.; ALLEN, P.Z & BERKOWITZ, I.D. — Types and frequency of *Haemophilus influenzae* IgA1 proteases. In: Seminars in infectious Diseases, vol. 4, Weinstein, L & Fields, B.N., eds., Grune & Stratton, New York, 1982, p. 225.
7. LANDGRAF, I.M. & VIEIRA, M.F.P. — Biotypes and serotypes of *Haemophilus influenzae* from patients with meningitis in the City of São Paulo, Brazil. *J. clin. Microbiol.*, **31**: 743-745, 1993.
8. LOMHOLT, H. — Molecular biology and vaccine aspects of bacterial immunoglobulin A1 proteases. *APMIS Suppl.* **62**, **1104**: 5-28, 1996.
9. MANSA, B. & KILIAN, M. — Retained antigen-binding activity of Fab fragments of human monoclonal immunoglobulin A1 (IgA 1) cleaved by IgA1 protease. *Infect. Immunol.* **52**:171-174, 1986.
10. MESTECKY, J. & KILIAN, M. — Immunoglobulin A (IgA) . *Methods in Enzymology*, **116**:37-75, 1985.
11. MEHTA, S.K.; PLAUT, A.G.; CALVANICO, N.J. & TOMASI, Jr, T.H. — Human immunoglobuline A: production of an Fc fragment by an enteric microbial proteolytic enzyme. *J. Immunol.* **111**: 1274, 1973.
12. MULKS, M.H. — Microbial IgA proteases. In: Microbial Enzymes and Virulence. Holder, I.A., ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1985, p. 81-104.
13. PLAUT, A.G.; GENCO, R.J. & TOMASI, Jr, T.B. — Isolation of an enzyme from *Streptococcus sanguis* which specifically cleaves IgA. *J. Immunol.* **113**: 289-291, 1974.
14. PLAUT, A.G. — Microbial IgA proteases. *N. Engl. J. Med.* **298**: 1459-1463, 1978.
15. PLAUT, A.G. — The IgA1 proteases of pathogenic bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **37**: 603-622, 1983.
16. SKEA, D.L.; CHRISTOPOULOUS, P.; PLAUT, A.G. & UNDERDOWN, B.J. — Studies on the specificity of the IgA-binding lectin, Jacalin. *Mol. Immunol.* **25** (1): 1- 6, 1988

Recebido para publicação em 30/12/97