

Importância da resistência osmótica na estabilidade do antígeno celular de *Mycoplasma mycoides* subesp. *mycoides* tipo LC em ensaio imunoenzimático (ELISA)

Osmotic resistance importance on *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* I type cellular antigen LC stabilization on immunoenzymatic assay (ELISA)

Jackeline Oliveira Pontes Lizeu¹ Maria das Graças Miranda Danelli²

- NOTA -

RESUMO

O trabalho avalia a importância das condições de armazenamento do antígeno celular de *Mycoplasma mycoides* subesp. *mycoides* Tipo LC no teste de ELISA. Os resultados mostram a importância da preservação da integridade da célula micoplásmica na estabilidade do antígeno empregado no teste.

Palavras-chave: resistência osmótica, *Mycoplasma mycoides*, ELISA.

ABSTRACT

This work evaluates the *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Tipo LC cellular antigen storage conditions in a ELISA test. The results show the mycoplasma cell integrity importance in antigen stability used in this test.

Key words: osmotic resistance, *Mycoplasma mycoides*, ELISA.

Ensaio imunoenzimáticos, em especial o teste de ELISA, são comumente utilizados na avaliação da resposta imune para micoplasmose; entretanto, a sensibilidade e a especificidade do ELISA é diretamente influenciada pela qualidade do antígeno empregado na sensibilização das placas (LIBERAL & BOUGHTON, 1992; TULLY, 1996). Placas sensibilizadas com antígeno celular íntegro proporcionam bons resultados, especialmente em testes de triagem, porém a baixa estabilidade desse

tipo de antígeno pode comprometer seu uso (BROWN et al., 1996). Desta forma, o objetivo desse trabalho foi verificar a importância da integridade da membrana celular do *Mycoplasma mycoides* subesp. *mycoides* tipo LC na estabilidade do antígeno somático no ELISA.

A amostra padrão de *Mycoplasma mycoides* subesp. *mycoides* tipo LC (MmmLC) foi cultivada como descrito previamente (BARBOSA et al., 2000). Após 18 horas de cultivo, as células foram centrifugadas a 12.000 xg por 30 minutos a 4 °C e lavadas em solução salina (NaCl 0,25 M pH 7,2), três vezes. O sedimento celular foi re-suspenso na mesma solução salina, correspondendo a 10% do volume total da cultura. Essa suspensão antigênica, denominada SAA, foi separada em frações e estocada a 4°C até o uso. Outras suspensões antigênicas, chamadas SAB1 e SAB2, foram elaboradas da seguinte forma: após a centrifugação da cultura, o sedimento celular foi lavado uma vez em solução salina gelada mais cloreto de magnésio 0,1 M, pH 7,5. O sedimento celular foi dividido em duas partes: SAB1, re-suspenso em tampão Tris-salina gelada, pH 7,5 (Tris 0,025 M, NaCl 0,15 M); SAB2, re-suspenso em tampão β-mercaptoetanol, pH 7,4 (β-mercaptoetanol 0,01 M, Tris 0,01M). O SAB 1 e 2 foram dividido em frações e estocado a 4°C até o uso.

As suspensões antigênicas (1/20) com 01, 15 e 30 dias de estocagem a 4°C foram analisadas por

¹Biólogo.

²Professor Adjunto, Doutor, Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, Km 07, 23851-970, Seropédica, RJ. E-mail: danelli@ufrj.br. Autor para correspondência.

microscopia eletrônica de transmissão (MET) e observadas em microscópio eletrônico Zeiss EM 900 (12.000 e 85.000 vezes de aumento).

A estabilidade das suspensões antigênicas no ELISA foi avaliada por dois parâmetros e duas variáveis: (1) forma de estocagem – os antígenos foram estocados a 4°C na forma de suspensão e como material adsorvido a microplaca; (2) tempo de sensibilização – as placas sensibilizadas e estocadas a 4°C foram testadas no primeiro e quinto dia para SAA e, nos dias 01, 14, 21 e 28 para o SAB. Os controles negativo e positivo empregados no ELISA foram obtidos a partir de seis camundongos BALB/c, com cerca de oito semanas de idade, inoculados com 100µg de SAA por via intraperitoneal. Um *pool* de soros dos animais antes da imunização foi usado como controle negativo e, o controle positivo preparado a partir de um *pool* de soros dos animais imunizados. Os soros foram testados e titulados pelo teste de ELISA. As placas para o teste de ELISA foram sensibilizadas com 100µl das suspensões SSA ou SAB, contendo 2µg de proteína por mililitro de tampão carbonato de sódio 0,06M, pH 9,6, sendo os sistemas de detecção peroxidase-IgG de cabra anticamundongo e de revelação (água oxigenada/H₂O₂ e O-phenylenediamine dihydrochloride/OPD) empregados no teste (CASSEL & BROWN, 1983).

A análise das suspensões antigênicas por MET revelou algumas células não íntegras na SAA, com membranas plasmáticas rompidas, similares a pequenos sacos vazios. O aparecimento dessas células foi diretamente proporcional ao tempo de estocagem do antígeno a 4°C. As células íntegras, isto é, eletrodensas, estavam envoltas por uma grande quantidade de material amorfo, como pano de fundo das grades. Em contrapartida, as suspensões antigênicas SAB1 e SAB2 apresentaram poucas células não íntegras, mesmo nas suspensões armazenadas por 30 dias. O material amorfo detectado na SAA foi encontrado em quantidade moderada na SAB1 e, em pequena quantidade na SAB2, revelando ser esta preparação mais estável.

A figura 1 mostra os resultados das diferentes formas e tempo de armazenamento das suspensões antigênicas no teste de ELISA. As densidades ópticas (DO) dos soros controle positivo e negativo apresentaram valores próximos, para os diferentes antígenos, quando armazenados na forma de suspensão (Figura 1A) ou na placa (Figura 1B). Quanto à análise do tempo de armazenamento dos antígenos, a SAA apresentou uma queda acentuada da D.O. já no quinto dia de armazenamento a 4°C. As SAB1 e SAB2 mostraram uma maior estabilidade nas DO alcançadas até o 28 dia de armazenamento.

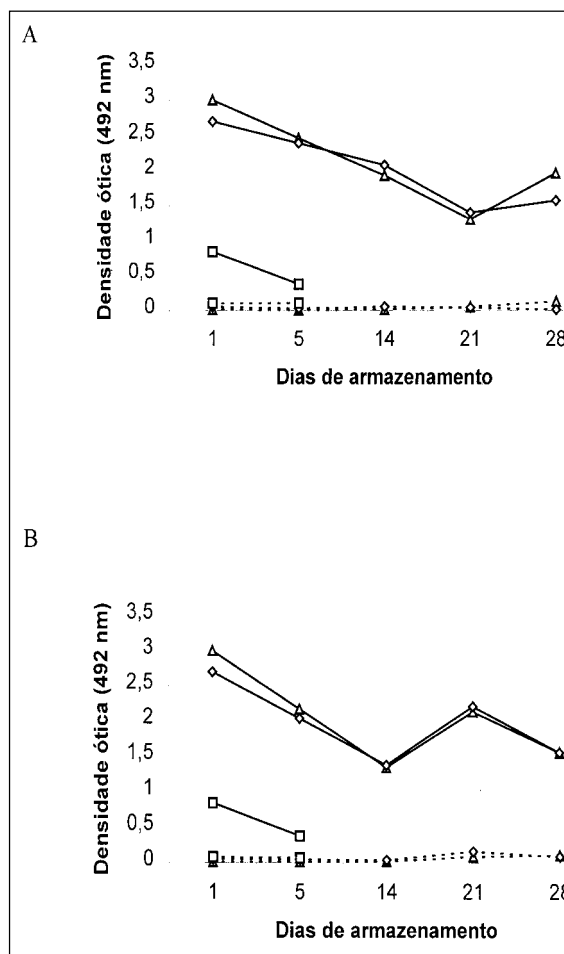


Figura 1 - Densidade óptica dos soros controles positivo (—) e negativo (----) no teste de ELISA para suspensões antigênicas SAA (□), SAB1 (Δ), SAB2 (◇) armazenado a 4°C em suspensão (A) ou em placa (B), por 30 dias. As densidades ópticas apresentadas representam a média de dois experimentos feitos e duplicata.

Os resultados alcançados mostraram que a forma de armazenamento da suspensão celular não interferiu na estabilidade da célula micoplásmica no teste de ELISA; entretanto, a solução de armazenamento é importante na promoção da estabilidade antigênica, onde o uso do tampão β-mercaptoetanol (SAB2) proporcionou uma maior estabilidade celular na MET. Este tampão é comumente empregado em protocolos de análise enzimática, nos quais a estabilidade celular é fator determinante (POLLACK, 1998). O emprego de solução salina isosmótica tamponada com Tris (SAB1) ou o uso do tampão β-mercaptoetanol (SAB2) não promoveu diferenças relevantes nas DO obtidas no teste de ELISA.

Os resultados sugerem que a falta de estabilidade do antígeno celular de *M. mycoides* nos testes de ELISA é devido à falta de resistência à lise osmótica. Uma maior estabilidade do antígeno celular pode ser alcançada através do preparo e armazenamento apropriado da suspensão antigênica.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho recebeu apoio financeiro do CNPq.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBOSA, V.P. et al. Lise de *Mycoplasma mycoides* subesp. *Mycoides* tipo LC por diferentes métodos. **R bras Ci Vet**, v.7, p.51-54, 2000.
- BROWN, M.B.; BRADBURY, M.J.; DAVIS, J.K. ELISA in small animal hosts, rodents, and birds. In: TULLY, J.G.; RAZIN, S. **Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology**. London : Academic, 1996. p.93-103.
- CASSEL, G.H.; BROWN, B.M.B. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of anti-mycoplasmal antibody. In: RAZIN, S.; TULLY, J.G. **Methods in mycoplasmaology**. New York : Academic, 1983. V.1, p.457-469.
- LIBERAL, M.H.; BOUGHTON, E. Standardization of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of *Mycoplasma bovis*. **Braz J Microbiol**, v.23, p.146-150, 1992.
- POLLACK, J.D. Enzyme analysis. In: MILES, R.; NICHOLAS, R. **Mycoplasma protocols**. [S.l.] : Humana, 1998. p.79-94.
- TULLY, J.G. Immunological tools – Introductory remarks. In: TULLY, J.G.; RAZIN, S. **Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology**. London : Academic, 1996. p.89-91.