



Diagnóstico laboratorial - Brucelose **TESTE DO 2-MERCAPTOETANOL**

Teste do 2-ME

- Confirmativa (infecção crônica)
- Laboratório credenciado / oficial credenciado
- Alta especificidade (negativo quando animal não é infectado)
- 2 testes em paralelo: SOROAGLUTINAÇÃO (Ag + Ac)
- Soroaglutinação lenta em tubo (SAT) ou Prova lenta (PL)
- 2-ME



Soroaglutinação:

Antígeno (cel. *B. abortus*)
+ Anticorpo soro



Teste do 2-ME

- Dinâmica das imunoglobulinas
- Infecção crônica/ativa: **IgG** e IgM (níveis altos e constantes)
- Vacinação recente ou Infecção recente: IgM (sem tempo suficiente para produção IgG – níveis baixos – não detectados no teste)
- 2-ME: exclui vacinado recente (inibe IgM e sem IgG) (-) e identifica infectado crônico (IgG) (+)

Teste do 2-ME (inibe IgM)

- Quantitativa seletiva
- Detecta **somente IgG** no soro – infecção crônica
- Executada em paralelo com a prova lenta em tubos
- **IgM se degradam** pela ação de compostos com radical tiol (**mercaptoetanol**) – não forma complexo para aglutinação

PL

2-ME

IgM

IgG

IgM

IgG

IgM – início infecção e pós-vacinação (+) na PL e (-) no 2-ME

IgG – crônico (+) na PL e (+) 2-ME

Teste do 2-ME

- Soro com predomínio IgM = reação negativa no 2-Me
= reação positiva prova lenta
- Resultado: diferença entre os títulos dos soros sem tratamento (PL) e soro tratado (2-ME)
- Resultado positivo PL e negativo 2-ME = inespecífico ou Acs residuais vacinação B 19 (recém vacinado) (IgM – PL)
- Positivo PL e 2-ME = presença IgG (infecção crônica)

Teste do 2-ME

- Vacinado recente (> 8 meses) (tem muito IgM)
 - IgM (inativada no 2-ME) = 2-ME negativa
 - Sem IgG (ainda) = PL positiva (detecta a IgM da vacinação)
-
- Fêmea vacinada 3-8 m $\rightarrow >$ igual 24 meses
 - Sem IgM e IgG – queda títulos Acs = 2-ME negativo (sem IgG) e PL negativa (sem IgG e IgM)
-
- Infecção ativa
 - Tem IgM e IgG = 2-ME positiva (detectar IgG) e PL positiva (detectar IgM e IgG)

- **Falso-negativo (em dois casos)**
- Prozona
- Elevados títulos Acs no soro
- > 200
- Desconfiar: histórico de abortos, não vacinados, outros animais positivos
- Diluição maior do soro
- Pószona
- Baixos títulos de Acs no soro e excesso da Ag

Teste de Soroaglutinação em Tubos (SAT)

- Prova lenta (48 hs para leitura resultados)
- Prova sorológica mais antiga
- Identifica soroaglutinação de Acs IgM e IgG com Ag *anti-B. abortus*
- Associada ao 2-ME
- Identificar alta proporção de animais infectados
- Mas: falso-negativos (infecção crônica – prozona) ou falso-positivos (reação cruzada bactérias)
- Vacinado B 19 acima 8 meses: alguns apresentar títulos vacinais altos por longo tempo/permanentemente - PL (+)

Teste do 2 - ME: Material

- Antígeno para a soroaglutinação lenta em tubo
- 2-Mercaptoetanol
- Salina 0,85%
- Salina 0,85%, fenicada 0,5% (com fenol – conservar IgM)
- Amostras de soro a testar
- Soro controle positivo e soro controle negativo
- Tubos de 10 mm x 75 mm ou 10 mm x 100 mm
- Pipetas de Bang ou micropipetadores de volume ajustável
- Caixa com luz indireta para a leitura
- Estufa a 37°C
- Vidraria para diluição dos reagentes

Teste do 2-ME

- **Precauções na execução do teste**
- A diluição do antígeno para a série de tubos com 2-ME deve ser realizada em solução salina a 0,85%, sem adição de fenol, pois este interfere com o 2-ME
- Recomenda-se fazer as diluições do antígeno 12 horas antes do uso
- Os antígenos diluídos devem ser conservados sob refrigeração (2ºC a 8ºC), podendo ser utilizados por um período de até uma semana.

Teste do 2-ME

- **Precauções na execução do teste**
- 2-ME é sensível à luz / calor / exposição ao ar. Mantido em frascos de cor âmbar, hermeticamente fechados e sob refrigeração
- 2-ME: tóxico - manuseado em capela de exaustão

Teste do 2-ME

- Incubação a 37ºC / 48 ± 3 horas
- Suficiente para se obter o máximo de aglutinação num soro de baixo conteúdo de aglutininas (baixa conc. Anticorpos).
- O Teste do 2-ME é incubado e lido junto com o Teste de Soroaglutinação (lenta) em Tubos.

Teste do 2-ME

- A diferença de títulos entre ambos os testes (caso ela ocorra) é interpretada como a capacidade aglutinante do soro em decorrência de anticorpos IgM
- Presença de IgG: infecção ativa
- Toda reação **positiva** no teste do **2-ME (a partir de 1:25)** deve ser considerada como indicativa de infecção
- Animais vacinados: predominam IgM (sensíveis ao 2-ME) - usualmente resultados negativos nesta prova
- Animais no início de infecção: maioria IgM, negativos ao 2-ME

Prova lenta

2,0 mL (Salina 0,85%
Fenicada + Ag)

Título

200

T 4

100

T 3

50

T 2

25

T 1

2-ME

1,0 mL (Salina 0,85% + 2-ME)
30 min
1,0 mL (Salina 0,85 + Ag)



M 4



M 3



M 2



M 1

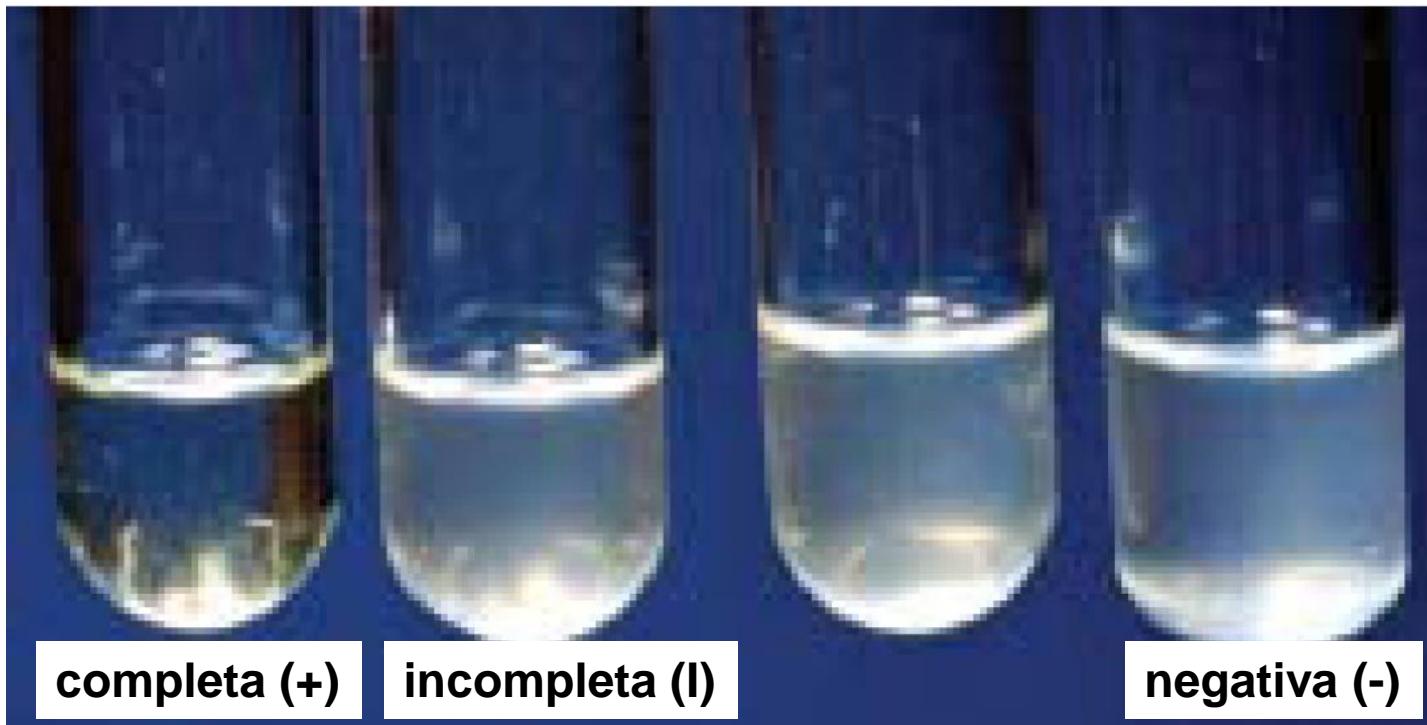
0,01 mL soro
(1/200)

0,02 mL soro
(1/100)

0,04 mL soro
(1/50)

0,08 mL soro
(1/25)

- Estufa 37°C / 48 ± 3 hs
- Resultado = soroaglutinação (grumos)
- Agitar (uma vez) os 2 tubos



Grau de Aglutinação

- Cada diluição
- Reação **completa (+)**: líquido da mistura soro-Ag aparece translúcido, agitação suave não rompe grumos
- Reação **incompleta (I)**: soro-Ag parcialmente translúcida, suave agitação não rompe grumos
- Reação **negativa (-)**: soro-Ag opaca ou turva, agitação suave não revela grumos



Tabela 1 – Interpretação do teste do 2-ME para fêmeas com idade igual ou superior a 24 meses, vacinadas entre três e oito meses de idade

Teste de soroaglutinação lenta (UI/ml)	Teste do 2-ME (UI/ml)	Interpretação
≤ 50	< 25	negativo
≥ 100	< 25	inconclusivo
≥ 25	≥ 25	positivo

UI - Unidade Internacional

Tabela 2 – Interpretação do teste do 2-ME para fêmeas não vacinadas e machos, com idade superior a oito meses

Teste de soroaglutinação lenta (UI/ml)	Teste do 2-ME (UI/ml)	Interpretação
≤ 25	< 25	negativo
≥ 50	< 25	inconclusivo
≥ 25	≥ 25	positivo

UI - Unidade Internacional

Quadro 1 – Interpretação da prova do 2-ME para fêmeas com idade igual ou superior a 24 meses e vacinadas entre 3 e 8 meses de idade

- Positivo = Abate
- Inconclusivo
- Repetir 2-ME ou FC
- Abate

2-ME SAL	NR	25 I	25	50 I	50	100 I	100	200 I	200
NR	–								
25 I	–	–							
25	–	–	+						
50 I	–	–	+	+					
50	–	–	+	+	+				
100 I	–	–	+	+	+	+			
100	Inc	Inc	+	+	+	+	+		
200 I	Inc	Inc	+	+	+	+	+	+	
200	Inc	Inc	+	+	+	+	+	+	+

+ : positivo

– : negativo

Inc : reação inconclusiva

■ : combinação que não pode ocorrer

2Me > 25 = positivo = IgG = crônica

PL > 25 = positivo = IgG e IgM = crônica

PL > 100 (alto IgM e IgG)

2M2 NR (inativa IgM, mas pouco IgG = pószona)

2-ME : 2-Mercaptoetanol

SAL : soroaglutinação lenta

NR : não reagente

I : reação incompleta

Quadro 2 – Interpretação da prova do 2-ME para fêmeas não vacinadas e machos com idade superior a 8 meses

- Positivo = Abate
- Inconclusivo
- Repetir 2-ME ou FC
- Abate

2-ME SAL	NR	25 I	25	50 I	50	100 I	100	200 I	200
NR	–								
25 I	–	–							
25	–	–	+						
50 I	–	–	+	+					
50	Inc	Inc	+	+	+				
100 I	Inc	Inc	+	+	+	+			
100	Inc	Inc	+	+	+	+	+		
200 I	Inc	Inc	+	+	+	+	+	+	
200	Inc	Inc	+	+	+	+	+	+	+

+ : positivo

– : negativo

Inc : reação inconclusiva

■ : combinação que não pode ocorrer

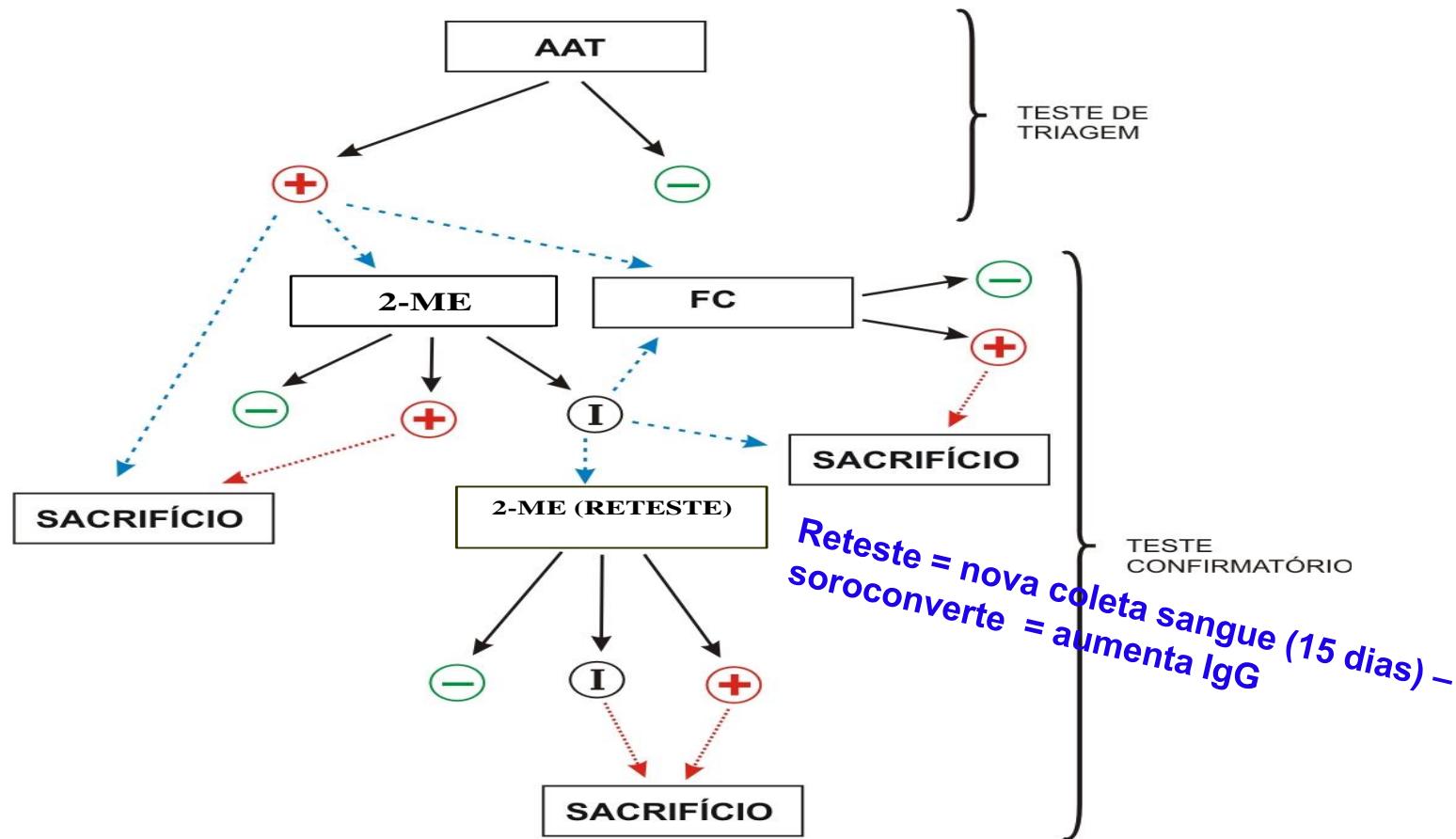
2-ME : 2-Mercaptoetanol

SAL : soroaglutinação lenta

NR : não reagente

I : reação incompleta

DIAGNÓSTICO de BRUCELOSE



- Indicam ações obrigatórias
- Indicam alternativas de decisão
- Indicam possibilidades de resultados

AAT: teste do antígeno acidificado tamponado

2ME: teste do 2-mercaptopetanol

FC: teste de fixação de complemento

Fonte: Comitê Científico Consultivo do PNCEBT

	PL	2-ME	PL	2-ME
Infecção crônica	positivo	Positivo	IgM IgG	IgM (inativada) IgG
Não infectado Vacinado 3-4 meses (>24 m)	negativo	Negativo	Sem IgM e Sem IgG	Sem IgG
Início infecção Vacinação residual	Positivo	negativo	IgM (início infecção), ainda não produziu IgG	IgM (inativada) Sem IgG
	negativo	positivo	Impossível Sem IgM e Sem IgG	Repetir IgM (inativada) IgG

PL	2-ME	
50	25	
50	50	
25	100	Impossível

Resultado = **Inconclusivo** (coletar novo sangue após 15 dias)

Referências

- **Brasil, MAPA.** Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose - PNCEBT. 2006. 184p.