

ANEXO III TESTE DO 2 - MERCAPTOETANOL (2-ME)

MATERIAL:

antígeno para a soroaglutinação lenta em tubo (SAL);
2 Mercaptoetanol;
solução salina 0,85%;
solução salina fenicada 0,5%;
amostras de soro a testar;
soro controle positivo com título alto;
soro controle positivo com título médio;
soro controle positivo com título baixo;
soro controle negativo;
tubos de 10 x 75 mm ou 10 x 100 mm;
grade para tubos;
pipetas de Bang ou micropipetadores de volume ajustável;
dispensador automático de 1 mL;
dispensador automático de 2 mL;
pipetas de 10 mL;
caixa com luz indireta para a leitura;
estufa a 37°C (trinta e sete graus Celsius); e
vidraria para diluição dos reagentes.

Precauções na execução do teste:

1. 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;
2. Recomenda-se fazer as diluições do antígeno 12 (doze) horas antes do uso;
3. Os antígenos diluídos devem ser conservados sob refrigeração (+4°C a +8°C), podendo ser utilizados por um período de até uma semana;
4. O 2-ME deve ser mantido em frascos de cor âmbar, hermeticamente fechados e sob refrigeração;
5. O 2-ME é tóxico para o ser humano e deve ser manuseado em capela de exaustão;
6. Em cada jornada de trabalho, deve ser incluído pelo menos um soro selecionado, especialmente, com alto conteúdo de anticorpos IgM anti-Brucella e que não contenha IgG detectável pelo teste do 2-ME, bem como outro soro reagente na SAL e 2-ME;
7. Em cada teste serão incluídos também tubos de controle de antígeno, usando-se soros testados positivos de título conhecido e soro negativo; e
8. O Teste do 2-ME é incubado e lido junto com o SAL. Ocasionalmente, o tubo da diluição 1:25 pode estar um pouco opaco na prova do 2-ME, ainda que os tubos subsequentes estejam claros. Isto não deve ser considerado como resultado negativo do teste.

Técnica:

1. Diluir o antígeno para SAL em tubos 100 (cem) vezes em solução salina a 0,85% contendo 0,5% de fenol. Concentração final 0,045%;
2. Diluir o antígeno para a prova de 2-ME em tubos 50 (cinquenta) vezes em solução salina 0,85% sem adição de fenol. Concentração final 0,090%;
3. Preparar solução de 2-ME a 0,1M misturando-se 7,8 ml de 2-ME a 992,20 mL de solução salina a 0,85% sem fenol, ou volumes menores, proporcionalmente;
4. Para cada amostra de soro a testar, colocar em uma estante, duas fileiras de quatro tubos;

5. Identificar o primeiro tubo de cada fileira com o número correspondente ao soro a testar;

6. A primeira fileira corresponde às quatro diluições do soro do SAL e deve ser marcada com a letra T. A outra fileira, em que se fará o teste do 2-ME, deve ser marcada com a letra M;

7. Com uma pipeta de Bang, dotada de pera de borracha, ou outro dispositivo de pipetagem que evite o uso da boca, carrega-se o soro até passar um pouco da graduação superior. Com um papel absorvente, limpa-se o extremo da pipeta; mantendo-se esta em posição vertical sobre a parede do tubo que contém a amostra, deixa-se escorrer o soro até que o fundo do menisco no interior da pipeta esteja nivelado com a sua graduação superior;

8. Com a pipeta no fundo do primeiro tubo da primeira fileira, deixa-se fluir 0,08 mL de soro. No segundo tubo, deposita-se 0,04 mL, no terceiro, 0,02 mL, no quarto 0,01 mL;

9. Repete-se o procedimento descrito para depositar as mesmas quantidades de soro na segunda fileira de tubos (série do 2-ME);

10. Para todas as amostras de soro, repete-se o procedimento de forma similar, pipetando os soros para cada duas fileiras de tubos adequadamente identificados;

11. Incluir os soros controle positivos com atividade aglutinante conhecida;

12. Incluir o soro controle negativo na prova do 2-ME;

13. Com o dispensador automático de 2 mL ou pipeta de 10mL, agrega-se a cada um dos quatro tubos das fileiras T, 2 mL do antígeno diluído 1:100 (0,045% de células) em solução salina fenicada;

14. Com o dispensador automático de 2 mL (regulado para 1 mL), ou pipeta de 10 mL, agrega-se 1 mL de solução de 2-ME 0,1M (diluído em solução salina sem fenol) a cada um dos tubos das fileiras M;

15. Mistura-se bem, agitando a estante;

16. Deixar as estantes com as amostras em repouso durante 30 (trinta) minutos à temperatura ambiente;

17. Após os 30 (trinta) min, empregando-se outro dispensador automático, ou outra pipeta de 10mL, agrega-se a cada tubo da fileira M, 1 mL do antígeno diluído 1:50 (0,09 % de células) em solução salina (sem fenol);

18. Mistura-se bem, agitando-se a estante;

19. Incubar a 37°C (trinta e sete graus Celsius) por 48h + 3 h;

20. A leitura da prova é feita por meio de uma fonte de luz indireta contra um fundo escuro e opaco, com uma forte luz que atravesse os tubos. As fontes de luz estranhas devem ser reduzidas. As interpretações baseiam-se no grau de turvação dos tubos e na firmeza dos grumos, após agitação suave dos tubos (aglutinação do antígeno);

21. Anotar os resultados. Se houver interesse na determinação do título final de um soro, poderá ser empregado o método de diluições seriadas.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

O grau de aglutinação em cada uma das distintas diluições deve ser classificado como: completo (+), incompleto (I) ou negativo (-):

Reação completa - é aquela em que o líquido da mistura soroantígeno aparece translúcido, e a agitação suave não rompe os grumos;

Reação incompleta - é aquela em que a mistura soroantígeno aparece parcialmente translúcida, e uma suave agitação não rompe os grumos;

Reação negativa - é aquela em que a mistura soroantígeno aparece opaca ou turva, e uma agitação suave não revela grumos; e

A interpretação dos resultados da prova é realizada segundo os quadros 1 (um) e 2 (dois).

QUADRO 1: interpretação da prova do 2-ME para fêmeas com idade igual ou superior a 24 (vinte e quatro) meses e vacinadas entre 3 (três) e 8 (oito) meses de idade

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

SAL= Teste de soroglutinação lenta

2-ME = Teste do 2-mercaptoetanol

NR - não-reagente

I - reação incompleta

Inc - reação inconclusiva

□ - combinação que não pode ocorrer

QUADRO 2: interpretação da prova do 2-ME para fêmeas não vacinadas e machos com idade superior a 8 (oito) meses

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

SAL= Teste de soroglutinação lenta

2-ME = Teste do 2-mercaptoetanol

NR - não-reagente

I - reação incompleta

Inc - reação inconclusiva

□ - combinação que não pode ocorrer