

# Controlo laboratorial da brucelose em ruminantes e suídeos

**A brucelose é uma zoonose endémica em várias áreas do globo, incluindo Portugal, que acarreta grandes prejuízos na saúde pública. Um diagnóstico laboratorial preciso e específico é fundamental para um controlo eficaz e erradicação desta doença.**

Ana Cristina Ferreira, Ana Sofia Simões . INIAV, I.P.



## A Brucelose e o género *Brucella*

A Brucelose é uma doença zoonótica disseminada a nível mundial, sendo responsável por consideráveis perdas económicas e elevada morbilidade humana nas áreas endémicas.

Os agentes etiológicos desta zoonose são bactérias do género *Brucella*, parasitas intracelulares facultativos aeróbios que infetam uma larga variedade de mamíferos domésticos, selvagens (incluindo mamíferos marinhos) e o Homem. Esta zoonose caracteriza-se pela ocorrência de aborto e infertilidade em animais e doença sistémica febril em humanos. Atualmente, são reconhecidas doze espécies distintas agrupadas de acordo com o seu hospedeiro preferencial e outras características fenotípicas e/ou genotípicas (Tabela 1).

De todas as espécies, *B. melitensis*, *B. abortus* e *B. suis* são as que têm uma maior disseminação e as que acarretam maiores implicações ao nível da saúde pública. Com base em diferentes características culturais, metabólicas e antigénicas, estas espécies estão ainda subdivididas em biovars: *B. melitensis* (biovars 1, 2 e 3), *B. abortus* (biovars 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 9) e *B. suis* (biovars 1, 2, 3, 4 e 5), sendo que nos países da Bacia do Mediterrâneo, nomeadamente em Portugal, os biovars predominantes são os biovars 1 e 3 de *B. melitensis* e de *B. abortus*, e *B. suis* biovar 2.

## Epidemiologia e patogenia

Embora tenha sido erradicada em diversos países da região norte e central da Europa, Austrália, Japão e Nova Zelândia, a brucelose é uma doença re-emergente, apresentando-se como um grave problema sanitário e económico, sobretudo nos países da Bacia do Mediterrâneo, América do Sul, África, Médio Oriente e Ásia. Em Portugal, a brucelose é endémica, apresentando, contudo, diferentes percentagens de prevalência em função da região.

Em 1938, foram dados os primeiros passos no controlo desta zoonose em Portugal, mas apenas no início dos anos 70 os Serviços Veterinários Oficiais desenvolveram esforços para erradicar a doença, controlando a maioria dos efetivos bovinos e rebanhos de pequenos ruminantes. Em 1986, após a adesão de Portugal à UE, as políticas sanitárias foram alteradas e adaptadas às diretrizes comunitárias. Assim, foram criadas as Associações de Produtores de Gado “Agrupamentos de Defesa Sanitária (ADS)” que, em conjunto com as Autoridades Oficiais, criaram novas regras para controlar esta infeção em bovinos e pequenos ruminantes. A classificação sanitária dos rebanhos/efetivos foi implementada e, atualmente, o estatuto sanitário de uma exploração é atribuído pelos Serviços Oficiais, de acordo com as Diretivas da União Europeia.

Os programas de controlo e erradicação em Portugal abrangem apenas bovinos e pequenos ruminantes (ovinos e caprinos). Em suínos, apesar da existência de legislação, o programa não está implementado. Nesta espécie animal, o controlo sanitário é efetuado apenas nos reprodutores destinados à inseminação artificial e nos animais para

exportação. Esporadicamente ocorrem surtos em explorações, com isolamento de *B. suis* biovar 2 confirmando a infeção, especialmente no caso de raças autóctones criadas em sistemas extensivos de produção, uma vez que este biovar tem uma estreita relação epidemiológica com a fauna silvestre, nomeadamente o javali e a lebre. De facto, num estudo bacteriológico realizado em Portugal, em javalis, demonstrou-se que a infeção por *B. suis* biovar 2 encontra-se difundida nesta espécie animal.

A infeção por *Brucella*, tal como outras infeções, depende da virulência e da dose bacteriana a que o hospedeiro animal é sujeito, bem como da sua resistência/suscetibilidade e estado imunitário. Tipicamente, a infeção por *Brucella* é encarada como uma infeção crónica que permanece durante toda a vida do animal. O período de incubação é relativamente longo. Os sinais não são perceptíveis nos animais jovens e o seu aparecimento depende, sobretudo, da idade, do sexo e do estado fisiológico do animal no momento da infeção. Os animais infetados no primeiro terço da gestação, normalmente, abortam 30 a 45 dias após a infeção, mas os animais infetados no final da gestação

TABELA 1 – ESPÉCIES DE *BRUCELLA*, HOSPEDEIROS PREFERENCIAIS E PATOGENICIDADE PARA O HOMEM

Espécies	Biovars	Hospedeiro preferencial	Patogenicidade para o Homem
<i>B. melitensis</i>	1–3	Ovinos; caprinos	Alta
<i>B. abortus</i>	1–7, 9	Bovinos	Alta
<i>B. suis</i>	1, 3	Suínos	Alta
	2	Javali; lebre	Baixa
	4	Rena; caribu	Alta
	5	Roedores	Não patogénica
<i>B. neotomae</i>	–	Roedores	Não patogénica
<i>B. ovis</i>	–	Carneiro	Não patogénica
<i>B. canis</i>	–	Canídeos	Moderada
<i>B. ceti</i>	–	Cetáceos	Desconhecido
<i>B. pinnipedialis</i>	–	Pinípedes	Desconhecido
<i>B. microti</i>	–	Solo; rato; raposa	Desconhecido
<i>B. inopinata</i>	–	Desconhecido	Alta
<i>B. paponis</i>	–	Babuínos	Desconhecido
<i>B. vulpis</i>	–	Raposa	Desconhecido

não abortam. No caso dos suínos, a infecção pode alastrar-se numa vara sem evidentes sinais clínicos, podendo passar despercebida durante bastante tempo, o que facilita a sua disseminação.

### Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico da doença é fundamental para se estabelecer a ocorrência, a distribuição e a caracterização do agente. Nesse contexto, a brucelose animal pode ser diagnosticada através de diferentes métodos. O diagnóstico definitivo depende não só da indicação dos sinais clínicos (aborto, nascimento de animais débeis, retenção placentária e esterilidade de machos e fêmeas) e epidemiológicos (avaliação do histórico dos rebanhos nas explorações), como também do resultado das provas laboratoriais.

O diagnóstico laboratorial da brucelose inclui: (i) o isolamento e identificação do agente etiológico (diagnóstico bacteriológico); (ii) a detecção de DNA dos microrganismos (diagnóstico molecular) e (iii) a presença de anticorpos no sangue/soro e/ou leite (diagnóstico serológico).

Os métodos de diagnóstico para a brucelose suína são similares aos utilizados no diagnóstico da brucelose dos ruminantes, estando descritos no “Manual das Provas de Diagnóstico e Vacinas para os animais terrestres”, um manual internacional de referência da “World Organisation for Animal Health” (OIE).

### Diagnóstico bacteriológico

O diagnóstico bacteriológico baseia-se no isolamento e classificação da bactéria, o que permite identificar a doença de um modo inequívoco, sendo por isso considerado o “*gold standard*”. Os métodos bacteriológicos possuem uma elevada especificidade e capacidade de diferenciação entre espécies e biovars.

O tipo de amostras colhidas, o método de colheita e o acondicionamento adequado para o envio ao laboratório, são fundamentais para aumentar a sensibilidade do isolamento. Nos animais vivos, as zaragatoas vaginais de fêmeas abortadas são, do ponto de vista clínico, as amostras mais recomendáveis e fáceis de obter. A placenta, os fetos e o leite/colostró são também amostras adequadas, assim como o sêmen nos machos. À autópsia, as amostras preferenciais a colher são os linfonodos da cabeça (retrofaríngeos, parotídeos e mandibulares), os pré-escapulares (zona dos membros anteriores), pré-femorais (zona dos membros posteriores), os retromamários e escrotais (zona do aparelho reprodutor), baço, fígado, glândula mamária, útero grávido, testículos, cauda do epidídimo, vesículas seminais e glândulas acessórias.

O diagnóstico direto da brucelose é realizado a partir do isolamento do microrganismo nas amostras biológicas colhidas, com posterior identificação e tipificação (caracterização dos biovars). Em animais vacinados, é ainda necessário proceder a um conjunto de provas complementares para diferenciar entre estirpe de campo e vacinal.

O diagnóstico bacteriológico é complexo, demorado e tem um custo elevado. Acresce, que *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis* constituem um agente de alto risco biológico, sendo necessários laboratórios com funcionários qualificados e instalações e equipamentos de proteção de nível 3.

### Diagnóstico molecular

A acessibilidade dos dados da sequência do genoma completo de estirpes de *Brucella* sp. abriu caminho para análises moleculares mais abrangentes e subsequente desenvolvimento de ferramentas de tipificação molecular que permitem a identificação e diferen-

PUBLICIDADE  
1/2 página

ciação de brucellae a nível da espécie e do biovar.

As abordagens atuais para o estudo da diversidade e filogenia de *Brucella* spp. incluem métodos como o *Multilocus Variable Number Tandem Repeat Analysis* (MLVA), *Multilocus Sequence Typing* (MLST), a análise de polimorfismos únicos (SNPs), bem como sequenciação de todo o genoma, que serve como um método robusto e imparcial para resolver relações intraespecíficas em espécies com elevada homologia como é o caso das espécies de *Brucella*. Estas metodologias, sobretudo o MLVA, têm mostrado ser muito eficientes na confirmação laboratorial de infeções, na distinção entre recidiva e reinfeção em humanos, na caracterização de surtos, na identificação de diferentes genótipos com diferentes potenciais patogénicos e na avaliação da estabilidade entre lotes de vacinas.

### Diagnóstico serológico

O diagnóstico serológico da brucelose dos ruminantes e suínos baseia-se na deteção de anticorpos específicos de *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*, sobretudo em amostras de leite e sangue (soro). Estes métodos são utilizados rotineiramente para a deteção da infeção devido não só à sua fácil executabilidade mas, também, porque permitem o diagnóstico rápido de um grande número de amostras.

Os programas de controlo, erradicação e vigilância da brucelose assentam, sobretudo, na avaliação dos testes imunológicos. Contudo, a interpretação dos resultados e as posteriores decisões sanitárias são efetuadas sempre tendo em conta os dados epidemiológicos e bacteriológicos.

Após um primeiro contacto com um agente externo, o sistema imunológico produz proteínas (imunoglobulinas/anticorpos) específicas de uma célula ou partícula invasiva (antigénio). A resposta primária caracteriza-se pela produção de imunoglobulinas do tipo IgM, embora as IgG ocorram rapidamente, com predominância das IgG1 sobre as IgG2. A presença de IgM no soro a testar indica, geralmente, uma infeção recente, no entanto, a concentração destas tende a diminuir progressivamente pelo que num estado avançado da doença a principal imunoglobulina detetada é do tipo IgG. Quando estes anticorpos específicos estão presentes na amostra animal, vão ligar-se aos antígenos com a formação de complexos imunes (complexo antígeno-anticorpo) que serão detetados nas técnicas imunológicas.

Existem várias técnicas serológicas, com princípios diferentes, que podem ser utilizados no diagnóstico da brucelose. Contudo, as convencionais são o teste de aglutinação rápida com o antígeno rosa de Bengala (RB), o teste de Fixação do Complemento (FC) e os ensaios imunoenzimáticos (ELISA).

O teste de RB é considerado um teste de rastreio adequado para o controlo da brucelose a nível nacional, dado a sua simplicidade de execução (leitura visual), baixo custo e permite uma utilização em larga escala. O antígeno utilizado consiste numa suspensão de células de *B. abortus* coradas pelo corante Rosa de Bengala. A reação do antígeno com os anticorpos específicos presentes na amostra de soro, origina a formação e a visualização macroscópica da aglutinação.

O teste de FC é um teste sensível e mais específico, sendo utilizado como um teste confirmatório das reações positivas ao teste de RB e utiliza, também, uma suspensão de células inativadas de *B. abortus* como antígeno. Este teste deteta maioritariamente imunoglobulinas do tipo IgG, uma vez que durante a inativação do complemento residual do soro as imunoglobulinas tipo IgM são inativadas pelo calor. É uma técnica muito laboriosa e exigente, sendo fundamental a sua execução por técnicos de laboratório qualificados.

Os ensaios de ELISA são métodos muito sensíveis e específicos, atualmente utilizados para a pesquisa de anticorpos em leite de ruminantes e na testagem de soros de suínos.

### Outros métodos de diagnóstico

Além das técnicas já mencionadas, existem outros métodos complementares de diagnóstico, tais como as técnicas de precipitação em gel e as de hipersensibilidade retardada.

A prova de Imunodifusão em gel (IDG ou AGID) é uma técnica de precipitação, de fácil execução e de baixo custo. Relativamente ao diagnóstico da brucelose por *B. abortus* ou *B. melitensis*, este teste apresenta uma especificidade de 100%. Um resultado positivo está relacionado com a presença efetiva de brucellae.

O teste intradérmico, “Skin test”, utilizado apenas em bovinos e suínos, consiste na inoculação intradérmica de um extrato antigénico purificado de *B. abortus* (brucelina). A leitura da reação faz-se 48 horas depois da inoculação. Esta prova não dá reações falsas positivas, sendo atualmente considerada, tal como o diagnóstico bacteriológico, uma prova de excelência para confirmação da infeção a nível individual. ☹

### Referências Bibliográficas

- Alton, G.G. (1990). *Brucella suis*. In: *Animal Brucellosis*. Nielsen & Duncan (Eds.). CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Direção-Geral de Alimentação e Veterinária. <http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV>.
- Ducrotoy, M.J.; Conde-Álvarez, R.; Blasco, J.M.; Moriyón, I. (2016). A review of the basis of the immunological diagnosis of ruminant brucellosis. *Vet Immunol Immunopathol*, 171:81-102.
- Ferreira, A.C.; Corrêa de Sá, M.I.; Dias, R. e Tenreiro, R. (2017). MLVA-16 typing of *Brucella suis* biovar 2 strains circulating in Europe. *Veterinary Microbiology*, 210C, pp. 77-82.
- Ferreira, A.C.; Corrêa de Sá, M.I. (2014). Análise do Número Variável de Repetições Nucleotídicas em Múltiplos Loci (MLVA): aplicação ao estudo epidemiológico de isolados de *Brucella melitensis*. In: *Abordagens Moleculares em Veterinária*, Ed. LIDEL – Edições Técnicas LDA, cap. 30, pp. 337-345.
- Ferreira, A.C.; Almendra, C.; Cardoso, R.; Silva Pereira, M.; Beja-Pereira, A.; Luikart, G. e Corrêa de Sá, M.I. (2012). Development and evaluation of a selective medium for *Brucella suis*. *Res. Vet. Sci.* 93: 565-567.
- Le Flèche, P.; Jacques, I.; Grayon, M.; Al Dahouk, S.; Bouchon, P.; Denoed, P.; Nöckler, K.; Neubauer, H.; Guilleoteau, L.A. e Vergnaud, G. (2006). Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiology*, 6:9-22.
- López-Gofí, I.; García-Yoldi, D.; Marín, C.M.; de Miguel, M.J.; Barquero-Calvo, E.; Guzmán-Verri, C.; Albert, D.; Garin-Bastuji, B. (2011). New Bruce-ladder multiplex PCR assay for the biovar typing of *Brucella suis* and the discrimination of *Brucella suis* and *Brucella canis*. *Vet Microbiol*, 154(1-2):152-5.
- López-Gofí, I.; García-Yoldi, D.; Marín, C.M.; de Miguel, M.J.; Muñoz, P.M.; Blasco, J.M.; Jacques, I.; Grayon, M.; Cloeckert, A.; Ferreira, A.C.; Cardoso, R.; Corrêa de Sá, M.I.; Walravens, K.; Albert, D.; Garin-Bastuji, B. (2008). Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains. *J Clin Microbiol*, 46(10):3484-7.
- Scholz, H.C.; Vergnaud, G. (2013). Molecular characterization of *Brucella* species. *Rev sci tech Off int Epiz*, 32(1):149-162.
- Whatmore, A.M.; Koylass, M.S.; Muchowski, J.; Edwards-Smallbone, J.; Gopaul, K.K.; Perrett, L.L. (2016). Extended Multilocus Sequence Analysis to Describe the Global Population Structure of the Genus *Brucella*: Phylogeography and Relationship to Biovars. *Front Microbiol*, 7:2049.
- World Organisation for Animal Health (OIE), 2016. *Brucellosis (Brucella abortus, B. melitensis and B. suis)*. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, chapter 2.01.04, 1-44.