

Seroprevalência da Brucelose nos últimos cinco anos na Unidade de Saúde do Alto-Minho

Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto

Instituto Politécnico do Porto

Rafael Lima Gianformaggio

# Seroprevalência da Brucelose nos últimos cinco anos na Unidade Local de Saúde do Alto-Minho

Mestrado Tecnologia Bioquímica em Saúde

Setembro 2014

Seroprevalência da Brucelose nos últimos cinco anos na Unidade de Saúde do Alto-Minho

Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto

Instituto Politécnico do Porto

Rafael Lima Gianformaggio

## Seroprevalência da Brucelose nos últimos cinco anos na Unidade Local de Saúde do Alto-Minho

Dissertação submetida a Escola Superior de Tecnologia a Saúde do Porto para cumprimento dos requisitos necessários a obtenção do grau de Mestre em Tecnologia Bioquímica em Saúde realizada sob orientação científica da Professora Doutora Cristina Prudêncio e Doutora Mónica Vieira e orientação externa Dr. Mota Freitas.

Setembro 2014

## **Agradecimentos**

*A verdadeira medida de um homem não é como ele se comporta em momentos de conforto e conveniência... mas como ele se mantém em tempos de controvérsia e desafio. (Martin Luther King)*

À administração da Unidade Local de Saúde do Alto-Minho pelo facto de permitir esta experiência enriquecedora e consequentemente a dissertação da tese.

À todos os colaboradores que dela fizeram parte, com especial carinho ao Dr. Mota Freitas, diretor do serviço de Patologia Clínica, por todo apoio e incentivo durante o estágio.

Pela ajuda, dedicação e ensinamento quero agradecer a Dra. Sandra Vieira, Dra. Ana Queiroz, Dr. Ricardo Luz e José Carlos Amorim.

Por toda a paciência e atenção prestada durante as técnicas de diagnóstico e terapêutica, quero agradecer a Sra. Elisa Torres e a Sra. Olinda Carvalhido.

À todos os Docentes da Escola Superior de Tecnologia e Saúde do Porto pelo facto de me concederem os ensinamentos necessários para a realização do estágio e dissertação da tese.

Em especial, a Dra. Cristina Prudêncio, Dra. Mónica Vieira e ao Dr. Ruben Fernandes por todo o tempo dispensado para me ajudar na elaboração da tese e todos os conhecimentos adquiridos ao longo do Mestrado.

Aos meus pais pela oportunidade de realizar esta tese de dissertação.

A todos os familiares e amigos que sempre estiveram presente, em especial, ao amigo José Castilho.

## Resumo

A brucelose é uma zoonose com elevada importância, causada por bactérias gram-negativas que são altamente patogênicas para uma grande variedade de animais e humanos. Existem zonas endêmicas onde esta se prolifera com mais facilidade. Neste estudo os dados são relativos ao distrito de Viana do Castelo, os dados são recolhidas da base de dados da Unidade Local de Saúde do Alto-Minho, uma zona não considerada endêmica. Os animais infetados são a principal fonte de contaminação e dispersão da brucelose, é necessário uma reduzida carga bacteriana para ocorrer a infeção. Trata-se de uma doença que está longe de ser erradicada, impondo-se tomar medidas preventivas em relação à contaminação.

Os testes usados na sua deteção podem ser alterados e melhorados de acordo com o estágio da doença. Na ULSAM são usados o teste de Wright e eventualmente a pesquisa microbiológica da bactéria *Brucella*. É pertinente saber o número de testes positivos que ocorrem por ano, se existe alguma sazonalidade relacionada com a doença, assim como, relacionar os parâmetros bioquímicos com um teste de Wright positivo. Os dados foram recolhidos entre o ano 2009-2013 com um número total de testes de 1035, dos quais o número total de positivos para o teste são 102, mas apenas trinta são positivos com significância. Os dados foram recolhidos através do programa Clinidata utilizado como base de armazenamento de dados da ULSAM e foram tratados estatisticamente com o programa SPSS juntamente com o Excel.

Este estudo permitiu concluir que o número de casos em 2009 e 2010 era superior aos restantes anos, o que descreve uma tendência para diminuição do número de casos de brucelose atualmente no distrito de Viana do Castelo. Em relação a sazonalidade, os meses que apresentam uma percentagem superior a 50% em relação seroprevalência são os meses de Junho, Novembro e Dezembro. Os resultados revelam como declarado pela Organização Mundial de Saúde que o Distrito de Viana do Castelo não é uma zona endêmica. Através da análise estatística foi possível concluir que um dos parâmetros bioquímicos, neste caso o número de leucócitos, poderá estar diretamente relacionado com um teste de Wright positivo, uma vez que, 37% da amostra de testes positivos revelam leucopenia.

**Palavras-chave:** Brucelose; *Brucella melitensis*; Wright-Test; Seroaglutinação; Seroprevalência

### **Abstract**

Brucellosis is a serious disease, caused by gram-negative bacteria that are highly pathogenic to a variety of animals and humans. It is a zoonotic disease, which manifests by infections in humans in direct or indirect contact with animals. There are endemic areas where it proliferates more easily due to contact with the animals especially at the professional level. Infected animals are the main source of contamination and spread of brucellosis, being enough a reduced bacterial load infection to occur. Since it is a disease that is far from being eradicated, preventive measures against contamination are required.

In this study the data are relative to the region of Viana do Castelo, having been collected from the database of the Local Health Unit of Alto Minho (ULSAM). The tests used in detection may be modified and enhanced according to the disease stage. In ULSAM are used the test of Wright and, in some caeses, microbiological research brucella bacteria. It is worth knowing the number of positive tests that occur per year if a seasonally related disease exists, as well as the biochemical relationship with a positive test of Wright parameters. Data were collected between 2009 and 2013 with a total of 1035 trials, being 102 the total number of positive results for the test; however, only thirty are negative tests with significance.

This study concluded that the number of cases in 2009 and 2010 was higher than the other years, which describes a tendency to decrease the number of cases of brucellosis currently in the district of Viana do Castelo. Regarding seasonality, the months have a higher percentage at 50% compared seroprevalence are the months of June, November and December. The results reveal as stated by the World Health Organization that the District of Viana do Castelo is not an endemic area. By statistical analysis it was concluded that one of the biochemical parameters, the number of leukocytes may be directly associated with a positive test Wright, 37% of the positive test sample showed leukopenia.

**Key-Words: Brucelosis; Brucella melitensis; Wright-Test; Seroagglutination; Seroprevalence**

## Índice

1. Revisão Bibliográfica.....	7
1.1 Abordagem Histórica.....	7
1.2 Incidência da Brucelose .....	9
1.3 Agente etiológico.....	10
1.3.1 Taxonomia da bactéria.....	10
1.3.2 Características Bioquímicas .....	12
1.3.3 Isolamento da <i>Brucella</i> .....	12
1.4 Reservatório da infecção.....	13
1.5 Meios de transmissão .....	15
1.5.1 Transmissão de pessoa para pessoa.....	15
1.5.2 Transmissão através de Produtos Alimentares .....	15
1.5.3 A transmissão através do ambiente contaminado .....	16
1.5.4 Transmissão pela exposição ocupacional .....	17
1.5.5 Fatores de sazonalidade.....	18
1.5.6 Distribuição por sexo e idade.....	19
1.5.7 Brucelose adquirida ao viajar .....	19
1.5.8 Bioterrorismo .....	19
1.6 Patogénese.....	21
1.6.1 Genética molecular.....	21
1.6.2 Composição antigénica.....	21
1.6.3 Patogénese molecular .....	21
1.6.4 Fatores de Virulência .....	25
1.7 Quadro Clínico .....	27
1.8 Diagnóstico Laboratorial .....	29
1.8.1 Testes serológicos aplicados no diagnóstico da Brucelose .....	30
1.8.2 Diagnostico Microbiológico de Brucela .....	33
2. Metodologia.....	35
2.1 Base de dados.....	35
2.2 Metodologia aplicada a estatística.....	36
3. Resultados.....	37

3.1 Resultados/Ano .....	38
3.2 Distribuição do numero de casos por ano .....	39
3.3 Seroprevalência de 2009-2013 .....	40
3.4 Sazonalidade 2009-2013 .....	41
3.5 Análise descritiva/SPSS .....	42
4. Discussão .....	47
5. Conclusão .....	51
6. Revisão Bibliográfica .....	52
ANEXOS .....	56
Anexo I: Dados relativos a seroprevalência da brucelose em 2009 .....	57
Anexo II : Dados relativos a seroprevalência da brucelose em 2010 .....	58
Anexo III: Dados relativos a seroprevalência da brucelose em 2011 .....	59
Anexo IV: Dados relativos a seroprevalência da brucelose em 2012.....	60
Anexo V: Dados relativos a seroprevalência da brucelose em 2013 .....	61
Anexo VI: Procedimento laboratorial do teste de Wright.....	62

## Índice de Abreviaturas

<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de Carbono
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>IFI</b>	Imunofluorescência Indireta
<b>IFN</b>	Interferona
<b>IgA</b>	Imunoglobulinas A
<b>IgG</b>	Imunoglobulinas G
<b>IgM</b>	Imunoglobulinas M
<b>LEU</b>	Leucócitos
<b>LPS</b>	Lipopolissacáridos
<b>ml</b>	Mililitros
<b>PCR</b>	Proteína C Reativa
<b>PMN</b>	Neutrófilos polimorfos nucleares
<b>RT-PCR</b>	Reação em Cadeia de Polimerase em Transcriptase Reversa
<b>SAT</b>	Teste de Seroaglutinação
<b>spp</b>	Espécie
<b>ULSAM</b>	Unidade Local de Saúde do Alto-Minho
<b>um</b>	Micrómetros
<b>VS</b>	Velocidade de Sedimentação
<b>WHO</b>	Organização Mundial de Saúde

## Índice de Quadros

<b>Quadro 1:</b> Análise descritiva da Proteína C reativa .....	42
<b>Quadro 2:</b> Análise descritiva dos do número de leucócitos.....	43
<b>Quadro 3:</b> Análise descritiva da velocidade de sedimentação .....	44
<b>Quadro 4:</b> Teste da normalidade .....	45
<b>Quadro 5:</b> Teste de variâncias .....	45
<b>Quadro 6:</b> Teste Mann-Whitney.....	46

## Índice de Figuras

Figura 1- Taxa de incidência (/100000 pessoas ano) de casos de brucelose (CID10A23) declarados na região Norte de Portugal no quinquénio 2000 – 2004, por concelho ..... 9

Figura 2: Representação da membrana de Lipopolissacáridos (LPS). ..... 24

Figura 3: Representação esquemática da invasão da *Brucella* pelo trato digestivo. Penetra nas células M e conseqüentemente é transportada pelos macrófagos associados tecido linfoide (MALT) diretamente para os nódulos linfáticos e posteriormente para os sítios sistémicos, onde se replica e estabelece os fatores de virulência. .... 26

## Índice de Tabelas

Tabela 1: Classificação taxonómica da *Brucella*..... 11

Tabela 2: Potencial zoótico e respetivo hospedeiro de diversas espécies de *Brucella* ... 14

Tabela 3: Antígenos e isótopos de imunoglobulinas nos testes serológicos ..... 29

Tabela 4: Brucelose: Diagnóstico serológico em função do estado evolutivo ..... 33

## Índice de Gráficos

Gráfico 1: Distribuição do número de casos positivos de brucelose entre o ano 2009- 2013. .....	39
Gráfico 2: Seroprevalência da brucelose entre o ano 2009 e 2013.....	40
Gráfico 3: Sazonalidade da brucelose expressa do ano 2009 a 2013 .....	41

## 1. Revisão Bibliográfica

### 1.1 Abordagem Histórica

A origem histórica da Brucelose não surge simplesmente com o isolamento e identificação da *Brucella melitensis* no final do século XIX. Existem vários relatos históricos anteriores a data da identificação e isolamento da brucelose, incluindo casos endêmicos de abortos em animais e febre em humanos. Surge também a descrição de abortos em animais em referências bíblicas, umas das descrições de brucelose mais antigas foi descrita por Marston em 1859. (Rahman et al., 2006)

No estudo e descrição da brucelose, a medicina militar teve um importante impacto, em 1751, um cirurgião militar britânico destacado na ilha de Menorca no Mediterrâneo, descreveu casos crônicos de febre e má disposição e citou que Hipócrates descreveu casos similares de doença há mais de 2000anos atrás. (Purcell, Hoover, & Friedlander, 2006)

A brucelose foi descrita como uma doença do Homem no início do século XIX, na ilha de Malta localizada no Mar Mediterrâneo, por isso também denominada por febre-de-malta, foi descrita com base em casos de febre ondulante e posterior morte dos indivíduos. (Rahman et al., 2006)

Foi Jeffery Allen Marston que em 1859 fez pela primeira vez a descrição clínica da doença. Alguns anos depois em 1887 David Bruce procedeu ao isolamento do agente etiológico, onde lhe chamou inicialmente de “*Micrococcus melitensis*” e mais tarde em sua homenagem foi renomeado para “*Brucella melitensis*” (Al-Jasser & Al-Anazi, 2012).

Já no século XX, Themistocles Zammit, no ano 1905 conseguiu provar que o agente etiológico se encontrava no leite de cabras através do seu isolamento. (Mohamed, 2009) Após o isolamento da *Brucella* em leite de cabra, em 1917, Bang e Stribolt, dois veterinários da zona, conseguiram isolar a bactéria causadora de abortos espontâneos em bovinos, denominada por “*Brucella abortus*” (Meyer, Meagher, & Margaret, 1994).

Em 1918, Alice Evans, uma investigadora norte americana propôs demonstrar todas as semelhanças existentes na cultura e morfologia da *Brucella melitensis* isolada por Bruce e pela *Brucella abortus* isolada por Bang, com todas as semelhanças existentes e comprovadas, em 1920 Meyer e Shawn sugeriram a criação do género *Brucella* em honra do falecido David Bruce. (Al-Jasser & Al-Anazi, 2012)

Em 1924, Orpen documentou a existência da infecção por parte da *Brucella abortus* em humanos na Inglaterra. Estudos semelhantes a estes foram relatados por Otero em Puerto Rico. No ano de 1914 Traum isolou a *Brucella suis* proveniente de fetos abortados por suínos.

Quase três décadas depois, em 1953, Van Drimmelen identificou em ovinos a *Brucella ovis*, quatro anos mais tarde em 1957 Stoenner e Lackmann identificaram em animais roedores a *Brucella neotomae*.

Em 1964, Carmichael and Bruner detetaram em cães a *Brucella canis*. Já em 1994 Ewalt, Ross e seus colegas identificaram duas espécies de *Brucella*, nomeadamente, *Brucella pinnediae* e a *Brucella cetacear* em baleias e golfinhos.

Em 1979, a WHO (Organização Mundial de Saúde), criou uma unidade de controlo denominada por centro de controlo de Zoonoses no Mediterrâneo, sediada em Atenas-Grécia. (Al-Jasser & Al-Anazi, 2012)

Em 1993 a WHO, organizou um programa de erradicação de brucelose nas zonas endémicas da doença pois a brucelose foi considerada uma das zoonoses mais difundidas pelo mundo com efeitos nefastos nos humanos e principalmente na indústria e criação animal. Para reduzir ou controlar a disseminação da brucelose é necessária uma constante vigilância nas áreas do Mediterrâneo. A guerra civil, a fome e os desastres naturais criam condições para que doenças “antigas” voltem a surgir. (Wyatt & Vivian, 2009)

## 1.2 Incidência da Brucelose

A incidência de brucelose apresenta uma desigual distribuição regional, verificando-se incidências superiores em sociedades agrárias, devido ao menor controlo do manuseamento de produtos para animais (Saúde, 2005).

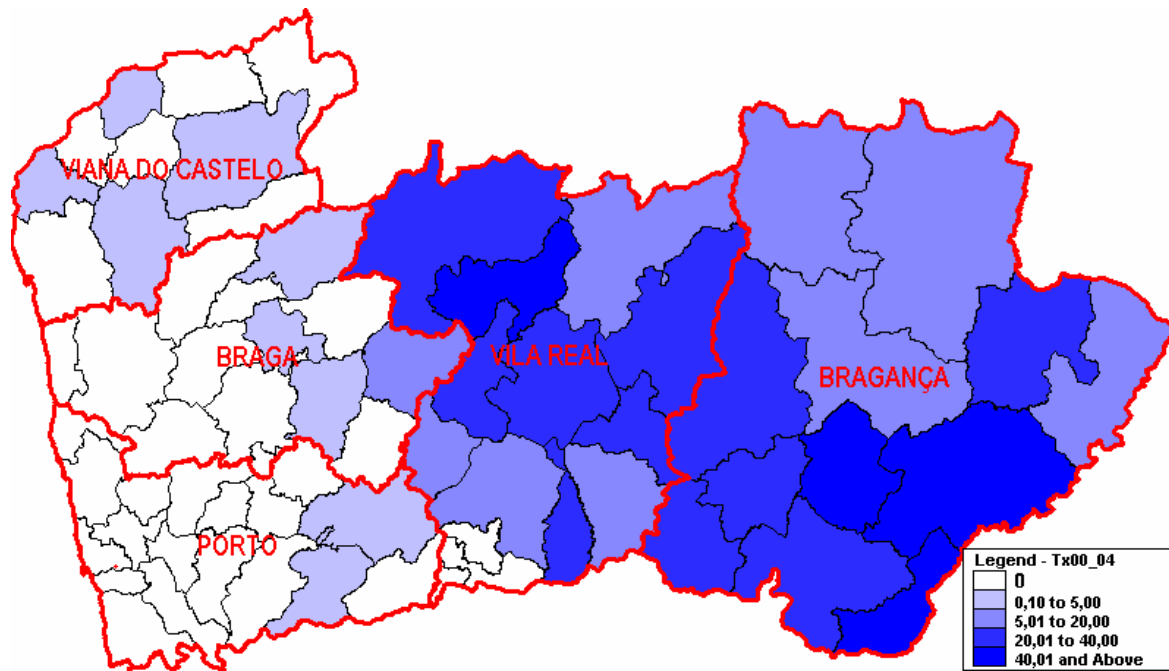


Figura 1- Taxa de incidência (/100000 pessoas ano) de casos de brucelose (CID10A23) declarados na região Norte de Portugal no quinquénio 2000 – 2004, por concelho. (Saúde, 2005)

A distribuição preferencial das zoonoses (brucelose e febre escaro-nodular) nos distritos do interior (Bragança e Vila Real) justifica o planeamento de ações integradas específicas desses distritos e envolvendo os Serviços de Veterinária (Saúde, 2005).

### 1.3 Agente etiológico

#### 1.3.1 Taxonomia da bactéria

*Brucella* é o agente etiológico da brucelose humana e animal. A família Brucellae pertence as bactérias gram-negativas, coram de vermelho usando a técnica de coloração Ziehl Neelsen e apresentando-se na forma de cocobacilos ou bastonetes curtos com tamanho variável entre 0,5-0,7-0,6-1,5 µm. (Banai & Corbel, 2010).

São patogéneos que não se multiplicam no ambiente mas no entanto são transmitidos diretamente de hospedeiro para hospedeiro. (Xavier, 2009)

In vivo, a *Brucella* spp não possui motilidade e vive como um organismo intracelular facultativo. São agentes patogénicos das células reticuloendoteliais dos mamíferos marinhos e terrestres. Os mecanismos de virulência e sobrevivência da *Brucella* no interior de fagócitos permanece parcialmente um enigma, uma vez que ainda não foi demonstrado que produza fatores de virulência, tais como, cytolisina, capsulas, exotoxinas, secretores de protéases, pili e/ou fimbriae, flagelos, toxinas e plasmídeos víricos, tal como foi demonstrado em outras bactérias. No entanto já foi demonstrado que a *Brucella* tem um fator de virulência envolvendo uma secreção do tipo IV.

Além disso, a *Brucella* tem um sistema de secreção do tipo III flagelar que se baseia num conjunto de 44 genes distribuídos em 3 loci, respectivamente, nos ChrII, *motB* e *flgJ*, localizados em diferentes regiões do ChrI entre as 3 principais espécies.

O facto de não ter motilidade é explicado pela inativação de alguns genes responsáveis pelo flagelos e pela ausência de sistemas quimiotáticos. Apesar da ausência de motilidade, a presença destes genes nos cromossomas, revela-se importante em experiencias laboratoriais com roedores mas não no caso da infeção da cultura celular.

É aceite pela comunidade científica que as diferenças na expressão potencial do flagelo possam explicar a adaptação da *Brucella* aos diferentes hospedeiros. (Banai & Corbel, 2010)

O género *Brucella* pertence à família das *Brucellaceae* (família III) juntamente com o *Mycoplana* e o *Ochrobactrum*, da ordem dos Rhizobiales na classe dos Alphaproteobacteria da filo Proteobacteria representadas na tabela1. Os membros desta

classe incluem famílias de organismos que podem ser simbioses ou patogênicos de plantas/mamíferos. Entre os organismos que afectam os mamíferos na classe das Alphaproteobacteria encontram-se as *Bartonella*, *Rickettsia* e *Ehrlichia*, todas elas se transmitem por vetores.

A pequena dimensão do genoma destes organismos é consistente com a sua sobrevivência intracelular, ainda que esta propriedade não defina necessariamente a transmissão por vetor de inseto (ex: *Coxiella*)

As características que distinguem a *Brucella* da maioria dos géneros da ordem dos Rhizobiales, incluem a infeção de células de mamíferos, uma característica partilhada apenas com a classe das *Bartonella*. No entanto, existem diferenças significativas entre estes dois patogênicos, sendo que a *Bartonella* é um patógeno intracelular obrigatório e a *Brucella* é facultativa: o genoma da *Brucella* spp. é de 50-100% maior do que o genoma da *Bartonella* e este mantém funções metabólicas semelhantes as do patogênicos de plantas. (Ficht, 2010)

**Tabela 1: Classificação taxonómica da *Brucella* (Ficht, 2010)**

<b>Classificação hierárquica da <i>Brucella</i></b>	
<b>Nível taxonómico</b>	
<b>Reino</b>	Bacteria
<b>Filo</b>	Proteobacteria
<b>Classe</b>	Alphaproteobacteria
<b>Ordem</b>	Rhizobiales
<b>Família</b>	Brucellaceae
<b>Género</b>	<i>Brucella</i>

### 1.3.2 Características Bioquímicas

São microrganismos com condições favoráveis de crescimento a um pH entre 6,6 e 7,4 e com uma temperatura ótima de 37 °C. (Sbriglio, Sbriglio, & Sainz, 2007)

São estritamente aeróbios, tendo uma cadeia de transporte de elétrons com base nos citocromos onde utilizam o oxigênio e o nitrato como aceitador final de elétrons. Todas as espécies hidrolizam a ureia, excepto a *B. ovis*. Em relação a membrana celular externa é similar à de outros bacilos Gram-negativos São catalase e oxidase positivos e apesar de ser considerado um organismo exigente pelas carências de cultura pode crescer em meios carentes de nutrição. Trata-se de um organismo patogénico intracelular facultativo. (Sbriglio, Sbriglio, & Sainz, 2007)

### 1.3.3 Isolamento da *Brucella*

O isolamento deste microrganismo é preferencialmente executado em meio solido, exceto para as amostras de sangue. A cultura da *Brucella* spp. em meio solido auxilia a identificação e reconhecimento das colonias, evitando a interferência de microrganismos causadores de contaminação. O crescimento das colonias exige no mínimo 48 horas de incubação para a visualização das mesmas, temperatura ótima de crescimento é de 37°C e o pH é de 6.7-7.4. (Sbriglio, Sbriglio, & Sainz, 2007)

Após 96 horas, o diâmetro atinge 1 a 2 mm, continuando aumentar. No entanto meio líquido é também usado e mais vantajoso no caso clínico, onde o número de bactérias é muito reduzido no sangue ou tecidos. (Alton et al., 1988)

O meio de cultura é essencialmente composto por peptona, cloreto de sódio, extrato de carne, agua e agar. Para um isolamento primário são acrescentados ao meio seletivo ciclohexina, bacitracina, polimixina B, vancomicina, acido nalidíxico, e nistatina. Em alguns casos, existem amostras que exigem CO<sub>2</sub>, soro, tiamina, nicotinamida e biotina nos meios de cultura para estimular o seu crescimento, uma vez que é considerado lento.

O número de bactéria de *Brucella* presente nas amostras é frequentemente baixo, sendo necessário isolar um maior número de placas ou então utilizar um meio de cultura de duas fases, fase solida e liquida num só frasco. (Alton et al., 1988)

#### 1.4 Reservatório da infecção

O principal reservatório de infecção da brucelose são os animais infetados, sendo descrita como uma zoonose. As principais espécies afetadas pela *Brucella* são as cabras, ovelhas e os porcos, com menor significância geral os camelos, vacas, cães, cavalos entre outros, dependendo da região, pois existem regiões endêmicas.

Recentemente a infecção foi encontrada em animais marinhos, tais como golfinhos e focas, estes animais representam um risco significativo para todos os profissionais que lidam diretamente com estes animais, com elevado risco potencial de contaminação através do tecido. (Corbel, 2006)

O risco e severidade da doença dependem essencialmente do tipo de estirpe de *Brucella*, assim como o hospedeiro exposto ao agente patogénico. A *Brucella melitensis* é a espécie de *Brucella* maioritariamente encontrada na infecção de humanos e consequentemente isolada. É uma espécie extremamente virulenta, responsável pela manifestação da brucelose aguda em diversas regiões endêmicas e diversos países. (Corbel, 2006)

Geralmente esta espécie de organismo está associado às infeções provenientes de gado caprino e ovino. Em alguns países do Médio Oriente, esta infecção é particularmente um problema grave. A infecção Bovina, causada pela *B. bovis*, é causadora de inúmeros problemas de contaminação, uma vez que os bovinos produzem uma elevada quantidade de leite que pode ser distribuído por inúmeras pessoas. Outra situação problemática dos bovinos é direcionada ao número de abortos ou crias já infetadas. (Corbel, 2006)

A *B. abortus* é causa de infecção mais comum, não no caso dos humanos, no entanto entre os animais, quando ocorre nos humanos é considerada menos grave do que aquela infetada pelo *B. suis* e *B. melitensis*. (Corbel, 2006)

A *B. suis* ocorre de forma muito mais restrita do que a ocorrência da *B. melitensis* e *B. abortus*. Pode ser tão severa quanto a *B. melitensis*, a virulência varia de acordo com o biótipo. *B. canis* é responsável pela infecção causada em cães e raramente causadora de infecção em humanos. (Corbel, 2006)

Conhecem-se cerca de 9 espécies diferentes, as mais relevantes são *Brucella*: *B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus*, *B. canis*, *B. ovis* e *B. neotomae*, representadas na tabela 2,

sendo as quatro primeiras responsáveis pela maioria dos casos de doença humana. (Xavier et al, 2010)

**Tabela 2: Potencial zootico e respetivo hospedeiro de diversas espécies de *Brucella* (Xavier et al, 2010).**

Espécies	Potencial zootico	Hospedeiro
<i>Brucella melitensis</i>	Elevado	Caprino, Ovino
<i>Brucella suis</i>	Moderado	Porco
<i>Brucella abortus</i>	Moderado	Bovino
<i>Brucella canis</i>	Fraco	Cão
<i>Brucella ovis</i>	Ausente	Caprino
<i>Brucella neotomae</i>	Ausente	Rato ( <i>Neotomae lepida</i> )

O conhecimento da fonte da infeção é essencial, no sentido de prevenir a exposiçao face ao animal infetado, e consequentemente, impedir a infeção no ser humano (Hipólito, Silva, & Santos, 2009).

## **1.5 Meios de transmissão**

Os animais infetados são a principal fonte de contaminação e dispersão da brucelose, é necessário uma reduzida carga bacteriana para ocorrer a infeção.

A contaminação ocorre em maior parte dos casos por ingestão de alimentos, nomeadamente, lacticínios ou derivados contaminados. No entanto, esta pode ser contraída por diversas formas desde o contacto com material contaminado como sangue, fezes, fetos entre outros, assim como aerossóis na limpeza de estábulos ou movimentação de gado ou laboratórios, na inoculação acidental durante a vacinação dos animais. Existem também relatos na literatura de transmissão entre pessoas sexual, transfusão de sangue e transplante de medula óssea. *Brucella* spp pode permanecer viável na água e no solo húmido mais de 10 semanas. São inúmeras as formas de transmissão de brucelose. (Doganay & Doganay, 2013)

### **1.5.1 Transmissão de pessoa para pessoa**

É extremamente rara. Têm sido relatados casos ocasionais em que as evidências sugerem um contacto próximo ou sexual como meio de transmissão. O maior risco de transmissão é através da doação de sangue ou transplante de tecidos, particularmente da medula óssea. É aconselhável que os indivíduos doadores de sangue e tecidos sejam alvo de despiste da brucelose, assim como os indivíduos com historial recente de infeção sejam excluídos. (Corbel et al., 2010)

Uma vez que a doença é raramente transmitida de pessoa para pessoa, os médicos que cuidam de pacientes que padecem de brucelose não são considerados um grupo de risco, mas devem ser tomadas todas as precauções, nomeadamente, no processamento de amostras. (Mesner et al., 2007)

### **1.5.2 Transmissão através de Produtos Alimentares**

Esta é a forma mais comum de transmissão de brucelose entre as populações urbanas. A ingestão de leite fresco ou lacticínios não pasteurizados é a principal fonte de infeção de muitas populações. Leite de vaca, ovelha, cabra, ou camela contaminada com *B. melitensis* é particularmente perigosa, uma vez, que é consumido em volumes substanciais

e pode conter um elevado número de microrganismos. Manteiga, natas ou gelados preparados com leite contaminado também apresentam um elevado risco. Queijo fresco preparado com leite de ovelha ou cabra e adição de coalhos são uma fonte particularmente comum de infeção no Mediterrâneo e no Médio Oriente. O processo de fabrico do queijo pode de facto concentrar microrganismos de *Brucella*, os quais podem sobreviver durante meses neste género de produtos lácteos, estes produtos devem ser armazenados em ambiente refrigerado durante pelo menos 6 meses antes do seu consumo. (Corbel, 2006)

O queijo curado preparado com fermentação láctica ou propiónica apresenta riscos muito menores. Do mesmo modo, o iogurte e o leite azedo são menos perigosos. A *Brucella* é eliminada rapidamente quando a acidez tem um pH inferior a 4 e muito rapidamente quando a acidez tem um pH inferior a 3,5. O equipamento usado no transporte/processamento de leite contaminado ou outra matéria-prima pode contaminar produtos não contaminados a menos que se respeitem todas as boas práticas de higienização. (Corbel, 2006)

Produtos a base de carne estão menos frequentemente associados a infeção, porque não são normalmente ingeridos crus. No entanto esta não é uma prática desconhecida entre os profissionais desta área. O tecido muscular normalmente contém baixas concentrações de organismos de *Brucella*, mas o fígado, rins, baço, úbere e testículos podem conter concentrações superiores. Em algumas culturas os pratos preparados a partir destes órgãos podem ser ingeridos crus ou mal passados. O sangue fresco, ingerido sozinho ou acompanhado com leite, apresenta um elevado risco potencial de infeção. (Corbel, 2006)

Em muitos países o consumo de produtos sem tratamento tornou-se moda. Estes incluem frequentemente leite ou lacticínios não pasteurizados e podem colocar em risco a população. Há uma frequente resistência em aceitar a ideia de que tais “produtos saudáveis” possam ser perigosos, os legumes frescos podem ser contaminados por animais infetados e representam um perigo. Em áreas endémicas os turistas que consomem produtos típicos correm um risco particular. (Corbel, 2006)

### **1.5.3 A transmissão através do ambiente contaminado**

É difícil de documentar mas provavelmente ocorre mais frequentemente do que é reconhecido. A *Brucella* spp. pode sobreviver durante períodos longos na poeira, nos

excrementos, na água, na lama, nos fetos abortados, no solo, na carne e nos laticínios. A duração exata da sobrevivência depende de muitas variáveis a natureza do substrato, nº de organismo, a temperatura, o pH, a luz solar, a presença de outros contaminantes microbianos. (Corbel, 2006)

Os animais infetados que se deslocam em áreas povoadas ou que se são mantidos em cativeiros junto das habitações podem contaminar ruas, pátios ou mercados, especialmente se ocorrerem abortos.

A inalação da brucelose pode resultar da exposição a poeiras contaminadas, excremento seco entre outros. Os poços e as fontes de água podem também ser contaminados por animais que tenham abortado recentemente ou por água da chuva que escorre de áreas contaminadas. (Corbel, 2006)

#### **1.5.4 Transmissão pela exposição ocupacional**

Certas profissões estão associadas a um elevado risco de infeção por brucelose. Dentro destas, destacam-se as pessoas que trabalham na pecuária, especialmente com o gado bovino, ovino, caprino e suíno: agricultores e pastores, ou mesmo veterinários, correm risco através do contato direto com animais infetados ou através da exposição ao ambiente altamente contaminado. A infeção pode ocorrer através da inalação, ingestão acidental, contaminação da pele – especialmente através de cortes ou ferimentos, e auto inoculação acidental através de vacinas. Os familiares dos agricultores e os trabalhadores que tratam dos animais correm igualmente risco uma vez que a exposição doméstica está em muitos casos associada à exposição profissional, quando os animais são mantidos em cativeiro junto das habitações. Em certas áreas, os animais são mantidos nos pátios das casas e podem mesmo ter acesso ao seu interior, especialmente quando o clima é adverso. No caso de animais que tenham recentemente abortado, a infeção pode alastrar-se a toda a habitação. O uso de esterco em práticas domésticas pode igualmente contribuir para a infeção das habitações. Deve ser assinalado que se encontram casos de brucelose entre famílias ou grupos tribais, normalmente associados a contaminação através de alimentos, frequentemente após um surto da doença entre os animais. As crianças podem estar particularmente em risco uma vez que podem adotar como animais de estimação crias acabadas de nascer ou doentes. Em certas áreas, apresentam-se mesmo como o único grupo com sintomas agudos, uma vez que os membros mais velhos da comunidade ou são imunes

ou se encontram cronicamente infetados. Indivíduos envolvidos no processamento de produtos animais encontram-se igualmente em risco por exposição à brucelose.

A contaminação direta e ambiental apresenta-se perigosa através da inalação, ingestão, contaminação da mucosa e através do contacto ou penetração da pele. O risco dos profissionais associados à agricultura e indústria agroalimentar é normalmente desvalorizado mas o perigo de contaminação ambiental é elevado. O pessoal dos laboratórios envolvidos na cultura da *Brucella* correm particular risco. Em certos países em que a brucelose já não é endémica, este perigo potencial pode ser desvalorizado ou considerado irrelevante; no entanto, a atuação durante os procedimentos de diagnóstico com pacientes sobre os quais não recaiam suspeitas de ter contraído a doença, pode conduzir à cultura de organismos difíceis de identificar até que a infeção por via laboratorial permita atingir o nível de suspeição. O recurso a sistemas de galerias como teste para identificação rápida tem conduzido a erros de identificação, confundindo estirpes de *Brucella* com *Moraxella spp*, com sérias consequências para os indivíduos que aí trabalham. A inalação de aerossóis gerados a partir da manipulação de culturas apresenta o maior risco, especialmente quando as embalagens quebram durante os processos de centrifugação. A preparação e o uso de vacinas são igualmente perigosos uma vez que estirpes como *B. abortus* S19 and *B. melitensis* Rev 1 não são completamente avirulentas em humanos. A vacina *B. abortus* RB 51 parece ser de baixa patogenicidade mas apresenta ainda um risco potencial através da injeção acidental e é resistente à rifampicina. O uso de estirpes virulentas na preparação de antigénios de diagnóstico deveria ser evitado sempre que possível. (Corbel, 2006)

### **1.5.5 Fatores de sazonalidade**

Em países com climas temperados ou frios, há uma marcada variação sazonal na incidência da brucelose aguda, verificando-se que a maioria dos casos ocorre na primavera e no verão. Este facto coincide com o pico da ocorrência de abortos e partos na pecuária e o consumo do leite. O efeito sazonal é mais óbvio no caso da brucelose ovina e caprina, possivelmente devido ao período mais longo de lactação. Em áreas tropicais e subtropicais, onde a reprodução dos animais ocorre durante todo o ano, não se encontra uma influência sazonal na incidência da brucelose. (Corbel, 2006)

### **1.5.6 Distribuição por sexo e idade**

Em países industrializados e em países onde a conservação dos alimentos previne a transmissão de brucelose através de produtos alimentares, a doença é em grande medida profissional e a maioria dos casos trata-se de indivíduos do sexo masculino com idades entre os 20 e os 45 anos. Nestas situações, a doença é normalmente causada por brucelose abortus e brucelose suis. Em países ou áreas onde a brucelose melitensis é prevalente, as praticas usadas no comércio e distribuição de laticínios de ovelha e cabra dificultam a aplicação de medidas de higiene.

Nesta situação toda a população esta em risco e ocorrem muitos casos entre mulheres e crianças. Em sociedades nómadas, os adultos ficam muitas vezes expostos a infeção a partir de uma idade muito precoce e não manifestam a doença aguda embora muitos possam sofrer sequelas da infeção da cronica. Sob tais condições as crianças representam uma elevada proporção dos casos agudos e a brucelose é em grande parte um problema pediátrico. (Corbel, 2006)

### **1.5.7 Brucelose adquirida ao viajar**

Em viagem, todos os turistas ou homens de negócio estão sujeitos a estabelecerem-se ou apenas passar por zonas endêmicas de adquirir brucelose, geralmente pelo consumo de leite não pasteurizado ou outros produtos lácteos. Os viajantes podem também importar queijos infetados ou outros produtos lácteos para seus próprios países e infetar os respetivos familiares ou contatos sociais por este meio. Produtos importados representam hoje a maioria dos casos de brucelose aguda, atendidos na América do Norte e Europa do Norte (Corbel, 2006).

### **1.5.8 Bioterrorismo**

*B. melitensis* e *B.suis* têm sido desenvolvidos experimentalmente como armas biológicas patrocinadas por programas. A sua estabilidade quando encontrada como

aerossol assim como a baixa dose infecciosa torna este microrganismo um agente adequada para este propósito. *Brucella* poderá ser usada para atacar diversas populações humanas e / ou animais. O impacto é provável que seja maior nas áreas em que a doença não é endêmica. O organismo pode ser obtido a partir de fontes naturais em muitas partes do mundo. Os Veterinários e as autoridades sanitárias devem estar cientes desta potencial fonte de infecção (Doganay & Doganay, 2013).

## **1.6 Patogénese**

### **1.6.1 Genética molecular**

A nível de genética molecular, o género *Brucella* foi caracterizado exclusivamente nos últimos 10 anos. A complexidade molecular média do genoma é de  $2,37 \times 10^9$  daltons. O género, em si, é extremamente homogéneo, com todos os membros a apresentar uma homologia superior a 95% nos estudos de paridade DNA-DNA, classificando, desta forma, a *Brucella* como um género mono-específico. (Pessegueiro, Barata, & Correia, 2003)

### **1.6.2 Composição antigénica**

Reconheceu-se um número significativo de componentes antigénicos da *Brucella*. No entanto, o antígeno responsável pela resposta imunitária é o lipopolissacárido S (LPS-S) (Xavier et al, 2010).

As bactérias do género *Brucella*, são distinguidas do ponto de vista antigénico em dois grupos, o grupo das lisas e o grupo das rugosas. O aspeto morfológico destas depende do lipopolissacarídeo (LPS) presente na membrana. Se a LPS for considerada completa, esta possui os dois domínios, a parte antigénica cadeia O e a parte tóxica lípido A. As estirpes lisas possuem a molécula completa de LPS, enquanto as rugosas não apresentam a cadeia O na estrutura da LPS. (Lawinsky et al, 2010)

### **1.6.3 Patogénese molecular**

A patogenicidade da *Brucella* difere de outros microrganismos aquando a sua interação com o hospedeiro. A bactéria não apresenta fatores de virulência clássicos relativamente às características de exotoxinas, endotoxinas e à patogenicidade dos lipopolissacáridos (LPS) representado na figura 2. (Xavier et al, 2010).

A *Brucella* pode invadir os hospedeiros, mamíferos, através de erosões ou cortes na pele, pelo trato respiratório ou pelo trato gastrointestinal. No trato gastrointestinal, os organismos são fagocitados pelas células linfo-epiteliais do tecido linfóide associado ao

intestino, a partir do qual ganham acesso à submucosa. Os organismos são rapidamente ingeridos pelos leucócitos polimorfo-nucleares, que geralmente são incapazes de os destruir e são fagocitados por macrófagos. As bactérias transportadas nos macrófagos, que viajam para o tecido linfóide drenando o local infectado, podem acabar localizados em nódulos linfáticos, fígado, glândulas mamárias, articulações, rins e medula óssea. (Purcell, Hoover, & Friedlander, 2006)

Em macrófagos, as brucelas inibem a fusão de fagossomas e lisossomas, e replicam-se dentro de compartimentos que contêm componentes de retículo endoplasmático através de um processo facilitado pelo sistema de secreção de tipo IV. Caso não seja controlado por mecanismos microbicidas do macrófago, a bactéria destrói as células onde se encontra hospedada e infeta as células adicionais. A *Brucella* pode também replicar-se de forma extra-celular nos tecidos do hospedeiro. Histo-patologicamente, a resposta celular do hospedeiro pode variar entre a formação de abscessos, a infiltração linfóide e a formação granulosa com necrose. (Purcell, Hoover, & Friedlander, 2006)

Estudos desenvolvidos com modelos experimentais deram importantes contributos para conhecer melhor as defesas do hospedeiro que eventualmente controlam a infeção por organismos da Brucela. O complemento serológico provoca de facto a lise de determinadas estirpes rugosas (aquelas que não contêm o O-polissacarídeo associado á cadeia lateral do LPS), mas ainda assim tem algum efeito, ainda que pouco significativo, sobre as estirpes lisas (bactéria com um longo O-polissacarídeo na cadeia lateral); a *B. melitensis* pode ser menos suscetível do que a *B. abortus* à morte através de complemento serológico. A administração de anticorpos a ratos antes de administrar estirpes rugosas ou lisas de brucela reduz o número de organismos presentes no fígado e no baço. Este efeito pode ser atribuído principalmente a anticorpos direcionados contra o LPS, com pouca ou nenhuma contribuição de anticorpos dirigidos contra outros componentes celulares. (Purcell, Hoover, & Friedlander, 2006)

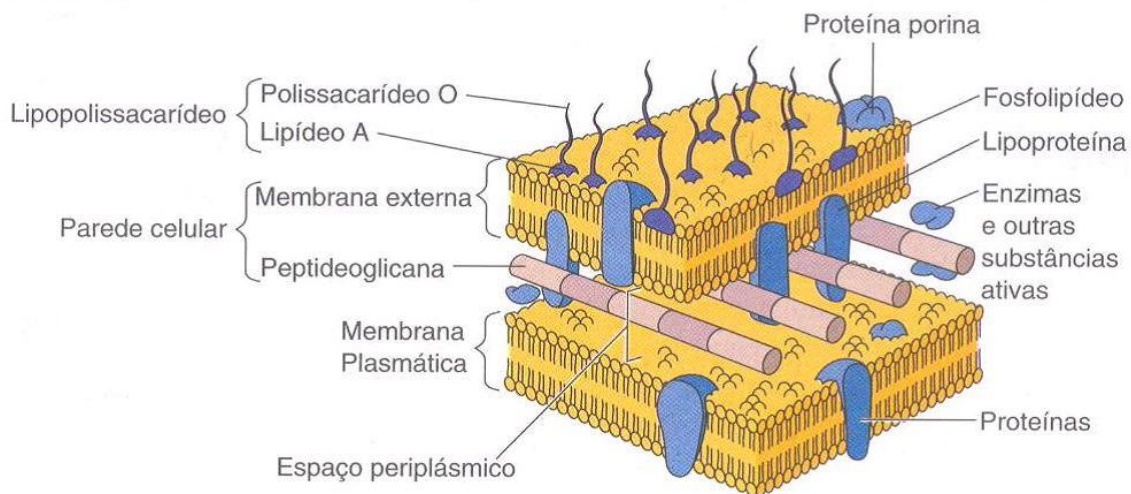
A redução na intensidade da infeção em ratos pode ser transferida de animais imunes para animais não imunes através dos grupos de células de diferenciação (CD4+) e CD8+ T ou através de injeções do soro da imunoglobulina (IgG). Em particular, a resposta das células T à Brucela parece desempenhar um papel-chave no desenvolvimento da imunidade e proteção contra a doença crónica. A neutralização do gama Interferona (IFN- $\gamma$ ) no hospedeiro com *B. abortus* induzido durante a infeção em ratos no estado de gravidez, previne o aborto. Para além disso, macrófagos tratados com IFN- $\gamma$  in-vitro inibe

a replicação celular bacterial. Estudos desenvolvidos em humanos suportam esta ideia de que o IFN-g pode desempenhar um papel na proteção. A homozigosidade do alelo IFN-g + 874A está associada ao aumento para cerca de duas vezes da incidência da brucelose. Em ruminantes, a vacinação com bactérias mortas dá alguma proteção, mas vacinas in vivo são mais eficazes. As vacinas in vivo mais eficazes expressam a superfície do O-polissacarídeo. No mínimo, é necessário o núcleo LPS completo para conseguir a eficácia da vacina rugosa mutante contra infecções *B abortus* and *B ovis* no modelo experimental. (Purcell, Hoover, & Friedlander, 2006)

Estas observações sugerem que a brucela, tal como outros agentes patogénicos intracelulares obrigatórios, são em primeiro lugar controlados por macrófagos ativados para potenciar a atividade microbicida através do IFN-g e outras citocinas produzidas pelo sistema imunitário dos linfócitos T. É provável que os anticorpos de citocinas, tanto de complemento como ativadores de macrófago, produzidos por células exterminadoras naturais ou células Natural killer possam contribuir na infeção primária ou no controlo do crescimento da bactéria extracelular. (Purcell, Hoover, & Friedlander, 2006)

Em ruminantes, a *Brucella* evita as defesas mais eficazes do hospedeiro, direcionando-se para tecido embrionário e trofoblástico. Em células destes tecidos, as bactérias crescem não só no fagossoma mas também no citoplasma e no retículo endoplasmático rugoso. Na ausência de mecanismos microbicidas intracelulares eficazes, estes tecidos permitem um crescimento bacterial exponencial que conduz à morte do feto e conseqüentemente ao aborto. Em ruminantes, a presença na placenta de eritritol pode aumentar ainda mais o crescimento da brucela. (Purcell, Hoover, & Friedlander, 2006)

Quando o aborto séptico ocorre, a concentração intensa de bactérias e aerossóis do corpo infetado flui durante o parto resultando quase sempre na infeção de outros animais e humanos. (Purcell, Hoover, & Friedlander, 2006)



**Figura 2: Representação da membrana de Lipopolissacarídeos (LPS). (Kostecki, 2013)**

Têm a capacidade de invadir e persistir no hospedeiro humano, através da inibição da apoptose. O LPS tem um papel fundamental na sobrevivência intracelular (Xavier et al, 2010).

A invasão bem-sucedida da *Brucella* no hospedeiro é um passo crucial no estabelecimento de infecção. Considerando-se que o trato digestivo é a principal fonte de entrada da *Brucella*, alguns estudos indicam possíveis fatores de virulência envolvidos na infecção através do trato digestivo (Lapaque et al, 2005).

Os genes que codificam a urease são necessárias para o estabelecimento da infecção por *B. suis*, *B. abortus* e *B. melitensis*. A urease é uma enzima de múltiplas subunidades, envolvidas no metabolismo do azoto, o que provoca um aumento do pH devido a produção de amoníaco, com resultado da hidrólise da ureia. A *Brucella* tem dois operões não adjacentes da urease, onde o ure1 é responsável pela atividade da urease. Quando o ure1 é inativado este causa a diminuição do crescimento de estirpes em ratinhos infetados pelo trato digestivo (Lapaque et al, 2005).

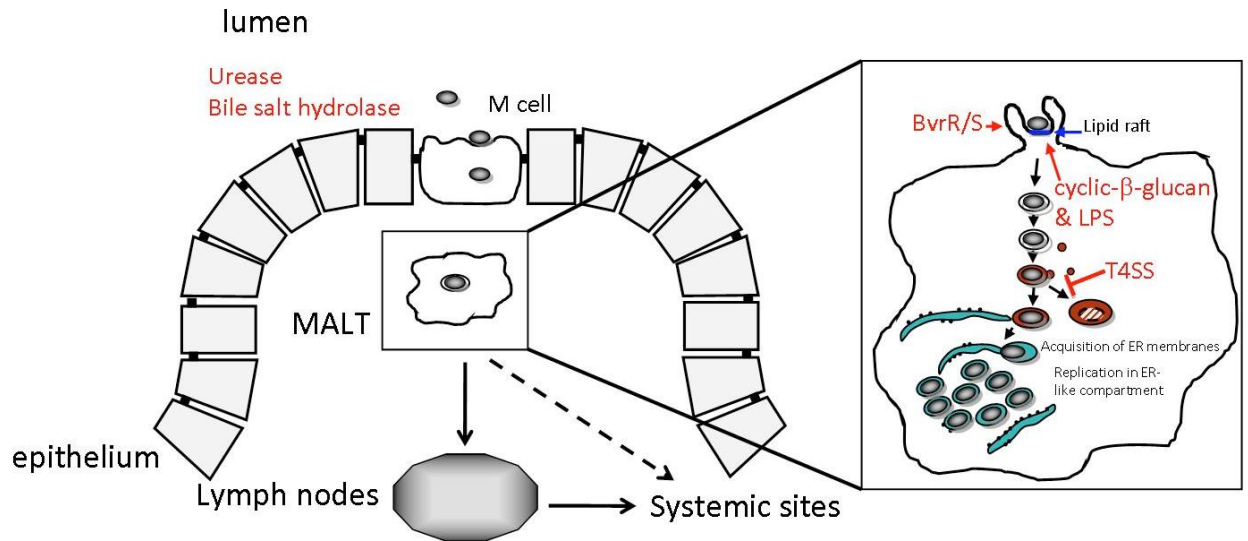
#### 1.6.4 Fatores de Virulência

No que diz respeito aos fatores de virulência, a *Brucella* simplesmente invade a célula do hospedeiro e evade todos os mecanismos de defesa executados pela mesma. (Gorvel, 2014)

A *Brucella* não possui os mecanismos “tradicionalis” de virulência, tais como plasmídeos e bacteriófagos lisogénicos que conferem virulência, não produzem exotoxinas, não possuem capsula de proteção da fagocitose, assim como não demonstra variação antigénica. No entanto é uma bactéria extremamente virulenta e patogénica quando interage com o seu hospedeiro natural. (Sbriglio, Sbriglio, & Sainz, 2007)

Num contacto inicial com o hospedeiro, a *Brucella* é fagocitada pelos neutrófilos polimórfos nucleares (PMN) ou o macrófago desativado localizado dentro dos vacúolos intracitoplasmáticos. De uma forma pouco conhecida, é capaz de evadir de todos os mecanismos microbicidas intracelulares, permanecendo dentro dos vacúolos e multiplicando-se, apontando para uma fácil adaptação ao meio intracelular. A *Brucella* é capaz de resistir aos mecanismos de defesa dos PMN e monócitos, uma vez que já demonstrou ser muito eficiente na multiplicação intracelular e produzir toxinas associadas ao quadro febril. A resistência da *Brucella* aos diversos mecanismos de defesa pode ser explicada pela presença da membrana externa LPS. (Sbriglio, Sbriglio, & Sainz, 2007)

A membrana LPS contém um fator de virulência, uma vez que permite a sobrevivência da bactéria em relação aos macrófagos. LPS é responsável pela integridade estrutural e funcional das bactérias gram-negativas. O fenótipo da *Brucella* é caracterizado pela presença ou ausência cadeia de O-polissacárido de aspeto rugoso ou liso. (Xavier et al, 2010)



**Figura 3: Representação esquemática da invasão da *Brucella* pelo trato digestivo. Penetra nas células M e conseqüentemente é transportada pelos macrófagos associados tecido linfóide (MALT) diretamente para os nódulos linfáticos e posteriormente para os sítios sistêmicos, onde se replica e estabelece os fatores de virulência. (Xavier et al, 2010)**

## 1.7 Quadro Clínico

A brucelose humana representa manifestações clínicas muito diferentes, sendo muitas delas assintomáticas.

A brucelose aguda manifesta-se inicialmente por períodos de febre elevados, geralmente durante a noite, com episódios de sudoração. As principais características da brucelose aguda são a febre, sudoração e as dores localizadas nos músculos e articulações. Com a evolução da doença podem se formar orquitepididimites, sacroileíte e espondilites.

A brucelose tem uma elevada tendência no que diz respeito às recidivas, mais frequente nos três primeiros meses e em casos de não existir tratamento, no entanto podem surgir durante o tratamento também.

Em alguns casos as consequências da doença prolongam-se durante anos, dando lugar a brucelose crônica com sintomas como dores fortes na parte musculoesquelética, alterações neurodegenerativas e impotência. (Montes, 2001)

Talvez nenhum aspecto desta doença seja mais controverso do que a brucelose crônica. A maioria dos especialistas concorda que o termo "brucelose crônica" deve ser reservado para pacientes cujos sintomas clínicos persistem por 12 meses ou mais, desde o momento do diagnóstico. Por este critério, os pacientes são divididos em três categorias: (1) recaídas, (2) infecção crônica localizada e (3) convalescença. A recaída é definida como a recorrência de sinais e sintomas característicos da doença, ocorrendo após o curso completo do tratamento. Pacientes com recaídas têm claramente sinais de infecção, como febre e títulos elevados de anticorpos IgG no soro. A maioria das recaídas ocorre seis meses após a terapia ser interrompida, e não é relacionada à resistência aos antibióticos. (Montes, 2001)

Já a infecção crônica localizada é definida como a recorrência de sinais e sintomas causada pela falha em eliminar um foco de infecção, como na osteomielite, ou abscessos em tecidos profundos. Pacientes com infecção localizada também têm sinais claros de infecção, como febre. Como no caso de pacientes com recaídas, infecções crônicas localizadas são caracterizadas pela elevação insistente dos anticorpos IgG no soro. (Montes, 2001)

Diferentemente de recaída, a infecção crônica localizada pode necessitar de intervenção cirúrgica para drenar focos de infecção, além da terapia antimicrobiana.

Desta forma a brucelose pode apresentar-se de diversas formas, manifestando-se como bacteriana, assintomática, síndrome infecciosa não específica ou manifestações com sintomas sistêmicos. (Montes, 2001)

## 1.8 Diagnóstico Laboratorial

Dado que a sintomatologia da brucelose é, muitas das vezes, não específica, é relevante, para a confirmação clínica, obter uma história detalhada, que inclua a ocupação, o contato com os animais, viagens a áreas endémicas e a ingestão de alimentos de risco (Pessegueiro, Barata, & Correia, 2003)

A obtenção do hemograma é pouco proveitosa uma vez que:

- pode demonstrar anemia no caso da contagem de leucócitos normal ou baixa.
- a proteína C reativa (PCR) está geralmente elevada
- a velocidade de sedimentação (VS) é variável, tendo pouca importância diagnóstica
- pode ainda haver elevação das provas hepáticas, também não específica.

(Pessegueiro, Barata, & Correia, 2003)

Muitas vezes o diagnóstico da brucelose passa por testes serológicos envolvendo anticorpos. São vários os testes utilizados para esta finalidade. O teste de Rosa-Bengala é o mais comum utilizado em laboratório, no entanto os resultados obtidos por este teste podem ser obtidos por outros também. O teste padrão mais utilizado é o teste sero-aglutinação (SAT), conhecido por teste de Wright, onde são detetados o número total de anticorpos, se este teste continuar negativo, deve-se usar o teste de fixação do complemento (Pabuccuoglu, 2011).

**Tabela 3: Antígenos e isótopos de imunoglobulinas que intervêm nos testes indicados (Ibero, García, & Dorronsoro, 2002)**

**Diagnóstico serológico.** Antígenos e isótopos de imunoglobulinas que intervêm nos testes indicados

Teste	Preparação antigénica	Isótopo que intervém	Antigénio que intervém
Rosa Bengala	Células inteiras	M,G,A	LPS
Sero-aglutinação	Células inteiras	M,G,A	LPS
3- mercaptoetanol	Células inteiras	G	LPS
Coombs	Células inteiras	G,A	LPS
Fixação do Complemento	LPS/ Células inteiras	M,G	LPS
Elisa	LPS/ Células inteiras	M,G,A	LPS

O diagnóstico da brucelose é considerado positivo quando aplicado um teste serológico de aglutinação e o resultado do mesmo é positivo, assim como, o isolamento da *Brucella* spp. a partir de sangue ou da medula óssea em meio de cultura específico para o crescimento da *Brucella* (Fanni, Shahbaznejad, & Pourakbari, 2013).

### **1.8.1 Testes serológicos aplicados no diagnóstico da Brucelose**

Os testes serológicos são usados mais frequentemente que os testes microbiológicos, no entanto, são testes pouco específicos principalmente em áreas endêmicas ou no caso de profissionais de saúde expostos a *Brucella*. (Alikhani et al, 2013)

Os resultados podem ser falsos-positivos, causados por doenças como a *tularemia*, *cólera*, *yersiniose* e *salmonelose*. Os resultados falso-positivos que ocorrem na utilização de testes serológicos podem ser devidos a outras doenças como as enumeradas ou durante a manifestação da doença. (Alikhani et al, 2013)

#### **1.8.1.1 Teste Rosa Bengala**

O teste de rosa de Bengala é um método de rastreio rápido, usado sobretudo em zonas epidemiológicas, e os resultados positivos devem obrigatoriamente ser confirmados por outros testes. Consiste numa prova de aglutinação que utiliza o antígeno da brucela corado de Rosa de Bengala e tamponado a pH 3,65. É um teste que se revela positivo mais tarde do que a reação de aglutinação (já que só põe em evidência a IgG), continua positiva para além deles, é de fácil execução e leitura rápida. Tem o inconveniente de não fornecer resultados quantitativos. (Ibero, García, & Dorronsoro, 2002)

#### **1.8.1.2 Teste de aglutinação de Wright e Huddleson (TAS)**

Os testes de aglutinação sérica (TAS) de Wright e de Huddleson. O teste de Wright é mais fiável, por ser realizado em tubo, embora apenas dê resultados após 24 horas. O teste de Huddleson é de resposta mais rápida, sendo feito em lâmina. Estes testes têm uma utilidade diminuta na primeira semana de doença, já que os títulos de anticorpos

considerados significativos (superiores a 1/160 ou a 1/320 em áreas endêmicas), geralmente, só surgem após a segunda semana. Estes testes são os que mais precocemente se tornam positivos (a partir da 2ª semana), sendo sempre positivos na brucelose aguda, já que põem em evidência a IgM, a qual é muito mais vezes eficaz a provocar a aglutinação do que a IgG. Podem surgir falsos negativos nos TAS, devido a fenómenos de pró-zona provocados pela presença de anticorpos bloqueadores, fenómenos esses que podem ser evitados usando diluições elevadas. (Ibero, García, & Dorronsoro, 2002)

#### **1.8.1.3 Teste de Coombs**

O teste de Coombs, que deteta estes anticorpos bloqueadores (sobretudo IgG e IgA), também pode ser usado como complemento aos TAS. Os falsos positivos podem surgir por reação cruzada com infeções por *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter* entre outros mas as diluições elevadas também podem evitá-los. (Ibero, García, & Dorronsoro, 2002)

#### **1.8.1.4 Reação de fixação pelo complemento**

A reação de fixação pelo complemento identifica a presença da IgG, tornando-se positiva após três a quatro semanas do início clínico da doença, apresentando uma sensibilidade equivalente aos TAS, tendo a vantagem de permanecer positiva para além destes. (Ibero, García, & Dorronsoro, 2002)

#### **1.8.1.5 Imunofluorescência Indireta (IFI)**

A imunofluorescência indireta (IFI) tem particular interesse no diagnóstico serológico da brucelose. A sua positividade inicia-se pouco depois dos TAS e mantém-se quando as outras reações serológicas já são negativas. Tem a vantagem de não se dirigir a uma determinada imunoglobulina, não dependendo o resultado do momento em que empregamos o método, bem como apresentar menos reações cruzadas e positivar mesmo na presença de anticorpos bloqueadores. A IFI é o meio de diagnóstico mais frequentemente positivo na brucelose crónica e foi desenvolvido para corrigir as deficiências do teste de aglutinação. (Pessegueiro, Barata, & Correia, 2003)

#### **1.8.1.6 Teste de ELISA**

O teste tipo ELISA para diagnóstico serológico da brucelose revela bons resultados, pelo que estes são atualmente considerados entre os melhores testes de diagnóstico de neuro-brucelose, brucelose crónica e seguimento da doença aguda tratada. O teste tipo ELISA, em comparação com os testes convencionais, tem como vantagens uma maior sensibilidade, especificidade e demonstra diminuição mais rápida de anticorpos com o tratamento bem-sucedido. É importante referir que os testes serológicos habitualmente utilizados detetam antígenos da *Brucella abortus*, que fazem reação cruzada com a *Brucella melitensis* e a *Brucella suis*, mas não com a *Brucella canis*. A identificação desta espécie requer testes específicos raramente disponíveis. (Ibero, García, & Dorronsoro, 2002)

#### **1.8.1.7 Teste de 3-mercaptop-etanol**

Teste de aglutinação com 3-mercaptop-etanol permite diferenciar os anticorpos IgG usando um título elevado de IgM que sugere a exposição recente (primeira semana de infeção), enquanto os anticorpos IgG aumentam a partir da segunda semana de doença, havendo correlação entre títulos elevados de IgG e infeção ativa. (Pessegueiro, Barata, & Correia, 2003)

Quanto ao diagnóstico da brucelose, muitas melhorias foram feitas para melhor compreensão desses aspetos diagnósticos na brucelose humana. No entanto, muitos desafios ainda precisam ser abordados, como a definição de teste serológico específico, a determinação de epítomos antigénicos indicadores de cada estágio da doença (por exemplo, aguda, localizada, crónica), realização de estudos de acompanhamento para correlacionar o curso da doença, com classes e subclasses de imunoglobulinas, além da realização de projetos para sondas de ácidos nucleicos padronizadas para tecnologia de amplificação (por exemplo, RT-PCR) que podem ser úteis no diagnóstico, especialmente em casos crónicos e complicados, como aqueles das infeções do sistema nervoso central. (Lawinsky et al, 2010)

Os testes serológicos são aplicados com base no estado evolutivo da doença, na seguinte tabela 4, estão representados os estados e o respetivo teste serológico a ser aplicado.

**Tabela 4: Brucelose: Diagnóstico serológico em função do estado evolutivo (Pessegueiro, Barata, & Correia, 2003)**

	<b>Brucelose aguda</b>	<b>Brucelose localizada</b>	<b>Brucelose crónica</b>
<b>Hemoculturas/mielocultura</b>	+++	±	±
<b>Testes de Wright e de Huddleson (TAS)</b>	+++ (na 1 <sup>a</sup> -2 <sup>a</sup> semana)	±	-
<b>Teste rosa de Bengala</b>	+ (na 2 <sup>a</sup> semana)	+	±
<b>Teste de 3-mercapto-etanol</b>	+ (na 2 <sup>a</sup> semana)	++	±
<b>Fixação do complemento</b>	++ (na 3 <sup>a</sup> -4 <sup>a</sup> semana)	++	±
<b>Imunofluorescência indireta</b>	++ (na 2 <sup>a</sup> -3 <sup>a</sup> semana)	++	+
<b>ELISA</b>	+ (na 1 <sup>a</sup> -2 <sup>a</sup> semana)	+	+

### 1.8.2 Diagnóstico Microbiológico de Brucela

O diagnóstico Microbiológico é realizado após a obtenção de um teste positivo de sero-aglutinação com títulos  $\geq 1/160$ . (Sajjan, Mangalgi, & Annapurna, 2014)

O diagnóstico definitivo de brucelose requer um exame bacteriológico positivo, isto é, a identificação de *Brucella* no exame microscópico de esfregaços (23), proveniente do sangue, da medula óssea ou, mais raramente, de outros líquidos orgânicos (LCR, líquido sinovial ou exsudado de abscesso) (36). Adicionalmente à observação microscópica, é sempre necessária a confirmação por cultura, único processo realmente fidedigno de diagnóstico individual, cuja negatividade, não invalida a possibilidade de existir infecção. (Soares, Leite, & Pasqualotto, 2012)

Historicamente a cultura de medula óssea é considerado mais sensível, particularmente nos casos de brucelose crônica e quando o paciente já iniciou o uso de antibióticos. A sensibilidade melhorada dos modernos métodos de hemocultura pode diminuir essa vantagem. (Soares, Leite, & Pasqualotto, 2012)

A cultura é o padrão-ouro para a confirmação da doença, a *Brucella* spp. É isolada mais frequentemente do sangue e na medula óssea, mas também em outros líquidos estéreis, como líquido cefalorraquiano, baço, fígado, líquido sinovial e abscessos. O microrganismo é isolado em 15-90% dos casos, dependendo do método empregado do espécime clínico analisado, as culturas devem ficar incubadas durante pelo menos 3 semanas em sistemas como o Bactec ( >95% de positividade nos primeiros 7 dias de incubação com Bactec 9000). Para melhores resultados, múltiplas amostras de hemocultura devem ser colhidas durante os episódios febris.

A sensibilidade das hemoculturas diminui conforme aumenta a duração da infecção. Quando o paciente já fez ou está em tratamento com antibióticos, o isolamento da medula óssea pode ser mais vantajosa. (Ibero, García, & Dorronsoro, 2002)

## **2. Metodologia**

### **2.1 Base de dados**

Ao longo do estágio na Unidade Local de Saúde do Alto-Minho e após uma revisão bibliográfica sistematizada, todos os dados foram recolhidos com uma prévia autorização da Comissão de Ética do Hospital em questão respeitando todos os princípios impostos pela mesma.

A população é selecionada pela pesquisa da patologia em questão- Brucelose, onde todos os doentes entre o ano 2009 e 2013 sujeitos a pesquisa de Brucela são incluídos no estudo sem limitações de idade, sexo ou outra condição.

Os dados são recolhidos através da base de dados usada pelo hospital Maxdata-Clinidata, com aplicação dos filtros de Teste de Wright, bacteriologia brucelose, Proteína C reativa, Velocidade de Sedimentação e número de Leucócitos.

O teste usado na pesquisa da brucelose pela ULSAM, é o teste de Wright que se encontra em anexo.

O número total de casos submetidos ao longo destes 5 anos a pesquisa de Brucelose através do Teste de Wright foram 1035, dos quais o número total de positivos para o teste de seroaglutinação - Wright são 102, mas apenas 30 são positivos com significância.

## **2.2 Metodologia aplicada a estatística**

Todos os dados recolhidos em função do trabalho da pesquisa de seroprevalência da Brucelose na ULSAM, foram tratados estatisticamente com apoio em duas ferramentas de trabalho: SPSS Statistics 20 e o Windows Excel 2007. A partir destes dois programas será realizada uma análise estatística descritiva, assim como a correlação dos parâmetros bioquímicos. No entanto todos os gráficos foram obtidos pelo programa Excel 2007.

Foi aplicada uma análise descritiva da população e posteriormente aplicado um teste de normalidade e outro teste de igualdade de variâncias, estes dois testes obtiveram resultados que indicam que não existe normalidade na amostra, assim como, não existe igualdade de variâncias. Aplicando desta forma um teste não-paramétrico de Mann-Whitney onde se verifica a rejeição da hipótese nula, ou seja os resultados são significativamente diferentes para os testes positivos e negativos.

Foram elaborados gráficos de seroprevalência, numero de casos por ano e sazonalidade, através do Excel.

### 3. Resultados

Os resultados apresentados são representativos de um período de 5 anos, nomeadamente de 2009 – 2013 na ULSAM para o teste de seroaglutinação de Wright utilizado na pesquisa de *Brucella*. Os resultados apenas são considerados significativos com diluições iguais ou superiores a 1/160. O número total de amostras/pacientes submetidos ao teste de seroaglutinação ao longo destes 5 anos foram 1035, dos quais o número total de positivos para o teste de seroaglutinação - Wright são 102, mas apenas 30 são positivos com significância.

Estes resultados são comparados com parâmetros bioquímicos tais como a Proteína C Reativa (PCR), o número de Leucócitos (LEU) e a Velocidade de Sedimentação (VS).

É relevante verificar se existe alguma diferença significativa entre os parâmetros dos resultados positivos e negativos. Todos os dados são recolhidos da base de dados da Unidade Local de Saúde do Alto-Minho (ULSAM), denominada por Clinidata.

Os resultados foram submetidos ao tratamento estatístico, utilizando os programas Excel e SPSS. Com o objetivo de verificar se existe alguma relação entre os resultados dos testes realizados e os parâmetros bioquímicos, assim como um estudo de sazonalidade, prevalência e casos por ano.

A amostra está dividida em dois grupos, um grupo denominado por “positivos” pelo facto de serem resultado do teste positivo com significância (diluição igual ou superior 1/160) e outro grupo denominado por “negativos” pelo resultado do teste ser positivo sem significância (diluição inferior a 1/160).

### **3.1 Resultados/Ano**

Nas tabelas que se encontram em anexo estão representados os resultados da pesquisa de brucelose por ano de 2009-2013. Por ano, a recolha de informação é acerca de valores de diluição do teste de Wright, PCR, LEU e VS assim como se foi realizada a análise microbiológica.

Os dados relativos ao ano 2009, na realização de um total de 253 testes, verificaram-se 7 testes positivos com significância, no ano 2010, realizaram-se um total de 256 testes, verificaram-se 11 testes positivos com significância, em 2011, num total de 207 testes, verificaram-se 2 testes positivos com significância, para 2012, houve um total de 152 testes, com 3 testes positivos com significância e finalmente no ano 2013, na realização de um total de 167 testes, verificaram-se 6 testes positivos com significância.

### 3.2 Distribuição do número de casos por ano

No seguinte gráfico 1 estão representados o número de casos positivos com significância nos últimos cinco anos do ULSAM.

É evidente que o número de casos em 2009 e 2010 era superior aos restantes anos, o que descreve uma tendência para diminuição do número de casos de Brucelose.



Gráfico 1: Distribuição do número de casos positivos de brucelose entre o ano 2009-2013.

### 3.3 Seroprevalência de 2009-2013

No seguinte gráfico 2 está representada a Seroprevalência da brucelose entre o ano 2009 e 2013, verificando-se um pico de prevalência nos meses de Junho/Julho assim como nos meses de Novembro/Dezembro.

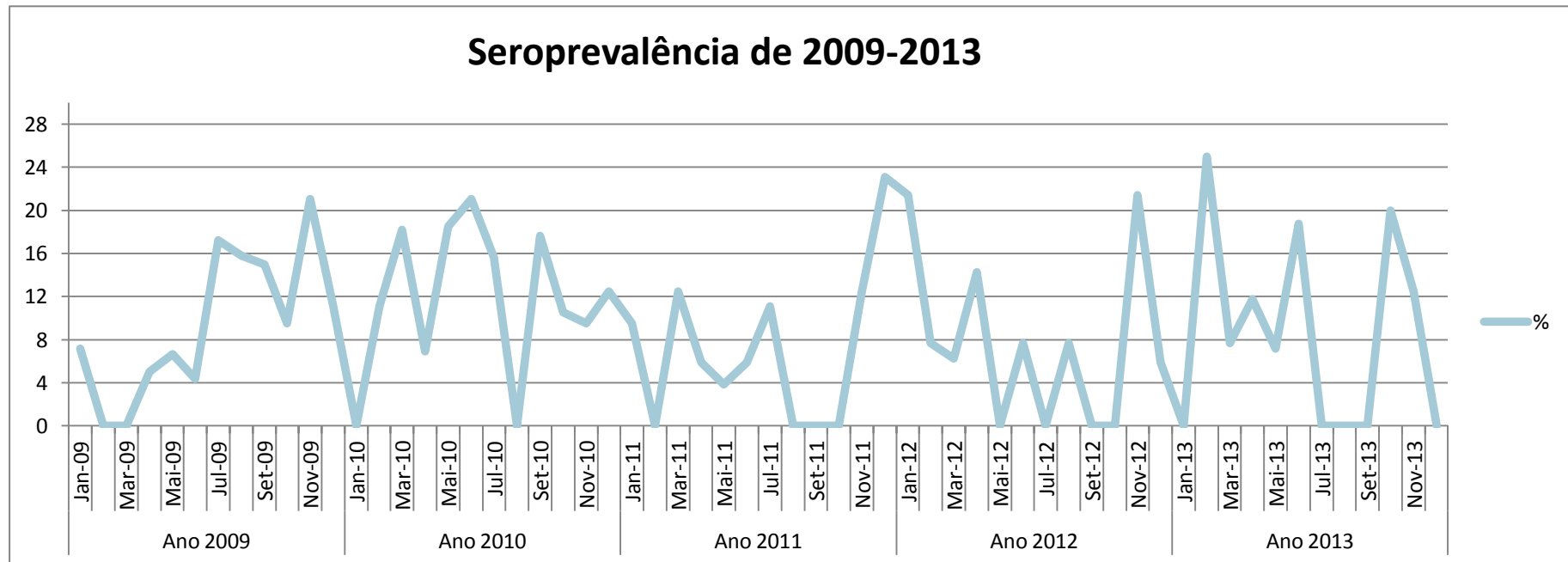


Gráfico 2: Seroprevalência da brucelose entre o ano 2009 e 2013

### 3.4 Sazonalidade 2009-2013

Em relação a sazonalidade representada no gráfico 3, os meses que representam uma percentagem superior a 50% em relação seroprevalência são os meses de Junho, Novembro e Dezembro.

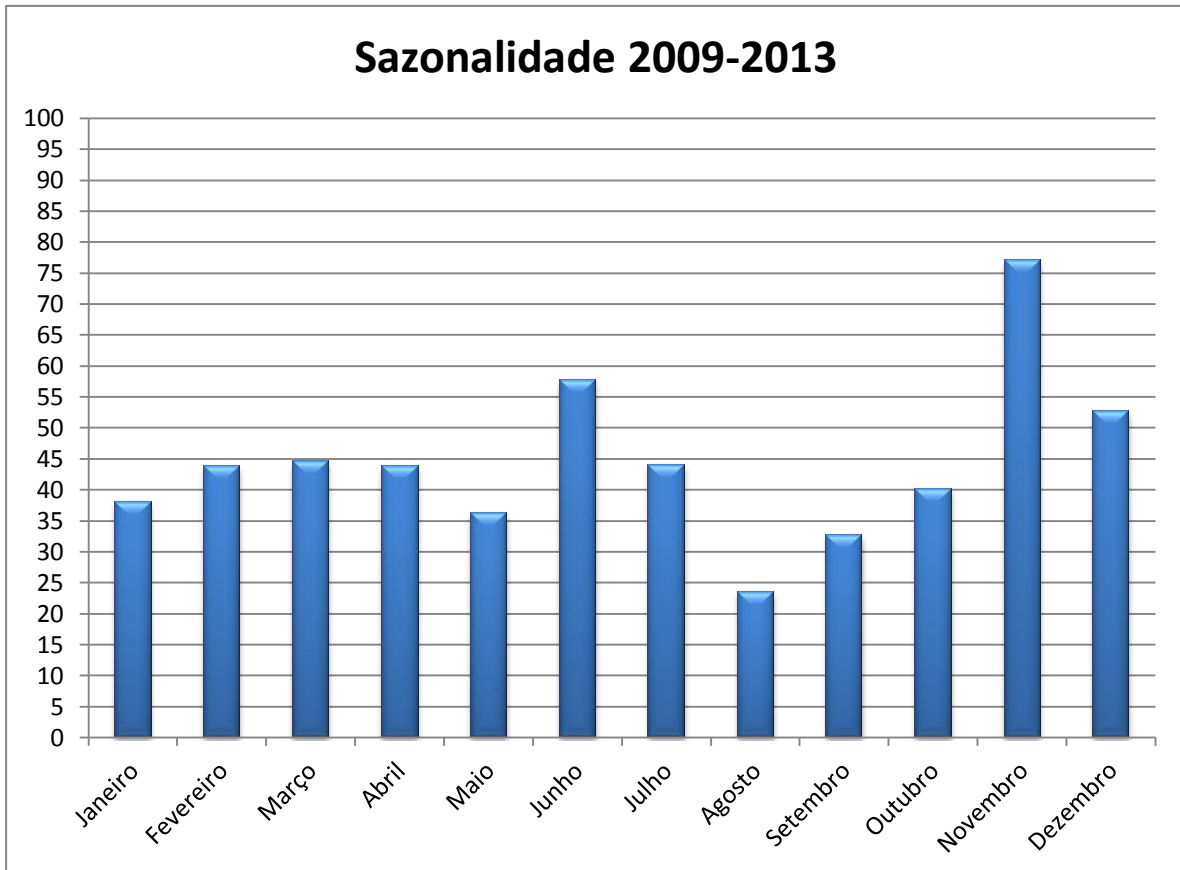


Gráfico 3: Sazonalidade da brucelose expressa do ano 2009 a 2013

### 3.5 Análise descritiva/SPSS

No quadro 1 estão representados os casos positivos relacionados com os parâmetros bioquímicos, sendo 72, o número total de casos negativos (sem significância) e 30 o número de casos positivos com significância.

Na análise descritiva da PCR do quadro 2, verifica-se que esta possui valores semelhantes no caso de o teste ser positivo ou negativo. Não existem diferenças significativas em relação a média dos valores.

Descriptives					
	Caso		Statistic	Std. Error	
PCR	Negativo	Mean		5,3518	,83653
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	3,6838	
			Upper Bound	7,0198	
		5% Trimmed Mean		4,4907	
		Median		2,4300	
		Variance		50,385	
		Std. Deviation		7,09821	
		Minimum		,04	
		Maximum		31,08	
	Positivo	Mean		4,5053	,59718
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	3,2840	
			Upper Bound	5,7267	
		5% Trimmed Mean		4,3443	
		Median		3,9850	
		Variance		10,699	
		Std. Deviation		3,27091	
		Minimum		,19	
		Maximum		12,35	

**Quadro 1:** Análise descritiva da Proteína C reativa

Na análise descritiva dos LEU do quadro 3, verifica-se que estes possuem valores significativamente diferentes no caso de o teste ser positivo ou negativo. Existem diferenças significativas em relação a média dos valores. Comprovada posteriormente pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Descriptives					
	Caso		Statistic	Std. Error	
LEU	Negativo	Mean		8,1283	,44279
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	7,2454	
			Upper Bound	9,0112	
		5% Trimmed Mean		7,8883	
		Median		7,5000	
		Variance		14,117	
		Std. Deviation		3,75719	
		Minimum		1,46	
		Maximum		18,97	
	Positivo	Mean		3,6487	,31154
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	3,0115	
			Upper Bound	4,2858	
		5% Trimmed Mean		3,5133	
		Median		3,5600	
		Variance		2,912	
		Std. Deviation		1,70639	
		Minimum		1,02	
		Maximum		9,63	

**Quadro 2:** Análise descritiva dos do número de leucócitos

Na análise descritiva da VS no quadro 4, verifica-se que esta possui valores semelhantes no caso de o teste ser positivo ou negativo. Não existem diferenças significativas em relação a média dos valores.

Descriptives					
	Caso		Statistic	Std. Error	
VS	Negativo	Mean		52,4444	4,22286
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	44,0243	
			Upper Bound	60,8646	
		5% Trimmed Mean		51,0463	
		Median		54,0000	
		Variance		1283,94	
		Std. Deviation		35,8321	
		Minimum		1,00	
		Maximum		141,00	
	Positivo	Mean		48,4000	4,98633
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	38,2018	
			Upper Bound	58,5982	
		5% Trimmed Mean		47,0741	
		Median		44,0000	
		Variance		745,903	
		Std. Deviation		27,3112	
		Minimum		4,00	
		Maximum		122,00	

**Quadro 3:** Análise descritiva da velocidade de sedimentação

Realizou-se o teste da normalidade e verifica-se segundo os resultados apresentados no quadro 5 que não se verifica a normalidade para todos os testes negativos.

Tests of Normality							
Caso		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic <sup>c</sup>	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
PCR	Negativo	,243	72	,000	,745	72	,000
	Positivo	,138	30	,148	,928	30	,043
LEU	Negativo	,127	72	,006	,926	72	,000
	Positivo	,163	30	,040	,889	30	,005
VS	Negativo	,125	72	,007	,945	72	,003
	Positivo	,150	30	,085	,950	30	,164

*a. Lilliefors Significance Correction*

**Quadro 4:** Teste da normalidade

Uma vez que a igualdade de variâncias não se verifica (quadro 6), não se utilizou o teste t, usando-se assim um teste não-paramétrico teste Mann-Whitney (quadro 7).

Independent Samples Test							
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means			
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference
PCR	Equal variances assumed	8,784	,004	,625	100	,534	,84651
	Equal variances not assumed			,824	98,912	,412	,84651
LEU	Equal variances assumed	12,908	,001	6,253	100	,000	4,47967
	Equal variances not assumed			8,274	99,185	,000	4,47967
VS	Equal variances assumed	4,375	,039	,554	100	,581	4,04444
	Equal variances not assumed			,619	70,668	,538	4,04444

**Quadro 5:** Teste de variâncias

Realizou-se o teste não-paramétrico teste Mann-Whitney, verifica-se que para o parâmetro dos leucócitos verifica-se a rejeição da hipótese nula, ou seja os resultados são significativamente diferentes para os teste positivos e negativos. Revela valores baixos de leucócitos para os positivos (Leucopenia) e valores normais de leucocitos para os negativos.

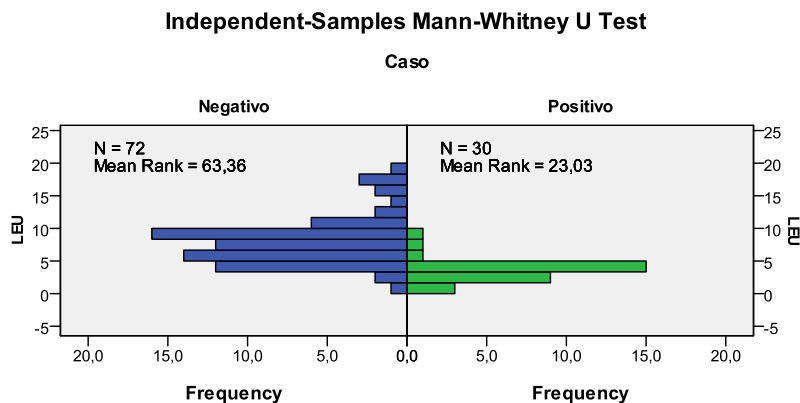
No presente estudo 37% da amostra de testes positivos revelam leucopenia. Uma vez que 11 indivíduos dos 30 positivos, revela valores iguais ou inferiores a 4.000/ml.

**Hypothesis Test Summary**

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of PCR is the same across categories of Caso.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,201	Retain the null hypothesis.
2	The distribution of LEU is the same across categories of Caso.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,000	Reject the null hypothesis.
3	The distribution of VS is the same across categories of Caso.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,904	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

**Quadro 6:** Teste Mann-Whitney



#### 4. Discussão

O número de testes realizados anualmente na ULSAM na pesquisa de brucelose varia entre os 152-256/ano.

O número testes/casos positivos de serologia manual na pesquisa de brucelose entre o ano 2009-2013, o número de testes realizados assim como o número de positivos não é constante.

A soma dos testes positivos para o teste de seroaglutinação - Wright entre o ano de 2009 a 2013 são 102, mas apenas 30 testes são positivos com significância.

O ano em que se realizaram mais testes, 256, e que se verificou o número mais elevado de testes positivos foi no ano de 2010 com um total de 11 testes positivos com significância, seguindo-se o ano 2009 com 7 testes positivos com significância e posteriormente 2011, o ano com menor número com apenas 2 positivos, no ano de 2012 regista 3 e 2013 com 6 testes positivos com significância.

Segundo o protocolo usado para a realização do teste de Wright foram considerados como positivos todos os testes com uma diluição igual ou superior a 1/160.

Em relação a sazonalidade, é observada uma maior incidência nos meses de Junho assim como nos meses de Novembro/Dezembro entre o ano 2009-2013.

Todos os testes positivos e negativos estão associados a valores diferentes de parâmetros bioquímicos. Neste estudo a PCR, o número de LEU e a VS. Com a finalidade de comparar e correlacionar estes parâmetros com o resultado obtido, pode efetivamente existir uma relação direta entre um ou mais parâmetros com o resultado obtido pelo teste.

Após uma análise descritiva e comparativa dos resultados, é possível dizer que a amostra em estudo (número de casos positivos e negativos) não demonstra uma distribuição normal, assim como, não se verifica a igualdade de variâncias.

Foi necessário realizar um teste não paramétrico, Mann-Whitney, uma vez que a amostra em estudo não atende ao teste t de normalidade e chumba igualmente no teste de variâncias. O resultado do teste de Mann-Whitney é interessante uma vez que existe uma diferença significativa do número de leucócitos presente em indivíduos positivos ao teste e os indivíduos negativos ao teste.

O parâmetro da PCR mantém valores elevados para ambos os casos (positivo/negativo), uma vez que o fígado aumenta a produção da PCR, ultrapassando exponencialmente os valores normais, na presença de um processo inflamatório. O valor normal da PCR encontra-se em valores até 0.1 mg/dL ou 1mg/L, no caso de uma inflamação estes valores triplicam facilmente. (Lima, Silva, & Lima, 2002)

A PCR é considerada um marcador de inflamação sistémica, que aumenta em resposta a diversos tipos de lesão, particularmente em infeções bacterianas, situações clínicas que constituem estímulos inflamatórios. É produzida pelo fígado e principalmente estimulada pela IL-6 e, ao contrário de outros marcadores de fase aguda, os seus níveis permanecem relativamente estáveis, sem grande variação diurna, permitindo a sua correta quantificação. (Lacerdab & Silva, 2012)

Sendo normal não obter valores significativamente diferentes, pois quase todos os doentes submetidos ao teste de serologia manual padecem de uma infeção ou outra patologia. Portanto, uma elevação da PCR indica que existe uma inflamação, mas não nos permite conhecer qual o local ou a causa dessa inflamação. (Denardi, Filho, & Chagas, 2008)

A VS elevada é associada diretamente aos processos inflamatórios, doenças infecciosas ou reumáticas, neoplasias, necroses, facto que está relacionado com a hiperfibrinogenemia e o aumento da PCR.

O valor normal nas mulheres varia de 0 a 10 mm/h e nos homens de 0 a 15 mm/h. O resultado elevado da velocidade de sedimentação expressa no hemograma indica a presença da infeção ativa no organismo. Se houver valores alterados em indivíduos saudáveis, deve-se repetir a análise para confirmar o valor.

Este exame não serve para determinar um diagnóstico, mas indica a presença de alterações no organismo. Estas alterações podem ser desencadeadas por uma anemia, brucelose, febre reumática ou simplesmente uma gravidez. No entanto, a VS pode encontrar-se elevada sem uma causa inflamatória diagnosticada. Em idosos, uma VS elevada pode ser compatível com o bom estado de saúde durante período prolongado de tempo. (Santos & Cunha, 2000)

O hemograma é pouco útil, podendo demonstrar a PCR geralmente elevada e a VS variável, tendo pouca importância diagnóstica. Pode ainda haver elevação das provas hepáticas, também não específicas. (Pessegueiro, Barata, & Correia, 2003)

Muitas vezes a PCR e a VS são usadas para estabelecer “linhas de base” e posteriormente monitorizar a evolução de doenças infecciosas, auto-imunes entre outras. (Aguiar, 2013)

A PCR está geralmente elevada assim como a VS (Hipólito, Silva, & Santos, 2009)

Em relação aos LEU, eles estão envolvidos no sistema de defesa do organismo contra doenças e infeções. Neste estudo é descrito através do teste não paramétrico de Mann-Whitney, que existe uma diferença significativa dos valores dos leucócitos nos indivíduos com o teste positivo e negativo. Os indivíduos para o caso de o teste ser positivo apresentam valores baixos, comparados com os valores normais. Estes indivíduos são suscetível de uma leucopenia. Os LEU estão presentes no sangue em muito menor número que os eritrócitos, com cerca de 4.000 a 10.000 leucócitos por milímetro cúbico de sangue. Valores iguais ou inferiores a 4.000 células por mililitro de sangue são classificados como leucopenia.

Dos diferentes leucócitos, os eosinófilos, diminuem de forma significativa ou chegam mesmo a desaparecer por vezes, provocando uma eosinopenia que acontece caracteristicamente na fase aguda de algumas infeções (febre tifóide, brucelose) e também ao longo do tratamento com determinados fármacos, em especial os corticosteroides.

No presente estudo 37% da amostra de testes positivos revelam leucopenia. Uma vez que 11 indivíduos dos 30 positivos, revela valores iguais ou inferiores a 4.000/ml.

O estudo realizado por Fanni *et al.*, 2013, num total de 34 pacientes com Brucelose diagnosticada entre o ano 2002 e 2010, é demonstrado que 33% da amostra de doentes possui leucopenia e apenas um indivíduo com leucocitose. (Fanni, Shahbaznejad, & Pourakbari, 2013)

Num estudo que envolveu 370 pacientes dos quais, 162 do sexo masculino e 208 do sexo feminino, com registo de brucelose entre o ano 2006 e 2012, foram analisados e conclui-se segundo Guler *et al.*, 2014 que numa análise completa do sangue, 21,4% dos pacientes apresentava leucopenia. (Guler et al., 2014)

Segundo El-Koumi, um estudo conduzido pelo hospital Al-Khafji da Arabia Saudita entre no espaço de tempo entre Agosto de 2011 e Outubro de 2012, em que a amostra em estudo são todas as crianças com sintomas de febre forte durante mais de 5

dias, das quais 84 crianças responderam positivamente ao teste rápido de detecção de brucelose, destes 84, 38% deles apresentavam leucopenia. (El-Koumi, Afify, & Al-Zahrani, 2013)

É comum o aparecimento de anemia, leucopenia e trombocitopenia associado a quadros clínicos como o da brucelose. No estudo apresentado por Demir et al., 2012 numa amostra de 48 indivíduos, detetaram-se 28 casos de leucopenia correspondente a 58% da amostra. (Demir et al., 2012)

Comparando com o estudo realizado neste trabalho, os valores de leucopenia encontram-se muito próximos, os 37% de pacientes que apresentam leucopenia neste estudo estão muito próximos das percentagens encontradas por outros estudos segundo El-Koumi com 38% e com a percentagem encontrada no estudo realizado por Fanni com 33% dos pacientes com leucopenia.

## 5. Conclusão

Em suma, este estudo permitiu concluir que a tendência da Brucelose no distrito de Viana do Castelo tende a diminuir ao longo dos anos, uma vez que o número de casos em 2009 e 2010 era superior aos restantes anos,

Em relação a sazonalidade, os meses que apresentam uma percentagem superior a 50% em relação seroprevalência são os meses de Junho, Novembro e Dezembro. Os resultados revelam como declarado pela Organização Mundial de Saúde que o Distrito de Viana do Castelo não é uma zona endémica.

Através da análise estatística foi possível concluir que um dos parâmetros bioquímicos, neste caso o número de leucócitos, poderá estar diretamente relacionado com um teste de Wright positivo, uma vez que, 37% da amostra de testes positivos revelam leucopenia.

## 6. Revisão Bibliográfica

Aguiar, F., Ferreira-Júnior M., Sales, M., Cruz-Neto, L., Fonseca, Sumita, Lichtenstein, e Duarte (2013). Proteína C reativa: aplicações clínicas e propostas para utilização racional. *REV ASSOC MED BRAS.* , 85-92.

Aleixo M, Ferreira M eAntunes F (1999 ). Brucelose: Revisão. *Act Méd Port* , 12-13.

Alikhani, T., Hashemi, S., Naseri, Z. e Farajnia, F. (2013). Diagnosis of Human Brucellosis by Blood Culture (BACTEC) and PCR Method via Whole Blood and Serum. *Jundishapur Journal of Microbiology* .

Al-Jasser, & Al-Anazi. (2012). Brucellosis: A Global Re-emerging Zoonosis; History, Epidemiology, Microbiology, Immunology and Genetics. *Omic* .

Alton, B., Jones, S., Angus, F., Verger, A. (1988). Techniques for the brucellosis laboratory: Bacteriological Methods.

Avila-Calderón, E., Lopez-Merino, A. e Sriranganathan, N. (2013). A History of the Development of Brucella Vaccines. *BioMed Research International* , 1-8.

Banai, & Corbel. (2010). Taxonomy of *Brucella*. *The Open Veterinary Science Journal* , 85-101.

Carvalho S., Barroso R., Pinhal F e Mota F. (1995). Brucelose, alguns aspectos epidemiológicos. *Medicina Int* , 259-261.

Corbel. (2006). Brucellosis in humans and animals. *WHO Library Cataloguing-in-Publication Data* .

Corbel, A., Banai, M e Michael (2010). Taxonomy of *Brucella*. *The Open Veterinary Science Journal* , 85-101.

Demir., M. Karahocagil, R. Esen, M. Atmaca, H. Gönüllü e H. Akdeniz K. (2012). Bone marrow biopsy findings in brucellosis patients with hematologic abnormalities. *Chinese Medical Journal* , 1871-1876.

- Denardi, Filho, & Chagas. (2008). C-Reactive Protein: an update. *Rev SOCERJ.* , 329-334.
- Doganay, & Doganay. (2013). *Brucella* as a Potential Agent of Bioterrorism. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery* , 27-33.
- El-Koumi, Afify, M., & Al-Zahrani, S. (2013). A Prospective Study of Brucellosis in Children: Relative Frequency of Pancytopenia. *Mediterr J Hematol Infect Dis* .
- Fanni, Shahbaznejad, & Pourakbari. (2013). Clinical Manifestations, Laboratory Findings, and Therapeutic Regimen in Hospitalized Children with Brucellosis in an Iranian Referral Children Medical Centre. *J HEALTH POPUL NUTR* , 218-222.
- Ficht, T e Thomas, B. (2010). *Brucella* taxonomy and evolution. *Future Microbiol.* , 859–866.
- Gorvel, N. e Jean-Pierre (2014). “If you bring an alarm, we will destroy it,” said *Brucella* to the host cell. *Landes Bioscience* , 460-462.
- Guler, O. Kokoglu, H. Ucmak, M. Gul, S. Ozden, F. e Ozkan, N. (2014). Human brucellosis in Turkey: different clinical presentations. *J Infect Dev Ctries* , 581-588.
- Hipólito, Silva, & Santos. (2009). Problems in brucellosis diagnosis: two clinical cases. *Saúde Infantil* , 29-31.
- Ibero, García, & Dorronsoro. (2002). CASO CLÍNICO BRUCELOSIS: PARADIGMA DEL DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO. *Medicine* , 3289-3296.
- Kostecki, M. Eduarda. B. (2013). Coloração de gram.
- Lacerdab, D., & Silva. (2012). Proteína C reativa de alta sensibilidade como biomarcador de risco na doença coronária. *Rev Port Cardiol* , 733-745.
- Lapaque, H., Moriyon, I., Moreno, E., Jean-Pierre e Gorvel (2005). *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Microbiology* , 60-66.
- Lawinsky, Ohara, Faria, Elkhoury and Cavalcante (2010). The current state of brucellosis in humans. *Rev Pan-Amaz Saude* , 75-84.

- Lima, J., Silva, A., & Lima, D. (2002). A PROTEÍNA C-REATIVA PCR(as) COMO MARCADOR DE RISCO NA DOENÇA CARDIOVASCULAR. *Atheros* , 20-22.
- Mantur, G., Amarnath, K. e Shinde, R. (2007). Review of clinical and laboratory features of human Brucellosis. *Indian J Med Microbio* , 188-202.
- Mesner, A.,Riesenberg, Biliar, Borstein, Bouhnik e Peled (2007). The Many Faces of Human-to-Human Transmission of Brucellosis: Congenital Infection and Outbreak of Nosocomial Disease Related to an Unrecognized Clinical Case.
- Meyer, Meagher, & Margaret. (1994). On the Origin of Brucellosis in Bison of Yellowstone National Park: A Review. *Conservation Biology* 1994 , 645-653.
- Mohamed, Stephen. Boyle, Nammalwar e Sriranganathan (2009). Brucellosis: A re-emerging zoonosis. *Veterinary Microbiology* , 392-398.
- Montes, I., e Isaias, M. (2001). DIAGNÓSTICO DE LA BRUCELOSIS. *Servicio de Microbiología. Hospital Virgen del Puerto. Plasencia (Cáceres)* .
- Murray, R., Rosenthal, S., Kobayashi S, Pfaller A (2005). Medical Microbiology. *5th ed Elsevier* .
- Pabuccuoglu, T. (2011). Evaluation of Serological Tests for Diagnosis of Brucellosis. *Jpn. J. Infect. Dis.* , 272-276.
- Pessegueiro, Barata, & Correia. (2003). Brucellosis – a systematic revision. *Medicina interna* .
- Purcell, Hoover, & Friedlander. (2006). Brucellosis. *Medical Aspects of Biological Warfare* .
- Rahman, M. Uddin, Park, Joon-seok, C., Rahman and Islam, A. (2006). A SHORT HISTORY OF BRUCELOSIS: SPECIAL EMPHASIS IN BANGLADESH. *Bangl. J. Vet. Med.* , 1-6.
- Sajjan, Mangalgi, S., & Annapurna. (2014). Comparison of Three Blood Culture Techniques in the Diagnosis of Human Brucellosis. *Journal of Laboratory Physicians* , 14-17.

Santos, & Cunha. (2000). Velocidade de sedimentação das hemácias: utilidade e limitações. *Rev Ass Med Brasil* , 232-236.

Saúde, D.-G. d. (2005). Doenças infecciosas 2000-2004. 99-105.

Sbriglio, J. L., Sbriglio, D. H., & Sainz, B. S. (2007). BRUCELOSIS: Una patología generalmente subdiagnosticada en Humanos y que impacta negativamente en la producción pecuaria y desarrollo de nuestros países. *Bioanalysis* , 18-23.

Soares, Leite, & Pasqualotto. (2012). *Metodos Diagnosticos*. Artmed.

Tonna, T. e Tonna, H. (2005). Brucellosis. *New England Journal Medicine* , 50-62.

Wyatt, & Vivian. (2009). Brucellosis and Maltese goats in the Mediterranean1. *Journal of Maltese History* , 4-18.

Xavier, M, Costa, E., Azevedo, A., Paixão, T., Alves, T. e Santos, R. (2010). Pathogenesis of *Brucella* spp. *The Open Veterinary Science Journal* , 109-118.

Xavier, M., Tatiane A. Paixão, Andréas B. Hartigh, Renée M. Tsolis e L. Santos, R. (2009). The genus *Brucella* and clinical manifestations of brucellosis. *Ciencias Rural* , 2252-2260.

# **ANEXOS**

## Anexo I: Dados relativos a seroprevalência da brucelose em 2009

Ano 2009	Nº Testes Positivos	Diluição	Significância	PCR	LEU	VS	Micro
Janeiro	1	1/320	SIM	3,53	8,22	39	S/pedido
Fevereiro	0	0	NÃO	0	0	0	S/pedido
Março	0	1/40	NÃO	4,65	9,2	45	Negativo
		1/80	NÃO	31,08	6,54	113	S/pedido
Abril	1	1/160	SIM	1,74	6,26	75	S/pedido
		1/80	NÃO	1,32	7,15	2	S/pedido
Maio	0	1/80	NÃO	22,19	6,78	82	S/pedido
Junho	1	1/160	SIM	1,4	6,88	44	S/pedido
Julho	1	1/40	NÃO	12,93	6,61	134	S/pedido
		1/40	NÃO	1,33	7,42	11	S/pedido
		1/40	NÃO	0,35	6,29	19	S/pedido
		1/80	NÃO	7,93	4,83	23	S/pedido
		1/320	SIM	2,56	4,35	68	S/pedido
Agosto	2	1/160	SIM	4,8	2,57	122	S/pedido
		1/160	SIM	7,09	5,75	15	S/pedido
		1/40	NÃO	0,22	5,72	17	S/pedido
Setembro	0	1/40	NÃO	1,8	9,4	10	S/pedido
		1/40	NÃO	0,04	7,58	4	S/pedido
		1/40	NÃO	2,81	5,84	54	S/pedido
Outubro	0	1/80	NÃO	2,97	4,22	118	S/pedido
		1/80	NÃO	7,36	14,37	99	S/pedido
Novembro	1	1/160	SIM	8,98	4,54	30	S/pedido
		1/80	NÃO	9,38	18,97	111	S/pedido
		1/80	NÃO	0,07	4,99	27	S/pedido
		1/80	NÃO	1,2	4,67	29	S/pedido
Dezembro	0	1/40	NÃO	22,74	8,93	108	S/pedido
		1/40	NÃO	9,51	11,41	106	S/pedido
		1/80	NÃO	4,35	12,01	89	S/pedido

## Anexo II : Dados relativos a seroprevalência da brucelose em 2010

Ano 2010	Nº Testes Positivos	Diluição	Significância	PCR	LEU	VS	Micro
Janeiro	0	0	NÃO	0	0	0	S/pedido
Fevereiro	1	1/40	NÃO	26,15	11,4	90	S/pedido
		1/80	NÃO	6,8	7,33	97	S/pedido
		1/160	SIM	1,36	12,97	38	S/pedido
Março	2	1/160	SIM	0,54	5,95	61	S/pedido
		1/40	NÃO	0,09	6,45	60	S/pedido
		1/80	NÃO	0,053	9,6	14	S/pedido
		1/40	NÃO	1,04	7	20	S/pedido
		1/320	SIM	0,14	3,85	4	S/pedido
		1/80	NÃO	7,89	8,21	25	S/pedido
Abril	0	1/40	NÃO	0,11	4,23	24	S/pedido
		1/40	NÃO	0,12	1,46	35	S/pedido
Maio	2	1/320	SIM	0,87	5,46	30	S/pedido
		1/320	SIM	0,6	3,79	28	S/pedido
		1/40	NÃO	8,28	3,78	85	S/pedido
		1/80	NÃO	11	3,63	78	S/pedido
		1/80	NÃO	0,04	9,14	2	S/pedido
Junho	1	1/320	SIM	8,9	5,02	9	S/pedido
		1/40	NÃO	0,13	7,98	67	S/pedido
		1/40	NÃO	10,89	9,1	89	S/pedido
		1/80	NÃO	11,34	8,98	34	S/pedido
Julho	5	1/320	SIM	6,44	3,46	62	S/pedido
		1/160	SIM	6	3,58	70	S/pedido
		1/160	SIM	1,45	4,67	45	S/pedido
		1/320	SIM	10	4,95	72	S/pedido
		1/320	SIM	0,16	3,54	34	Negativo
Agosto	0	0	NÃO	0	0	0	S/pedido
Setembro	0	1/40	NÃO	2,23	13,16	60	S/pedido
		1/40	NÃO	0,19	4,8	11	S/pedido
		1/80	NÃO	2,43	15,51	70	S/pedido
Outubro	0	1/40	NÃO	0,43	5,82	60	S/pedido
		1/40	NÃO	8,07	9,86	51	S/pedido
Novembro	0	1/40	NÃO	0,13	5,04	18	S/pedido
		1/80	NÃO	14,12	10,09	23	S/pedido
Dezembro	0	1/80	NÃO	0,61	6,6	60	S/pedido
		1/80	NÃO	2,75	10,3	20	S/pedido
		1/80	NÃO	0,14	5,28	12	S/pedido

### Anexo III: Dados relativos a seroprevalência da brucelose em 2011

Ano 2011	Nº Testes Positivos	Diluição	Significância	PCR	LEU	VS	Micro
Janeiro	0	1/40	NÃO	5,54	8,63	71	S/pedido
		1/80	NÃO	1,32	17,14	80	S/pedido
Fevereiro	0	0	NÃO	0	0	0	S/pedido
Março	0	1/40	NÃO	0,2	4,52	22	S/pedido
		1/40	NÃO	0,94	3,97	78	S/pedido
		1/80	NÃO	21,61	9,17	90	S/pedido
Abril	1	1/160	SIM	0,93	4,82	101	S/pedido
Maio	1	1/160	SIM	2,07	8,62	28	S/pedido
Junho	0	1/80	NÃO	2,76	7,03	47	S/pedido
Julho	0	1/80	NÃO	7,12	15,18	1	S/pedido
		1/80	NÃO	1,95	2,93	60	S/pedido
Agosto	0	0	NÃO	0	0	0	S/pedido
Setembro	0	0	NÃO	0	0	0	S/pedido
Outubro	0	0	NÃO	0	0	0	S/pedido
Novembro	0	1/40	NÃO	0,16	5,29	8	S/pedido
		1/80	NÃO	14,2	18,01	60	S/pedido
Dezembro	0	1/80	NÃO	0,61	6,64	32	S/pedido
		1/80	NÃO	2,75	10,38	30	S/pedido
		1/80	NÃO	0,19	5,28	12	S/pedido

~

## Anexo IV: Dados relativos a seroprevalência da brucelose em 2012

Ano 2012	Nº Testes Positivos	Diluição	Significância	PCR	LEU	VS	Micro
Janeiro	0	1/40	NÃO	3,47	8,07	89	S/pedido
		1/40	NÃO	2,52	9,16	55	S/pedido
		1/40	NÃO	1,67	8,98	90	S/pedido
Fevereiro	0	1/80	NÃO	5,87	9,09	56	S/pedido
Março	1	1/160	SIM	1,6	9,63	44	S/pedido
Abril	2	1/160	SIM	4,37	19,02	84	S/pedido
		1/160	SIM	3,76	12,09	45	S/pedido
Maio	0	0	NÃO	0	0	0	S/pedido
Junho	0	1/80	NÃO	0,7	18	19	S/pedido
Julho	0	0	NÃO	0	0	0	S/pedido
Agosto	0	1/80	NÃO	2,43	4,91	56	S/pedido
Setembro	0	0	NÃO	0	0	0	S/pedido
Outubro	0	0	NÃO	0	0	0	S/pedido
Novembro	0	1/40	NÃO	2,61	3,54	60	S/pedido
		1/80	NÃO	1,97	11,47	14	S/pedido
		1/80	NÃO	23,3	9,44	141	S/pedido
Dezembro	0	1/80	NÃO	6,05	9,4	50	S/pedido

## Anexo V: Dados relativos a seroprevalência da brucelose em 2013

Ano 2013	Nº Testes Positivos	Diluição	Significância	PCR	LEU	VS	Micro
Janeiro	0	0	NÃO	0	0	0	S/pedido
Fevereiro	1	1/80	NÃO	0,9	7,6	59	S/pedido
		1/160	SIM	3,35	5,3	17	S/pedido
Março	0	1/40	NÃO	0,28	8,4	24	S/pedido
Abril	2	1/160	SIM	7,43	8,27	73	S/pedido
		1/160	SIM	4,21	6,9	30	S/pedido
Maio	0	1/80	NÃO	0,05	7,33	15	S/pedido
Junho	3	1/320	SIM	6,86	7,57	48	S/pedido
		1/160	SIM	0,65	8,45	31	S/pedido
		1/320	SIM	12,35	6,9	73	S/pedido
Julho	0	0	NÃO	0	0	0	S/pedido
Agosto	0	0	NÃO	0	0	0	S/pedido
Setembro	0	0	NÃO	0	0	0	S/pedido
Outubro	1	1/80	NÃO	0,9	5,7	54	S/pedido
		1/160	SIM	1,43	6,08	32	S/pedido
Novembro	0	1/40	NÃO	14	2,3	97	S/pedido
Dezembro	0	0	NÃO	0	0	0	S/pedido

## Anexo VI: Procedimento laboratorial do teste de Wright

COD 33001 Multiscreening 100 x 6 tests	COD 33080 Salmonella 100 x 8 tests
CONSERVAR A 2-8°C	
Reagentes para a determinação de anticorpos frente aos antígenos febris Só para uso <i>in vitro</i> em laboratório clínico	

FEBRILE SERODIAGNOSTICS

**BioSystems**  
REAGENTS & INSTRUMENTS



**SORODIAGNÓSTICO FEBRIL**  
Aglutinação  
PROVAS NA PORTA E TUBO

### FUNDAMENTO DO MÉTODO

Os antígenos febris são suspensões normalizadas de bactérias tingidas que são utilizadas para identificar e quantificar anticorpos específicos que se desenvolvem durante algumas infecções febris tais como a brucelose, salmonelose e certas rickettsioses. O antígeno na suspensão aglutina na presença do correspondente anticorpo homólogo nas amostras ensaiadas<sup>1,3</sup>.

### CONTEÚDO

Código	Componente	Individual	Kit 33001	Kit 33080
33309	<i>Brucella abortus</i>	1 x 5 mL	-	-
33315	<i>Brucella abortus</i> /Rosa Bengala	1 x 5 mL	1 x 5 mL	-
33307	<i>Salmonella typhi</i> H (H: d)	1 x 5 mL	1 x 5 mL	1 x 5 mL
33308	<i>Salmonella typhi</i> OU (OU: 9,12)	1 x 5 mL	1 x 5 mL	1 x 5 mL
33301	<i>Salmonella Paratyphi</i> AH (Ha)	1 x 5 mL	1 x 5 mL	1 x 5 mL
33302	<i>Salmonella Paratyphi</i> AO (OU:1,2,12)	1 x 5 mL	-	1 x 5 mL
33303	<i>Salmonella Paratyphi</i> BH (Hb)	1 x 5 mL	1 x 5 mL	1 x 5 mL
33304	<i>Salmonella Paratyphi</i> BO (OU:1,4,5,12)	1 x 5 mL	-	1 x 5 mL
33305	<i>Salmonella Paratyphi</i> CH (Hc)	1 x 5 mL	-	1 x 5 mL
33306	<i>Salmonella Paratyphi</i> CO (OU:6,7)	1 x 5 mL	-	1 x 5 mL
33311	<i>Proteus</i> OX19	1 x 5 mL	1 x 5 mL	-
33510	C+S: Controlo Positivo <i>Salmonella</i>	1 x 1 mL	1 x 1 mL	-
33509	C+B: Controlo Positivo <i>Brucella</i>	1 x 1 mL	1 x 1 mL	-
33502	C+P: Controlo Positivo <i>Proteus</i>	1 x 1 mL	1 x 1 mL	-
33503	C-: Controlo Negativo Serologia	1 x 1 mL	1 x 1 mL	-

### COMPOSIÇÃO

- Antígenos febris: Suspensão de bactérias inactivadas e tingidas (somáticas azul, flagelares vermelho), azida sódica 0,95 g/L.
- C- Controlo Negativo: Soro humano negativo, azida sódica 0,95 g/L.
- C+ Controlo Positivo: Soro contendo o correspondente anticorpo febril, azida sódica 0,95 g/L.
- Todos os componentes de origem humana utilizados na preparação do controlo negativo eram negativos para o antígeno HBs e para os anticorpos anti-HCV e anti-HIV. Não obstante, os controlos devem ser tratados com precaução como potencialmente infecciosos.

### CONSERVAÇÃO

Conservar a 2-8°C. Os antígenos febris e os Controlos são estáveis até à data de caducidade indicada na etiqueta, sempre que se conservem bem fechados e se evite a contaminação durante o seu uso.

Indicações de deterioração (Nota 1):

- Antígenos febris: presença de aglutinação no frasco.
- Controlos: presença de material particulado.

### PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Os antígenos febris e os controlos estão prontos para serem utilizados. (Nota 2).

### EQUIPAMENTO ADICIONAL

- Agitador mecânico rotatório de velocidade regulável a 100 r.p.m.

### AMOSTRAS

Soro recolhido através de procedimentos standard. Estável 7 dias a 2-8°C. Não utilizar amostras hemolisadas ou lipémicas.

### PROCEDIMENTO

#### A. PROVA NA PORTA

1. Deixar temperar os reagentes e as amostras à temperatura ambiente (Nota 3).
2. Depositar 1 gota (50 µL) da amostra a ser ensaiada (Notas 4, 5) e 1 gota de cada Controlo nos círculos separados da porta.
3. Homogeneizar o antígeno com suavidade antes de usá-lo. Acrescentar em cada círculo 1 gota (50 µL) de antígeno próxima à gota da amostra.
4. Misturar com a ajuda de um misturador descartável, procurando estender a mistura por toda a superfície interior do círculo. Empregar misturadores diferentes para cada amostra.
5. Agitar a porta manualmente ou no agitador rotatório a 100 r.p.m. durante 2 minutos (B. Rosa Bengala durante 4 minutos).

#### B. PROVA NO TUBO

1. Diluir as amostras de soro 1/20, os Controlos 1/10 com NaCl 9 g/L, e preparar de cada um séries de duplas diluições em NaCl 9 g/L.
2. Preparar, para cada antígeno a ser ensaiado, uma fila de tubos que contenha 1 mL de cada diluição do soro e dos Controlos (Positivo e Negativo).
3. Agitar suavemente o frasco de antígeno e acrescentar em cada tubo uma gota (50 µL) da suspensão apropriada. Misturar.
4. Incubar os tubos a 37°C durante 24 h (Nota 6).

### LEITURA

#### A. PROVA NA PORTA

Examinar a presença de aglutinação no minuto seguinte à parada do agitador (Nota 7).

Resultados positivos: Presença de aglutinação. Os soros positivos devem ser quantificados por meio da prova em tubo. No caso da *Brucella Rosa Bengala*, a presença de aglutinação indica um conteúdo de anticorpo  $\geq 25$  UI/mL.

Resultados negativos: Ausência de aglutinação visível.

#### B. PROVA NO TUBO

Examinar a presença e tipo de aglutinação.

Resultados positivos: Aglutinação parcial ou completa acompanhada de aclarações variáveis do sobrenadante. A aglutinação somática caracteriza-se por ser fina e granular, de formação lenta e dificilmente desagregável. Ao contrário, a aglutinação flagelar é algodoada, de formação rápida e facilmente desagregável. Define-se o título como a diluição maior que dá resultado positivo.

Resultados negativos: Ausência de aglutinação visível.

### CONTROLO DE QUALIDADE

Os Controlos Positivo (C+) e Negativo (C-) devem ser ensaiados conjuntamente com as amostras dos pacientes, com o objectivo de verificar o correcto funcionamento da prova.

O Controlo Positivo (C+) deve provocar a aglutinação dos correspondentes antígenos febris.

O Controlo Negativo (C-) não deve ocasionar aglutinação visível.

Cada laboratório deve estabelecer o seu programa de Controlo de Qualidade interno e procedimentos de correcção no caso dos controlos não cumprirem com as tolerâncias aceites.

### CARACTERÍSTICAS DO ENSAIO

- Detecção: 25 UI/mL para a suspensão de *Brucella abortus* / Rosa de Bengala utilizando o 2º Padrão Internacional da OMS.
- Efeito de alta concentração (zona): Podem ser obtidos falsos resultados negativos nos soros que contenham um elevado título de anticorpos. Uma diluição destes soros será positiva.
- Resultados falsos: Os resultados obtidos com estes antígenos não indicam diferenças significativas ao serem comparados com antígenos de referência. Os detalhes do estudo comparativo estão disponíveis através de solicitação.
- Interferências: Os factores reumatóides (300 UI/mL) não interferem.

### CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

Os resultados positivos são uma ajuda no diagnóstico de algumas doenças febris. Não obstante, a aglutinação não pode ser considerada prova de infecção por um organismo particular já que diferentes microorganismos têm antígenos comuns. As provas de sorodiagnóstico febril deveriam ser utilizadas paralelamente com cultivos adequados para o isolamento e identificação do organismo causal.

Títulos superiores a 1/80 para os antígenos de *Salmonella* ou *Brucella* são geralmente indicativos de infecção recente. Títulos menores são frequentes em indivíduos sadios, especialmente nas áreas com elevada prevalência de infecções febris. O soro de muitos indivíduos sadios contém anticorpos frente aos antígenos de *Proteus*. Um título inferior a 1/160 não deve ser considerado significativo.

Um resultado positivo isolado tem menor significado clínico que a demonstração de um aumento ou diminuição do título entre amostras tomadas do paciente em diferentes dias.

Um resultado negativo não descarta uma infecção, já que a amostra pode ter sido tomada antes do paciente produzir anticorpos. Também podem ser obtidos falsos negativos nos casos de imunodeficiência, prozona (Brucelose) e tratamento com antibióticos.

O diagnóstico clínico não deve ser realizado considerando apenas o resultado de um único ensaio, senão que deve integrar os dados clínicos e de laboratório.

### NOTAS

1. A intensidade da cor pode variar lote a lote sem que isso afecte os resultados.
2. O antígeno Rosa de Bengala deve ser utilizado exclusivamente para provas na porta.
3. A sensibilidade do ensaio pode ser reduzida se for efectuada em baixas temperaturas.
4. Para evitar a prozona, recomenda-se reduzir a amostra a 20 µL para *Brucella*.
5. Nos países com elevada prevalência de doenças febris, recomenda-se diluir a amostra 1/4 em NaCl 9 g/L antes de realizar o ensaio.
6. Alternativamente, incubar a 48-50°C durante 2 h (flagelares) ou 4 h (somáticos e *Proteus*).
7. Atrasos nas leituras podem ocasionar falsos resultados positivos.

### BIBLIOGRAFIA

1. Felix A. Technique and interpretation of the Weil-Felix test in typhus fever. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1944; 37: 321-325
2. Felix A. Standardisation des épreuves d'agglutination servant au diagnostic. *Bull. WHO* 1950; 2: 685-691
3. Alton GG et al. Techniques for the brucellosis laboratory. INRA Paris, 1988.
4. Gualtney J B et al. Microagglutination procedures for febrile agglutination tests. *Appl Microbiol* 1971; 22: 635-640