



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**Brucelose em mamíferos marinhos:
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Bruno Miguel da Gama Bizarro

Coimbra, Julho de 2015



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Brucelose em mamíferos marinhos:
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Coimbra, Julho de 2015

Autor

Bruno Miguel da Gama Bizarro

Aluno do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Orientador Interno

Professora Dr.^a Sofia Cancela Duarte

Orientador Externo

Dr. Daniel García Párraga

(Médico Veterinário – L'Oceanográfico)

Dr.^a Sara Mendes

(Médica Veterinária - CRAM-Q)

Dissertação do Estágio curricular dos ciclos de estudo conducentes ao Grau de Mestre em Medicina Veterinária da Escola Universitária Vasco de Gama

Resumo

A Brucelose é uma zoonose de origem bacteriana frequentemente reportada tanto em animais terrestres como marinhos. Foram reportados casos de Brucelose marinha em países do Sul da Europa e América do Sul. É uma bactéria causadora de arrojamentos de animais marinhos, por originar problemas de natalidade e flutuabilidade.

Como potenciais foram identificadas 130 espécies de animais marinhos, entre os quais 86 espécies de cetáceos e 36 espécies de pinípedes.

Brucella ceti e *Brucella pinnipedialis* são as duas espécies mais comuns e importantes de brucelose em animais marinhos.

Este agente patogénico dissemina-se principalmente para os órgãos e tecidos, como o baço, gânglios linfáticos, útero, testículos, glândula mamária e tecido nervoso através de inclusões intra-fagocitárias.

Nos dias de hoje, existe um grande contacto entre o Homem e animais marinhos, como tal, a redução ou eliminação desta bactéria é um passo essencial para minimizar e prevenir o problema, evitando assim a perda de espécies tão importantes e prevenindo uma questão de saúde pública.

Este trabalho de revisão tem como objetivo rever o conhecimento atual sobre brucelose em animais marinhos, as respetivas espécies infetantes, as suas manifestações clínicas, epidemiologia, diagnóstico e a terapêutica utilizada. Adicionalmente pretende-se abordar o que poderá ser feito para aumentar a eficácia de diagnóstico e tratamento desta patologia nestes animais, melhorando as suas condições de vida em cativeiro e evitando a sua morte em liberdade.

Palavras-chave: *Brucella* spp., Brucelose, animais marinhos, zoonose, arrojamento, *Brucella ceti*, *Brucella pinnipedialis*.

ABSTRACT

Brucellosis, is a zoonosis of bacterial origin, frequently reported both in terrestrial and marine animals. It has the ability to infect humans. Marine brucellosis has already been reported in countries from South Europe and South America. This pathogenic agent is the cause of live and dead animal strandings due to swimming disorders and buoyancy problems.

It is already recognized 130 species of marine mammal hosts of *Brucella* spp., of which, 86 species are cetaceans and 36 species are Pinnipeds.

Brucella ceti and *Brucella pinnipedialis* are the two most important species in marine mammals brucellosis.

This pathogenic agent spreads primarily through organs and tissue like spleen, lymph nodes, uterus, testicles, mammary gland and nervous system due to intra-phagocytic inclusions.

In fact, nowadays, there is a great relationship and contact between humans and marine mammals, therefore, it is very important to avoid the spreading of the disease, and control and eliminate this agent, which is crucial to minimize losses, such as, dead animals and infected Humans, avoiding a public health problem.

The aim of this study was to perform a review over brucellosis in marine mammals, its infection and clinical signs, its manifestation in different species of marine mammals, define its transmission from host to host, available treatment and what can be done in the near future to create new ways to diagnose and treat this disease in this animals, contributing to better health and living conditions in captivity and avoiding death in the wild.

Keywords: *Brucella* spp., Brucellosis, marine mammals, Zoonosis, strandings, *Brucella ceti*, *Brucella pinnipedialis*.

“Life doesn't give us purpose.

We give life purpose.”

Barry Allen

AGRADECIMENTOS

Concluída esta jornada que fica consumada com a entrega da presente Dissertação do meu Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, gostaria de expressar os meus enormes agradecimentos a todos que de uma forma ou de outra me auxiliaram neste percurso, nada fácil, facilitando a minha formação.

À EUVG, por ter sido a minha vida durante muitos anos. A todos os funcionários que sempre mostraram enorme profissionalismo e paciência.

A toda a equipa do CRAM-Q por terem contribuído para a minha aprendizagem durante o estágio curricular.

A toda a equipa do L'Océanographic de Valência, por toda a riqueza que transmitiram em forma de conhecimento e me terem recebido muito bem. À Professora Doutora Sofia Cancela Duarte, por todo o apoio e dedicação quando mais precisei. Obrigado pela paciência, pelos conselhos, pela disponibilidade por todos os ensinamentos que tão bem me soube transmitir ao longo dos anos.

À Dr.^a Mónica Valls pela disponibilidade demonstrada durante os meses fantásticos que vivi em Valência onde experienciei o sonho de uma vida e tive oportunidade de aprender com os melhores profissionais do mundo.

A toda a equipa de Veterinários do L'Océanographic de Valência, por me terem feito sentir “um deles” e permitirem viver a vida de um Veterinário de animais marinhos.

Aos meus verdadeiros amigos, por me terem acompanhado SEMPRE!

Ao meu cão porque foi, é, e sempre será o meu melhor amigo.

Agradeço ao meu Pai, pelo apoio e paciência nos períodos mais complicados e estar presente nos momentos mais felizes.

Aos meus Avós, por me terem sempre apoiado, por todos os sacrifícios que realizaram e por lutarem cada dia para que nunca me faltasse nada e pudesse atingir todos os meus sonhos.

À minha prima por ser sempre minha amiga.

A ti, que sempre tiveste para mim como mais ninguém, a ti, porque sem ti nada disto tinha sido possível, o meu eterno obrigado.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xi
1. Introdução	1
2. Nota histórica.....	1
3. Etiologia.....	3
3.1. Características microbiológicas.....	3
4. Hospedeiros	4
5. Vias de transmissão.....	6
5.1. Transmissão direta	7
5.1.1. Vertical.....	7
5.1.2. Horizontal	7
5.2. Transmissão indireta	8
6. Patogenia.....	8
7. Manifestações clínicas.....	9
7.1. Cetáceos	9
7.2. Pinípedes	12
7.3. Humanos.....	13
7.4. Outros animais	13
8. Diagnóstico diferencial	13
9. Patologia Clínica de <i>Brucella</i> spp. em animais marinhos.....	14
10. Diagnóstico de Brucelose em animais marinhos.	14
10.1. Provas Diretas	15
10.2. Provas Indiretas	16
10.3. Procedimentos de Diagnóstico	17
11. Terapêutica.....	18
12. Profilaxia médica	18
13. Considerações finais	19
14. Referências Bibliográficas	21

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição mundial de cetáceos seropositivos a <i>Brucella</i> spp.	2
Figura 2 - Distribuição mundial de espécies marinhas seropositivas a <i>Brucella</i> spp.	2
Figura 3 – Macrófagos inoculados com <i>Brucella</i> spp. MO 1000x, Giemsa.	4
Figura 4 - Arrojamento de cetáceos com contacto com outros animais e Humanos na Costa Rica....	6
Figura 5 - Larvas de <i>Halocercus</i> spp. no pulmão de um Boto.	8
Figura 6 - Achados Histopatológicos em cetáceos com neurobrucelose..	10
Figura 7 - Achados patológicos no tegumento e coração de cetáceos.	11
Figura 8 - Ausência de côndilos occipitais e de processos laterais vertebrais da articulação atlanto-occipital de um golfinho.	12
Figura 9 - Achados patológicos do sistema reprodutivo de um golfinho riscado (<i>Stenella coeruleoalba</i>)	12
Figura 10 - Fluxograma de processos a seguir, em casos de arrojamento de um animal com suspeita de brucelose, diante de um arrojamento.	17

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Espécies de brucela infetantes das diferentes famílias de animais.....	5
---	---

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
DGAV	Direção-Geral de Alimentação e Veterinária
DVM	<i>Doctor of Veterinary Medicine</i> (Médico veterinário)
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i> (Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos)
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (teste imuno-enzimático)
EUA	Estados Unidos da América
LPS	Lipopolissacarídeo
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia de polimerase)
PhD	<i>Philosophy Doctor</i> (Doutorado)
SNP	<i>Single nucleotide Polymorphism</i> (polimorfismo de nucleótido único)
Th	<i>T helper</i> (linfócito T auxiliar)

1. Introdução

A Brucelose é uma patologia infectocontagiosa de carácter zoonótico causado por uma bactéria, *Brucella* spp.. Esta patologia afeta uma extensa variedade de espécies de animais, onde se incluem os animais marinhos (Foster *et al.*, 2002; Pessegueiro *et al.*, 2003; Whatmore *et al.*, 2008; Hernández-Mora *et al.*, 2008; Hernández-Mora *et al.*, 2009; Hernández-Mora *et al.*, 2013).

No ano de 1953, com o Decreto-Lei n.º 39209 a 14 de maio, iniciaram-se ações de luta contra a Brucelose em pequenos ruminantes em Portugal, país onde esta patologia tem carácter de declaração obrigatória, através da implementação de campanhas de controlo da Brucelose em caprinos, assim como, a sua extensão a ovinos e seus coabitantes. Os programas de controlo da doença referidos anteriormente são justificáveis devido aos prejuízos económicos e riscos para a Saúde pública que esta patologia apresenta (Baucheron *et al.*, 2002; El-Tras *et al.*, 2010; DGAV, 2012).

Países com animais marinhos em cativeiro e que apresentam uma larga costa marítima estão propensos a um maior número de casos de Brucelose, sobretudo em animais arrojados na praia, onde esta patologia aparenta ser uma das principais causas para este fenómeno (Walsh *et al.*, 2001: 83; González *et al.*, 2002; Guzmán-Verri *et al.*, 2012). Até ao momento já foram identificadas 130 espécies de animais marinhos como potenciais hospedeiras desta patologia, onde estão englobadas 86 espécies de cetáceos das subordens Mysticeti e Odontoceti (inclui baleias, golfinhos e botos) e 36 espécies de pinípedes incluindo a família Otariidae (leões marinhos), Odobenidae (morsas) e Phocidae (focas) (Figuras 1 e 2). Das 130 espécies referidas anteriormente, 53 foram confirmadas como seropositivas para a Brucelose através de métodos convencionais de diagnóstico (Tabela 1) (Jefferson *et al.*, 2008; Hernández-Mora *et al.*, 2009; Guzmán-Verri *et al.*, 2012; Hernández-Mora *et al.*, 2013).

Deste modo, torna-se importante a realização de uma revisão bibliográfica acerca desta patologia, na perspetiva mundial, abordando a etiologia, a sua patogenia, mecanismos de transmissão, manifestações e sinais clínicos nas diferentes espécies, achados patológicos, métodos de diagnóstico, diagnósticos diferenciais, tratamento e sua prevenção.

2. Nota histórica

Em 1994, nos EUA foi isolada pela primeira vez a bactéria *Brucella* spp., a partir de um feto abortado de golfinho roaz do Atlântico (*Tursiops truncatus*), que se encontrava em cativeiro. Nesse mesmo ano foi também isolada *Brucella* spp. de uma carcaça de foca vitulina (*Phoca vitulinae*), de um boto (*Phocoena phocoena*) e de um golfinho comum (*Delphinus delphis*) arrojados ao largo da costa da Escócia. O isolamento de várias espécies de *Brucella* spp. em animais que habitam em diferentes habitats, sugere uma distribuição mundial deste agente (Ewalt *et al.*, 1994; González-Barrientos *et al.*, 2009; Hernández-Mora *et al.*, 2009; Hernández-Mora *et al.*, 2013).



Figura 1- Distribuição mundial de cetáceos seropositivos a *Brucella* spp. (adaptado de Hernández-Mora *et al.*, 2013).

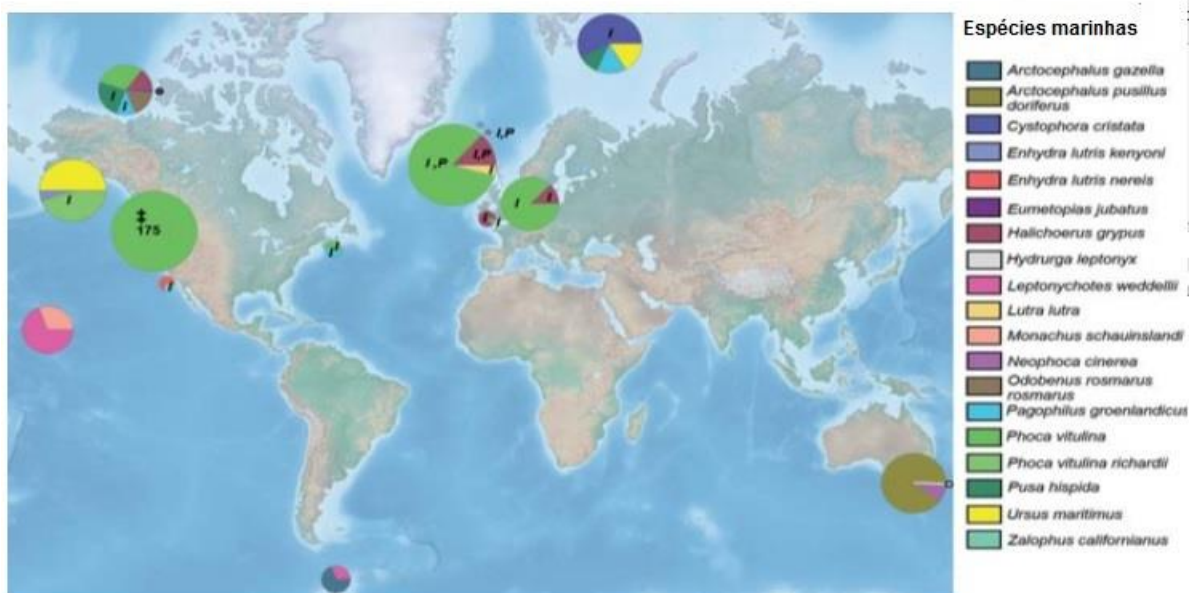


Figura 2 - Distribuição mundial de espécies marinhas seropositivas a *Brucella* spp. (adaptado de Hernández-Mora *et al.*, 2013).

Inicialmente foram propostos vários nomes para as diferentes espécies de *Brucella* spp. que afetam os animais marinhos. Primeiramente foi atribuído o nome de *Brucella maris* a um conjunto de

variantes desta bactéria que afetavam estes animais (CloECKaert *et al.*, 2001; González *et al.*, 2002; Pessegueiro *et al.*, 2003; Foster *et al.*, 2007; Whatmore *et al.*, 2007). Posteriormente foram divididas em *Brucella cetaceae* e *Brucella Pinnipidae* (CloECKaert *et al.*, 2001; Foster *et al.*, 2002; Pappas *et al.*, 2005; Whatmore *et al.*, 2007; Prenger-Berninghoff *et al.*, 2008). Em 2009, foi convencionado que estas duas variantes fossem aceites como espécies, sendo por isso o seu nome alterado para *Brucella ceti* e *Brucella pinnipedialis*. Estas duas espécies foram posteriormente classificadas de acordo com o seu biótipo molecular (Foster *et al.*, 2007; Dawson *et al.*, 2008; Hernández-Mora *et al.*, 2009; Fernandes, 2012).

A espécie *Brucella ceti* já foi isolada em soro sanguíneo de cetáceos das famílias Phocoenidae (e.g. boto), Delphinidae (e.g. golfinhos, orcas), Monodontidae (e.g. belugas), Balaenidae (e.g. baleia franca) e Balaenopteridae (e.g. baleia azul) através da reação em cadeia de polimerase (do Inglês Polymerase Chain Reaction, PCR), nas quais onze espécies já foram identificadas como infetadas. A maioria destes isolados de *Brucella* spp. foram obtidos de cetáceos arrojados em praias do Oceano Atlântico junto ao continente Europeu e Americano, bem como do Oceano Pacífico (Nielsen *et al.*, 2001; Foster *et al.*, 2002; Hernández-Mora *et al.*, 2008; Neimanis *et al.*, 2008; Guzmán-Verri *et al.*, 2012).

Embora esta bactéria seja rara em humanos, em 2013 foram reportados 357 novos casos desta patologia, na sua maioria em habitantes de países do mediterrâneo. Cerca de 70% dos casos reportados foram hospitalizados, mas apenas um desses casos foi mortal. Apesar destes casos registados, a incidência de Brucelose em gado bovino, ovino e caprino tem diminuído (Fernandes, 2012; EFSA, 2015).

3. Etiologia

Atualmente são reconhecidas 10 espécies de *Brucella*, entre as quais *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* e *B. neotomae*. As restantes quatro espécies foram identificadas mais recentemente, designadamente *B. pinnipedialis*, *B. ceti*, *B. microti* e *B. inopinata*. Esta classificação baseia-se em características fenotípicas e genotípicas e na patogenicidade da bactéria (Pessegueiro *et al.*, 2003; Ohishi *et al.*, 2004; Perrett *et al.*, 2004; McDonald *et al.*, 2006; Groussaud *et al.*, 2007; Whatmore *et al.*, 2007; Dawson *et al.*, 2008; Hernández-Mora *et al.*, 2009).

3.1. Características microbiológicas

Brucella spp. é um cocobacilo intracelular não capsulado, que afeta o Homem, bem como os animais terrestres e marinhos (Figura 3). Relativamente às características microbiológicas, esta bactéria não apresenta motilidade, é urease negativa, oxidase positiva, catalase negativa, Gram negativa, e não requer obrigatoriamente a presença de dióxido de carbono para o seu crescimento (Ewalt *et al.*, 1994; CloECKaert *et al.*, 2001; Foster *et al.*, 2007). Esta pode ser isolada em meio Brucela agar ou agar sangue, apesar de estar igualmente descrita a cultura em agar Hektoen, agar MacConkey, agar manitol sal (MSA), e agar tiossulfato citrato sais biliares (TCBS) (Foster *et al.*, 2002; Cay *et al.*,

2009; Jauniaux *et al.*, 2010; Goel *et al.*, 2013). O género *Brucella* foi classificado como mono-específico uma vez que apresenta uma homologia superior a 95% em testes moleculares (Pessegueiro *et al.*, 2003; Foster *et al.*, 2007; Dawson *et al.*, 2008; Hernández-Mora *et al.*, 2008; González-Barrientos *et al.*, 2009; Guzmán-Verri *et al.*, 2012).

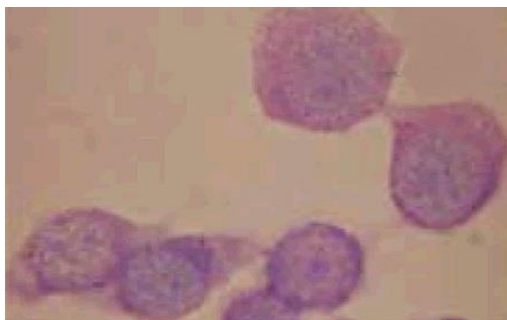


Figura 3 – Macrófagos inoculados com *Brucella* spp. MO 1000x, Giemsa (adaptado de Serafino *et al.*, 2007).

4. Hospedeiros

Nas últimas décadas, diferentes espécies desta bactéria foram isoladas em diversas espécies de animais marinhos, sendo que as mais afetadas são as famílias Delphinidae, Phocoenidae, Otariidae e Phocidae (Foster *et al.*, 2002; Foster *et al.*, 2007; Groussaud *et al.*, 2007; Dagleish *et al.*, 2008; González-Barrientos *et al.*, 2009; Hernández-Mora *et al.*, 2009; Jauniaux *et al.*, 2010).

A família Delphinidae é constituída por várias espécies de golfinhos entre as quais o golfinho comum (*Delphinus delphis*), golfinho riscado (*Stenella coeruleoalba*), golfinho roaz (*Tursiops truncatus*), e ainda a orca (*Orcinus orca*) (Nikaido *et al.*, 2001; Jefferson *et al.*, 2008: 17,19).

A família Phocoenidae está relacionada com os golfinhos e baleias, são designados de Botos como nome comum e algumas das espécies mais conhecidas são, o boto da Califórnia (*Phocoena sinus*), o boto comum (*Phocoena phocoena*) e o boto de Burmeister (*Phocoena spinipinnis*) (Jefferson *et al.*, 2008: 17,19).

A família Otariidae é constituída por variadas espécies de leões marinhos, incluindo o leão marinho Californiano (*Zalophus californianus*), leão marinho Patagónico (*Otaria flavescens*) e ainda o leão marinho de Stellar (*Eumetopias jubatus*) (Jefferson *et al.*, 2008: 21, 308, 312).

A família Phocidae inclui as focas e está representada por algumas espécies mais conhecidas, tais como a foca vitulina (*Phoca vitulina*) e a foca leopardo (*Hydrurga leptonyx*) (Jefferson *et al.*, 2008: 21, 380).

As famílias Delphinidae e Phocoenidae são mais afetadas pela espécie *Brucella ceti*, enquanto os membros da família Otariidae e Phocidae são mais afetados por *Brucella pinnipedialis* (Foster *et al.*, 2007; Hernández-Mora *et al.*, 2009; Nymo *et al.*, 2011; Guzmán-Verri *et al.*, 2012; Hernández-Mora *et al.*, 2013).

As espécies de *Brucella* spp. observadas em animais marinhos demonstraram ser semelhantes às espécies identificadas em animais terrestres, por possuírem os mesmos antigénios de superfície usados para o diagnóstico de *B.melitensis* e *B.abortus*. Este facto facilita a utilização de métodos de diagnóstico para animais marinhos, uma vez que assim podem ser usadas algumas das provas usadas para bovinos, caprinos e ovinos (Tabela 1) (Cloeckert *et al.*, 2001; Nielsen *et al.*, 2001; Baucheron *et al.*, 2002; Hernández-Mora *et al.*, 2009; Meegan *et al.*, 2010; Guzmán-Verri *et al.*, 2012; Hernández-Mora *et al.*, 2013).

Tabela 1- Espécies de *Brucella* infetantes das diferentes famílias de animais (adaptado de Guzmán-Verri *et al.*, 2012).

Espécies Hospedeiros	Espécies									
	<i>B. microti</i>	<i>B. inopinata</i>	<i>B. canis</i>	<i>B. pinnipedialis</i>	<i>B. ceti</i>	<i>B. abortus</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. ovis</i>	<i>B. suis</i>	<i>B. neotomae</i>
Rodentia (Roedores)	X								X	X
Hominidae		X			X		X			
Canidae			X							
Mustelidae (Lontras)				X						
Pinnipedia				X						
Phocoenidae					X					
Delphinidae					X					
Hippopotamidae						X	X			
Bovidae (Bovinos)						X	X			
Caprinae (Caprinos)						X	X	X		
<i>Ovis</i> spp. (Ovinos)						X	X	X		
Cervidae (Renas)									X	
Suidae (Suínos)									X	

A maioria dos casos confirmados de Brucelose em animais marinhos ocorreu em Odontocetos arrojados na praia, com natação errática e problemas de orientação. O arrojamento de animais marinhos na praia chama a atenção dos banhistas e outras pessoas no local que acabam por contactar com os mesmos para os ajudar, ficando mais expostos e correndo maior risco de infeção (Figura 4).

(Garner *et al.*, 1997; Ohishi *et al.*, 2003; Sohn *et al.*, 2003; Neimanis *et al.*, 2008; Hernández-Mora *et al.*, 2009; Guzmán-Verri *et al.*, 2012; Hernández-Mora *et al.*, 2013).



Figura 4 - Arrojamento de cetáceos com contacto com outros animais e Humanos na Costa Rica. (A) Arrojamento de um golfinho riscado vivo com neurobrucelose socorrido por habitantes locais. (B) Arrojamento de uma baleia bicuda de Cuvier com serologia positiva para *Brucellose* spp. com gado bovino nas redondezas. (C) Arrojamento de um golfinho riscado vivo com neurobrucellose a ser transportado por turistas. (D) Arrojamento de uma baleia jubarte morta com contacto com os banhistas (adaptado de Guzmán-Verri *et al.*, 2012).

Em parques zoológicos e aquários, esta patologia não é analisada com regularidade, devido à falta de métodos de rastreio validados para o diagnóstico de brucelose em animais marinhos (Hernández-Mora *et al.*, 2009).

Brucela ceti é comum em cetáceos, mas apenas uma pequena porção dos animais infetados chega a desenvolver um quadro clínico típico, isto sugere que uma grande parte consegue autolimitar a patologia permanecendo como portadores. Os mais infetados são os membros da família Delphinidae, possivelmente devido ao seu comportamento natural, que apresenta uma grande componente social e sexual (Foster *et al.*, 2002; Dawson *et al.*, 2008; Hernández-Mora *et al.*, 2008; Prenger-Berninghoff *et al.*, 2008; Guzmán-Verri *et al.*, 2012).

5. Vias de transmissão

Nos animais marinhos a Brucelose é uma infeção crónica que persiste durante toda a vida do animal, a Brucelose apresenta assim vias de infeção verticais e horizontais diretas e indiretas (McDonald *et al.*, 2006; Dagleish *et al.*, 2008; González-Barrientos *et al.*, 2009; Whatmore, 2009; Diacovich & Gorvel 2010; Guzmán-Verri *et al.*, 2012)

Brucella spp. não apresenta motilidade e normalmente não sobrevive em condições adversas no ambiente. No entanto, apesar de não estar totalmente esclarecido sabe-se que é improvável que *Brucella ceti* consiga sobreviver fora do hospedeiro por períodos prolongados. Elevadas diluições desta bactéria, na água salgada, podem diminuir a transmissão do agente, devido a doses infetantes reduzidas (Guzmán-Verri *et al.*, 2012). Uma das alternativas é a transmissão através do contacto entre hospedeiros, tal como o coito e a amamentação (Hernández-Mora *et al.*, 2008; Maquart *et al.*, 2009; González-Barrientos *et al.*, 2009).

Em animais marinhos de cativeiro, o principal mecanismo de transmissão é a entrada de novos animais no grupo ou tanque. Quanto maior a frequência de adição de novos animais, maior o risco de entrada deste agente no grupo social, por isso mesmo deve ser evitada a introdução de animais não testados serologicamente (Dunn *et al.*, 2001: 312-314).

5.1. Transmissão direta

No animal infetado, os principais órgãos afetados (nos quais se localiza a bactéria), são o aparelho reprodutor masculino e feminino, gânglios linfáticos, baço, fígado e glândula mamária. A principal via de eliminação deste agente são os conteúdos fetais e abortivos, bem como o leite e sémen. A presença de *Brucella* spp. nos órgãos reprodutores acaba por ser a principal responsável pela disseminação da mesma, provocando esterilidade e aborto (Ohishi *et al.*, 2003; Goldstein *et al.*, 2009; González-Barrientos *et al.*, 2009; Maquart *et al.*, 2009; Jauniaux *et al.*, 2010; Nymo *et al.*, 2011; Guzmán-Verri *et al.*, 2012; Hernández-Mora *et al.*, 2013).

5.1.1. Vertical

Crias de animais infetados por *Brucella* spp. podem ser infetadas *in útero* e no puerpério, tornando-se uma possível fonte de infeção para os outros animais do grupo e/ou coabitantes do mesmo tanque. Estas crias mais tarde aquando da sua primeira gestação, podem abortar. As crias que não são infetadas por esta via estão também sujeitas a outra fonte de infeção, o leite materno, através do processo de lactação. Nos golfinhos o período de lactação dura 7 a 18 meses, aumentando o risco de infeção para a cria e coabitantes (Nielsen *et al.*, 2001; Foster *et al.*, 2002; Dagleish *et al.*, 2008; Hernández-Mora *et al.*, 2008; González-Barrientos *et al.*, 2009; Maquart *et al.*, 2009; Whatmore, 2009; Nymo *et al.*, 2011; Guzmán-Verri *et al.*, 2012; Hernández-Mora *et al.*, 2013).

5.1.2. Horizontal

As vias de transmissão horizontal e vertical são importantes porquanto os animais marinhos vivem em grupos numerosos, e apresentam um grande cariz social e sexual. Por outro lado, o contacto com os órgãos reprodutores de um animal infetado por meio de coito, é uma via de transmissão muito comum. A bactéria também pode estar presente no leite e produtos abortivos de animais previamente infetados. O contacto com estes produtos ou a própria ingestão de leite por outras crias e animais do mesmo grupo social ou tanque é também uma via importante de infeção (Cloeckaert *et al.*, 2001; Foster

et al., 2002; González-Barrientos *et al.*, 2009; Whatmore, 2009; Jauniaux *et al.*, 2010; Guzmán-Verri *et al.*, 2012; Hernández-Mora *et al.*, 2013).

5.2. Transmissão indireta

O contato com o Homem e outros animais permite uma disseminação alargada da patologia, uma vez que se trata de uma zoonose (Garner *et al.*, 1997; Sohn *et al.*, 2003; McDonald *et al.*, 2006; Groussaud *et al.*, 2007; Hernández-Mora *et al.*, 2008; Hernández-Mora *et al.*, 2013).

Outros mecanismos de infeção incluem a ingestão de peixe e helmintas infetados por *Brucella* spp. Os géneros *Halocercus* e *Pseudalius* são os parasitas actualmente reconhecidos, associados a uma carga infecciosa elevada de *Brucella* spp., estando presente em golfinhos e botos. Estes parasitas apresentam capacidade de atravessar a placenta e serem transmitidos de mãe para filho (Dagleish *et al.*, 2008; Dawson *et al.*, 2008; González-Barrientos *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2011; Guzmán-Verri *et al.*, 2012; Hernández-Mora *et al.*, 2013).

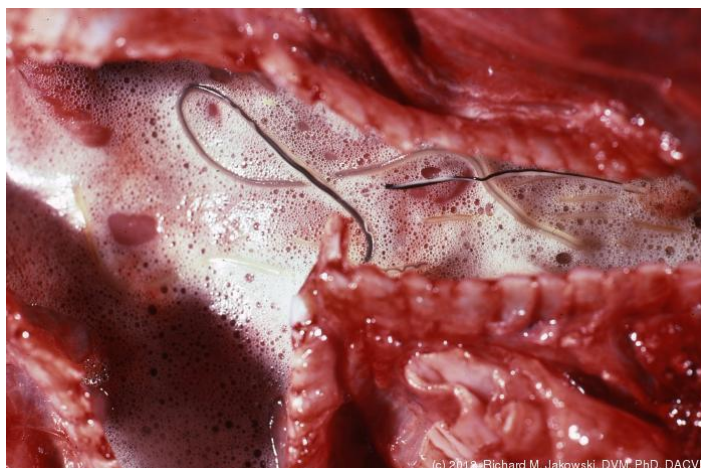


Figura 5 - Larvas de *Halocercus* spp. no pulmão de um Boto (<http://ocw.tufts.edu/Content/72/imagegallery/1362314/1368464/1373612>).

6. Patogenia

Os mecanismos patogénicos da *Brucella* spp. ainda não foram completamente esclarecidos, no entanto, sabe-se que podem infetar células fagocitárias e não fagocitárias, sendo que nas últimas apresenta-se dentro do retículo endoplasmático rugoso. A bactéria dissemina-se principalmente para outros órgãos e tecidos, como o baço, gânglios linfáticos, útero, testículos, glândula mamária e tecido nervoso (Pessegueiro *et al.*, 2003; Pappas *et al.*, 2005; González-Barrientos *et al.*, 2009; Fernandes 2012; Guzmán-Verri *et al.*, 2012). Aquando da infeção, este agente provoca uma linfadenite aguda, esplenomegalia, metrite, problemas neurológicos, incluindo problemas de flutuabilidade e natação errática (González-Barrientos *et al.*, 2009; Guzmán-Verri *et al.*, 2012). O período de incubação pode ser curto ou longo, sendo possível ir de semanas a anos. A infeção pode ser autolimitante, durar meses

ou até mesmo anos, e em casos de cronicidade, pode ser intermitente (Garner *et al.*, 1997; Diacovich & Gorvel, 2010). Para sobreviver à resposta antibacteriana, a bactéria apresenta uma grande variedade de mecanismos de resistência dentro das células mononucleares e polimorfonucleares. O lipopolissacarídeo (LPS) é crucial para a sobrevivência intracelular da bactéria, pois tal como o LPS das enterobactérias, permite uma menor suscetibilidade à atividade dos macrófagos, baixa atividade ferropénica, bem como baixa pirogenicidade, sendo um indutor da leucina e linfócitos T helper 1 (Th1) apesar de ser fraco indutor de uma resposta por interferão e do fator de necrose tumoral (Baucheron *et al.*, 2002; Pessegueiro *et al.*, 2003; Pappas *et al.*, 2005; Dawson *et al.*, 2008; Whatmore, 2009; Diacovich & Gorvel, 2010).

Uma resposta eficaz depende da ativação de macrófagos, e portanto associado a uma resposta imunitária celular do tipo Th1 contra antígenos proteicos (Pessegueiro *et al.*, 2003).

O que determina a virulência de uma infeção por bactéria do género *Brucella* spp. é a produção dos nucleótidos guanina e adenina monofosfato, permitindo a inibição da formação dos fagolisossomas, a desgranulação e consequente ativação do sistema de Zinco-Cobre-superóxido dismutase e a produção de fator de necrose tumoral (Pappas *et al.*, 2005; Diacovich & Gorvel, 2010; Fernandes, 2012)

Na maioria dos casos em que foi isolada a bactéria de animais arrojados, os mesmos estavam em condições precárias de saúde ou já mortos, por isso é difícil determinar quais as características primárias de uma infeção por brucelose (Guzmán-Verri *et al.*, 2012). Muitos destes animais apresentavam cargas parasitárias e lesões em diferentes órgãos, apesar de algumas destas serem relativas a patologias primárias. Outras podem ser devidas a causas secundárias, como trauma durante o arrojamento ou poluentes ambientais (Foster *et al.*, 2002; Dawson *et al.*, 2008; Neimanis *et al.*, 2008; Jauniaux *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2011; Hernández-Mora *et al.*, 2013). Como tal, algumas destas patologias podem comprometer o estado imunitário do animal, causando patologias mais graves, tais como pneumonia, meningite e insuficiência cardíaca ou hepática. Não é raro encontrar outras espécies de bactérias e fungos nos mesmos órgãos nos quais é isolada a bactéria, no entanto estes microrganismos são considerados contaminantes ou oportunistas (Pappas *et al.*, 2005; González-Barrientos *et al.*, 2009; Guzmán-Verri *et al.*, 2012).

7. Manifestações clínicas

7.1. Cetáceos

Os cetáceos são animais que passam toda a sua vida no mar, e como tal, o seu cérebro está especializado para a capacidade natatória, por este motivo a manifestação neurológica de *Brucella ceti* é a mais evidente uma vez que provoca, um quadro clínico de neurobrucelose com natação errática. Macroscopicamente pode ocorrer hiperémia das meninges e cérebro, e microscopicamente pode ser identificada meningoencefalomielite não supurativa com infiltrado mononuclear no líquido cefalorraquidiano (Figura 6) (González *et al.*, 2002; Sohn *et al.*, 2003; Hernández-Mora *et al.*, 2008;

Nymo *et al.*, 2011; González-Barrientos *et al.*, 2009; Guzmán-Verri *et al.*, 2012; Hernández-Mora *et al.*, 2013).

Secundariamente pode ser desenvolvido hidrocéfalo resultante de infiltração de células mononucleares com fibrose das meninges e do tecido periférico ao sistema ventricular (Figura 6). Esta manifestação clínica é acompanhada de opistótonos, tremores, convulsões, desorientação, incapacidade natatória e de flutuabilidade. É por esta razão, que a maioria dos casos de infecções por *Brucella ceti* esteja descrita em animais arrojados na praia, ou em cativeiro, com natação errática acompanhada de aborto, em caso de gestação (González *et al.*, 2002; González-Barrientos *et al.*, 2009; Guzmán-Verri *et al.*, 2012).

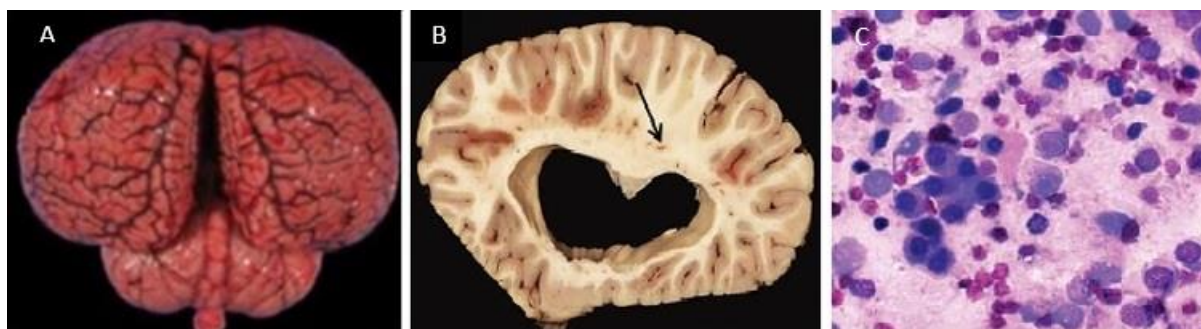


Figura 6 - Achados Histopatológicos em cetáceos com neurobrucelose. (A) Vasos meníngicos hiperêmicos nos hemisférios cerebrais e cerebelo de um golfinho riscado. (B) Seção transversal da região caudo-lateral do hemisfério esquerdo do cérebro de um golfinho riscado com hidrocéfalo com aumento dos ventrículos laterais devido a acumulação de líquido cefalorraquidiano secundário a inflamação envolvente ao sistema ventricular, seta indica um vaso sanguíneo hiperêmico. (C) Coloração de Wright-Giemsa de infiltrado mononuclear em líquido cefalorraquidiano (adaptado de Hernández-Mora *et al.*, 2008; González-Barrientos *et al.*, 2009; Guzmán-Verri *et al.*, 2012).

No sistema respiratório a espécie *Brucella ceti* já foi isolada em pulmões sem ocorrência de sinais clínicos. No entanto já foram reportados casos de golfinhos com neurobrucelose que apresentavam pneumonia intersticial, broncopneumonia, microcalcificação distrófica, hiperemia, agregados leucocitários no tecido conjuntivo periférico aos brônquios e abscessos pulmonares. Foi também estabelecida uma relação entre inflamação pulmonar em animais infetados com nematodes pulmonares portadores de Brucelose, uma vez que uma carga parasitária elevada pode provocar uma inflamação pulmonar com congestão, agravando o quadro resultante da infecção por *B.ceti.*, com ocorrência de trombos pulmonares, pneumonia necrótica grave ou até subaguda a crônica. Nestas situações é comum a ocorrência de granulomas eosinófilos, contendo neutrófilos e macrófagos. Em resultado, uma situação de dispneia num animal arrojado em praia, vai complicar o prognóstico de reabilitação do animal, devido à congestão pulmonar resultante (Foster *et al.*, 2002; González *et al.*, 2002; Ohishi *et al.*, 2003; Pappas *et al.*, 2005; González-Barrientos *et al.*, 2009; Guzmán-Verri *et al.*, 2012; Hernández-Mora *et al.*, 2013).

Brucella ceti pode ainda provocar linfadenomegália e h pato-esplenomegália com focos necróticos (Pappas *et al.*, 2005; González-Barrientos *et al.*, 2009; Jauniaux *et al.*, 2010; Nymo *et al.*, 2011; Guzmán-Verri *et al.*, 2012; Hernández-Mora *et al.*, 2013).

No sistema cardiovascular, a brucelose apresenta como manifesta es clínicas, endocardite e espessamento da válvula mitral apresentando um nódulo vegetativo contendo zonas com fibrina adjacente   superfície. A superfície da válvula mitral pode também demonstrar calcifica o distrófica e col nias bacterianas, degenera o do miocárdio com edema perivascular e fibrose envolvendo o pericárdio (Pappas *et al.*, 2005; Dawson *et al.*, 2008; González-Barrientos *et al.*, 2009; Cay *et al.*, 2009; Whatmore, 2009; Guzmán-Verri *et al.*, 2012; Hernández-Mora *et al.*, 2013). Esta lesão também já foi identificada em humanos infetados por *B.ceti*. (Parsons *et al.*, 2006). Lesões no tegumento e camada subcutânea de gordura também são comuns, designadamente abscessos sobre a barbatana dorsal com possibilidade de necrose da pele na região afetada (Figura 7) (Foster *et al.*, 2002; Dagleish *et al.*, 2008; González-Barrientos *et al.*, 2009; Guzmán-Verri *et al.*, 2012).



Figura 7 - Achados patológicos no tegumento e cora o de cetáceos. (A) Arrojamento de um golfinho riscado vivo com neurobrucelose apresentando lesões no tegumento. (B) Nódulo vegetativo na válvula mitral do cora o assinalado pela seta branca e vasos hiper micos na região dorsal da válvula assinalado pela seta preta. (adaptado de González-Barrientos *et al.*, 2009; Hernández-Mora *et al.*, 2013).

No sistema músculo-esquelético, *B.ceti* já foi isolada em caos de discoespondilite e osteoartrite fribripurulenta na articula o gleno-umeral de um animal que apresentava neurobrucelose, bem como na articula o atlanto-occipital e vertebral, impedindo assim uma correta nata o (Figura 8) (Foster *et al.*, 2002; González-Barrientos *et al.*, 2009; Jauniaux *et al.*, 2010; Nymo *et al.*, 2011; Guzmán-Verri *et al.*, 2012).

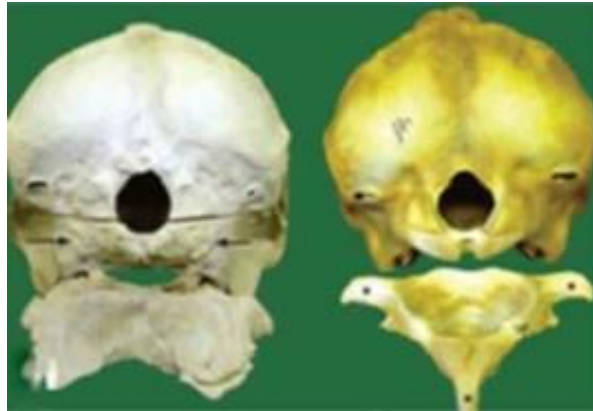


Figura 8 - Ausência de côndilos occipitais e de processos laterais vertebrais da articulação atlanto-occipital de um golfinho (adaptado de Guzmán-Verri *et al.*, 2012).

No sistema urinário, foi isolada Brucelose em rins congestivos de cetáceos (González-Barrientos *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2011; Guzmán-Verri *et al.*, 2012; Goel *et al.*, 2013).

Relativamente ao sistema reprodutivo, os achados, lesões e manifestações clínicas mais frequentes incluem, placentite, granulomas endometriais necrosantes, endometrite e aborto. O fenômeno abortivo ocorre devido passagem da lesão inicial para a parede do útero, até aos cotilédones placentários, destruindo as vilosidades. Em machos, *B.ceti* causa epididimite e orquite granulomatosa com mineralização e abscessos caseo-necróticos (Figura 8) (González *et al.*, 2002; Prenger-Berninghoff *et al.*, 2008; González-Barrientos *et al.*, 2009; Jauniaux *et al.*, 2010; Nymo *et al.*, 2011; Guzmán-Verri *et al.*, 2012).



Figura 9 - Achados patológicos do sistema reprodutivo de um golfinho riscado (*Stenella coeruleoalba*). (A) Golfinho riscado apresentando distúrbios natatórios, a ser assistido por habitantes locais. (B) Feto de um golfinho abortado no interior da placenta. (C) Abscessos placentários pontuados assinalado por setas. (D) Testículo direito aumentado demonstrando um abscesso e lesões multiloculares na área proximal (seta) de um Boto comum (adaptado de Hernández-Mora *et al.*, 2008; Guzmán-Verri *et al.*, 2012).

7.2. Pinípedes

A maioria dos isolados de *Brucella pinnipedialis* foram obtidos de animais em cativeiro saudáveis ou em liberdade aparentemente saudáveis. A maioria corresponde a amostras do sistema respiratório (pulmão e parasitas pulmonares) apresentando ligeira broncopneumonia, adenomegália e hepato- e esplenomegália. Esta bactéria foi também isolada no trato digestivo, rins, testículos e

placenta, estando também associada a aborto (Forbes *et al.*, 2000; Foster *et al.*, 2002; Tryland *et al.*, 2005; Prenger-Berninghoff *et al.*, 2008; Goldstein *et al.*, 2009; Hernández-Mora *et al.*, 2013).

7.3 Humanos

Em humanos, a infeção por *Brucella* spp. está associada a ingestão de lacticínios não pasteurizados contaminados, bem como a ingestão de peixe não cozinhado. É também considerada uma doença profissional para médicos veterinários, técnicos de laboratório, médicos, enfermeiros e trabalhadores de explorações de pecuária. Este grupo de profissionais é infetado através da inalação ou contacto com tecidos fetais ou líquidos contaminados causando, cefaleias, fadiga e sinusite grave. Em humanos, já foram isoladas várias espécies de *Brucella*, incluindo as espécies marinhas, onde os pacientes demonstravam os mesmos sinais clínicos que animais infetados. (González *et al.*, 2002; Pessegueiro *et al.*, 2003; Sohn *et al.*, 2003; Pappas *et al.*, 2005; McDonald *et al.*, 2006; Parsons *et al.*, 2006; Dagleish *et al.*, 2008; Whatmore *et al.*, 2008; Nymo *et al.*, 2011; Fernandes, 2012; Hernández-Mora *et al.*, 2013).

7.4 Outros animais

Brucella spp. isolada de Boto comum, provocou aborto em condições experimentais, em gado bovino. *B.ceti* demonstrou ser menos virulenta em animais terrestres, que *Brucella melitensis* e *Brucella abortus* (Perrett *et al.*, 2004; Hernández-Mora *et al.*, 2013).

Na espécie *Ursus maritimus* (urso polar) a seroprevalência é de 5% a 10% no Ártico, pelo facto de a sua dieta ser maioritariamente constituída por focas, as quais com uma prevalência de 3% a 8% (Tryland *et al.*, 2001; Foster *et al.*, 2002; Rah *et al.*, 2005; O'Hara *et al.*, 2010; Nymo *et al.*, 2011; Hernández-Mora *et al.*, 2013).

Em peixes-gato do Nilo (*Clarias gariepinus*) a inoculação subcutânea de *B. melitensis*, resultou na produção de anticorpos anti-*Brucella* spp., sete dias após a inoculação, mantendo titulações positivas durante um período de cinco semanas. Esta espécie de peixe e possivelmente outras são suscetíveis a infeção por *Brucella* spp.. O mesmo agente inoculado foi posteriormente isolado de diferentes órgãos e inoculado em outros peixes, provocando infeção. Foi também isolada *Brucella* spp. em outros peixes no Delta do rio Nilo, os quais não foram inoculados durante estes procedimentos nem entraram em contacto com os animais inoculados. No entanto, fezes e outros resíduos de gado presente nas margens do rio acabam por se depositar no fundo, criando uma possível fonte de infeção para os peixes que coabitam neste ecossistema (Foster *et al.*, 2002; Dawson *et al.*, 2008; El-Tras *et al.*, 2010; Nymo *et al.*, 2011; Hernández-Mora *et al.*, 2013).

8. Diagnóstico diferencial

O quadro clínico de infeção por *B.ceti* é compatível com infeção por *Toxoplasma* spp., *Morbilivirus* e Herpesvírus, uma vez que ambos apresentam a mesma sintomatologia neurológica, por

isso fazem parte do diagnóstico diferencial para esta patologia, descartado através de exames laboratoriais (González *et al.*, 2002; Sohn *et al.*, 2003; Rah *et al.*, 2005; Prenger-Berninghoff *et al.*, 2008; González-Barrientos *et al.*, 2009; Guzmán-Verri *et al.*, 2012).

9. Patologia Clínica de *Brucella* spp. em animais marinhos

Em casos de Brucelose, reportados em animais marinhos de cativeiro, verificou-se que a velocidade de sedimentação estava aumentada, comparativamente aos resultados registados do mesmo animal em estado saudável. Os níveis de fosfatase alcalina e creatinina encontravam-se aumentados, no entanto, todos os restantes parâmetros hematológicos e bioquímicos apresentavam-se dentro da normalidade (Bossart *et al.*, 2001: 424). Em casos de fêmeas primíparas gestantes, ocorreu aborto, tendo sido isolada *Brucella* spp. na placenta, onde foram observadas lesões como placentite supurativa multifocal e vasculite necrosante. Foram isolados antigénios *Brucella* spp. através da técnica de imuno-histoquímica e PCR (González *et al.*, 2002; Hanni *et al.*, 2003; Dawson *et al.*, 2008; González-Barrientos *et al.*, 2009; Hernández-Mora *et al.*, 2009; Cay *et al.*, 2009; Jauniaux *et al.*, 2010; Guzmán-Verri *et al.*, 2012).

Para diagnóstico de *Brucella* spp. é comum a utilização de amostras sanguíneas, de punção de gânglio linfático (mandibular, pulmonares, mesentéricos e gástricos), de biópsia do baço e fígado, líquido pericárdico, líquido cefalorraquidiano, urina, punção aspirativa de abcessos no tegumento, glândula mamária, leite, placenta, granulomas endometriais e conteúdos abortivos. Estas amostras podem ser posteriormente analisadas por PCR e através de cultura microbiológica (Forbes *et al.*, 2000; Dagleish *et al.*, 2008; Dawson *et al.*, 2008; González-Barrientos *et al.*, 2009; Hernández-Mora *et al.*, 2009; Hernández-Mora *et al.*, 2013).

10. Diagnóstico de Brucelose em animais marinhos.

A Brucelose em espécies marinhas é uma das responsáveis por arrojamentos de animais selvagens e uma fonte de infeção para o Homem, ao mesmo tempo que em aquários e parques zoológicos é um motivo de perdas económicas avultadas devido a morte de animais, aborto e perda de crias. Por este motivo é crucial o diagnóstico rápido da patologia. Para este fim existem duas categorias de testes, diretos e indiretos (Dunn *et al.*, 2001: 313; McDonald *et al.*, 2006; Dagleish *et al.*, 2008; González-Barrientos *et al.*, 2009; Hernández-Mora *et al.*, 2009; Meegan *et al.*, 2010; Guzmán-Verri *et al.*, 2012).

O descarte dos diagnósticos diferenciais é efetuado através da identificação de antigénios virais em células inflamatórias, nervosas e neurónios, isolamento viral e (PCR). Em caso de parasitose por *Toxoplasma* spp., quistos e bradi/taquizoítos estão normalmente presentes em parênquima cerebral e pode ser confirmado através de imuno-histoquímica. No entanto, não é fácil realizar este diagnóstico, pois requer uma investigação exaustiva e conhecimento detalhado das particularidades

anatomofisiológicas destes grupos de animais (González *et al.*, 2002; Ohishi *et al.*, 2004; Prenger-Berninghoff *et al.*, 2008; González-Barrientos *et al.*, 2009; Jauniaux *et al.*, 2010; Guzmán-Verri *et al.*, 2012; Hernández-Mora *et al.*, 2013).

Devem ser colhidas amostras para cultura microbiológica da bactéria, várias titulações de anticorpos e identificação de novos sintomas a todos os animais infetados por *Brucella* spp. (Walsh *et al.*, 2001: 90; Foster *et al.*, 2002; Hanni *et al.*, 2003; Rah *et al.*, 2005; Dagleish *et al.*, 2008; Neimanis *et al.*, 2008; Maquart *et al.*, 2009; Hernández-Mora *et al.*, 2009).

10.1. Provas Diretas

As provas diretas podem ser microbiológicas se detetarem a bactéria e identificarem diretamente de amostras colhidas do animal. Se o isolamento não for possível estão disponíveis provas moleculares, como o PCR para deteção do ADN da bactéria ou imunofluorescência e imunohistoquímica para visualização direta dos antigénios (González *et al.*, 2002; Ohishi *et al.*, 2004; Hernández-Mora *et al.*, 2008; Neimanis *et al.*, 2008; Whatmore *et al.*, 2008; Goldstein *et al.*, 2009; O'Hara *et al.*, 2010; Guzmán-Verri *et al.*, 2012).

A deteção de antigénios de *Brucella* spp. através de imunofluorescência em amostras de órgãos e tecidos de animais com suspeitas, ou sinais clínicos compatíveis com Brucelose, é rápida e eficiente, no entanto, é pouco utilizada. Uma das desvantagens está associada ao processamento do material, que muitas vezes altera a conformação estrutural do antigénio e da histologia dos órgãos e tecidos dificultando o diagnóstico da bactéria (Dunn *et al.*, 2001: 313; McDonald *et al.*, 2006; Dagleish *et al.*, 2008; Jauniaux *et al.*, 2010; Meegan *et al.*, 2010; Guzmán-Verri *et al.*, 2012).

O teste imunoenzimático ELISA (do Inglês, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), inicialmente utilizado, era produzido para ruminantes. Posteriormente foi desenvolvido uma prova de ELISA de competição, especialmente para cetáceos e pinípedes. Ao contrário dos métodos convencionais, estas duas provas foram padronizadas e validadas para estas espécies. Até ao momento, mais de 15 ensaios diferentes foram descritos em todo o mundo, para a identificação de antigénios de *B.ceti* em cetáceos (Nielsen *et al.*, 2001; Tryland *et al.*, 2005; Meegan *et al.*, 2010; Nymo *et al.*, 2011; Guzmán-Verri *et al.*, 2012; Hernández-Mora *et al.*, 2013).

Foram usados três diferentes provas de ELISA de competição para a deteção de antigénios de *Brucella* spp. em cetáceos. As provas de ELISA de competição apresentam uma baixa especificidade mas alta sensibilidade quando comparado com as provas de aglutinação, apresenta menos falsos positivos (Hernández-Mora *et al.*, 2009; Hernández-Mora *et al.*, 2013; González-Barrientos *et al.*, 2009; Guzmán-Verri *et al.*, 2012). A grande vantagem destas provas é serem independentes da espécie de animal de onde provém a amostra, podendo assim ser utilizadas em diferentes mamíferos, já que não necessita de vários anticorpos secundários de espécies diferentes de *Brucella* spp. e, sendo uma prova

de leitura automatizada diminui o risco de erro por falha humana (Dawson *et al.*, 2008; Neimanis *et al.*, 2008; Hernández-Mora *et al.*, 2009; O'Hara *et al.*, 2010; Guzmán-Verri *et al.*, 2012).

10.2. Provas Indiretas

Tal como nos animais terrestres, as provas de Brucelose em animais marinhos baseiam-se na deteção de anticorpos anti-LPS, mais concretamente os direccionados para N-formil perosamina. Contudo a perosamina é muito comum em bactérias Gram-negativas, o que aumenta a probabilidade de falsos positivos (Baucheron *et al.*, 2002; Vizcaíno *et al.*, 2004; Whatmore 2009; Nymo *et al.*, 2011; Guzmán-Verri *et al.*, 2012).

As provas indiretas testam a resposta imunológica do hospedeiro ao agente etiológico. O diagnóstico presuntivo de Brucelose é baseado na deteção de anticorpos no soro sanguíneo. Apesar destas provas serológicas não serem específicas para *B.ceti*, são muito importantes para estudos epidemiológicos e provas de rastreio, tal como se realiza em parques zoológicos e aquários (Hernández-Mora *et al.*, 2009). As provas indiretas usadas em animais marinhos são a prova de aglutinação Rosa Bengala, e de ELISA indireto (Tryland *et al.*, 2005; Dagleish *et al.*, 2008; González-Barrientos *et al.*, 2009; Hernández-Mora *et al.*, 2009; Hernández-Mora *et al.*, 2013).

As vantagens das provas de aglutinação, é o facto de não requerer material especializado, tornando-se bastante menos dispendiosos quando comparado com outras provas, como as de ELISA. Estas provas são as mais usadas por serem mais sensíveis, fáceis de usar e adquirir, e serem independentes da espécie do animal. A Rosa bengala é a prova de aglutinação mais utilizada, apesar de apresentar um maior potencial de falsos positivos, devido a reações cruzadas com antigénios de outras alfa-proteobactérias (Delpino *et al.*, 2004; Hernández-Mora *et al.*, 2009; Whatmore 2009; Nymo *et al.*, 2011; Guzmán-Verri *et al.*, 2012). As desvantagens desta técnica é o facto do plasma ou soro hemolisado aumentarem o risco de falsos negativos e a possível ocorrência de fenómenos de Zona. Uma vez que estas técnicas não necessitam o uso de reagentes específicos, as técnicas usadas no Homem e em outros animais são facilmente adaptadas para a sua utilização com soro de animais marinhos (Pappas *et al.*, 2005; Hernández-Mora *et al.*, 2009; Guzmán-Verri *et al.*, 2012).

Foi criada uma prova de ELISA indireto especificamente para odontocetos e têm sido muito usada no diagnóstico de Brucelose em cetáceos, pois apresenta leitura automatizada e muito efetiva, diminuindo os falsos positivos e falsos negativos. Os seus reagentes são adquiridos com facilidade e podem ser usados em diluições bastante altas, excluindo assim os problemas relacionados com a qualidade da amostra utilizada, o que acontece regularmente em cetáceos. A grande vantagem desta prova é a possibilidade de detetar as imunoglobulinas G ligadas aos LPS da membrana da bactéria, independentemente da espécie (González-Barrientos *et al.*, 2009; Hernández-Mora *et al.*, 2009; Guzmán-Verri *et al.*, 2012).

As restantes vantagens da prova de ELISA indireta são idênticas às restantes provas de ELISA. Como desvantagem inclui-se o facto de se restringir apenas a um tipo de hospedeiro, sendo esta a principal razão pela qual é a prova menos usada, apesar de apresentar mais especificidade e sensibilidade que as outras provas de ELISA (Pappas *et al.*, 2005; González-Barrientos *et al.*, 2009; Guzmán-Verri *et al.*, 2012).

10.3. Procedimentos de Diagnóstico

Os procedimentos de diagnóstico de Brucelose em animais marinhos arrojados passam por uma primeira identificação de problemas de natação, orientação e flutuabilidade. De seguida, deve ser efetuada uma colheita de sangue periférico do animal para proceder à prova de Rosa Bengala. Em caso de positividade, deve ser considerada a eutanásia. No caso de a eutanásia não ser uma opção, deve ser considerada a viabilidade de reabilitação. Se for considerada viável, é efetuada uma cultura com zaragoas ou amostras de tecidos e órgãos afetados em placas de Brucella agar ou agar sangue incubadas em condições de anaerobiose entre 35°C a 37°C, bem como várias titulações de anticorpos ao longo da antibioterapia para determinar se o tratamento está a ser eficaz. Se a amostra inicial de sangue for negativa na prova de Rosa Bengala, deve ser realizada uma prova de ELISA ou imunofluorescência para identificação direta do agente e proceder aos processos de reabilitação comuns (Figura 10) (Walsh *et al.*, 2001: 90; Hernández-Mora *et al.*, 2009; Guzmán-Verri *et al.*, 2012).

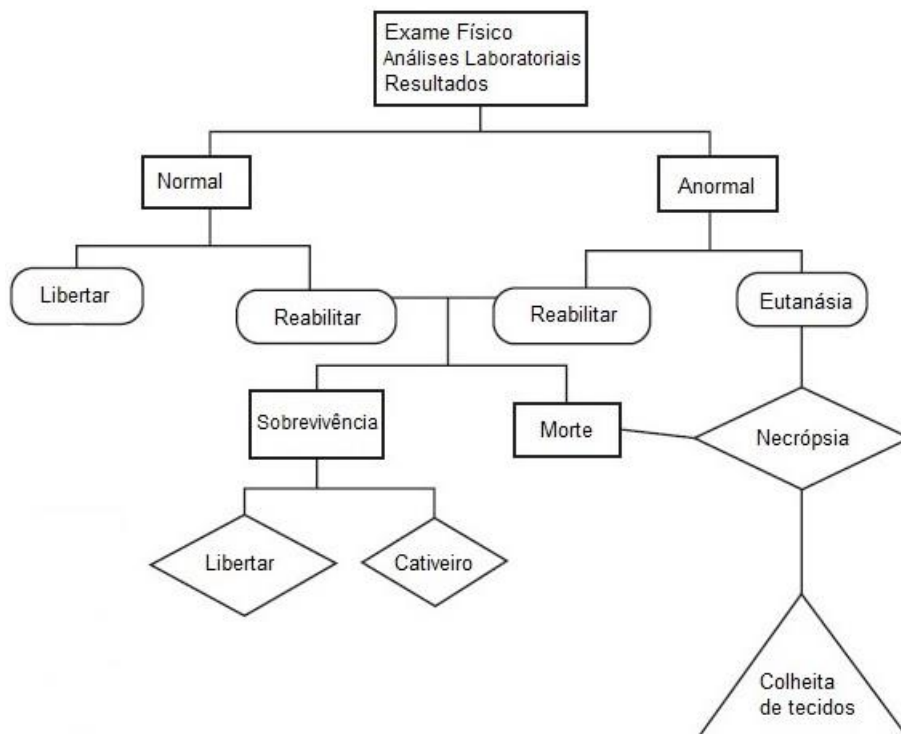


Figura 10 - Fluxograma de processos a seguir, em casos de arrojamento de um animal com suspeita de brucelose, diante de um arrojamento (adaptado de (Walsh *et al.*, 2001).

A presença intracelular desta bactéria durante longos períodos e o risco de fonte de infecção que representa para outros animais e para o Homem, são motivos para ponderar a eutanásia em animais marinhos que arrojam na praia, na presença de manifestações clínicas e/ou serológicas da doença (Walsh *et al.*, 2001: 94; Malakoff, 2001; Perrett *et al.*, 2004; Guzmán-Verri *et al.*, 2012).

Apesar de existirem técnicas que auxiliam o diagnóstico desta patologia, o diagnóstico definitivo é na maioria das situações conseguido através de necropsia, uma vez que estes animais, em arrojamento, já estão muitas vezes em condições irreversíveis (Dawson *et al.*, 2008; Prenger-Berninghoff *et al.*, 2008; Jauniaux *et al.*, 2010; Guzmán-Verri *et al.*, 2012).

11. Terapêutica

A terapia para uma infecção de *Brucella* spp. em animais marinhos é baseada numa conjugação de antibióticos a serem seleccionados pelo veterinário responsável, de acordo com fatores intrínsecos ao animal.

Nenhum tratamento foi reportado até à data como sendo eficaz em animais marinhos, apesar de o tratamento com antibióticos reduzir a sintomatologia e manifestações clínicas da doença (Dunn *et al.*, 2001: 313).

Sendo as bactérias microrganismos intracelulares, são necessários antibióticos com boa penetração celular e tratamento combinado. Os grupos de antibióticos mais utilizados são, as tetraciclina, os aminoglicosídeos, as quinolonas e as cefalosporinas de terceira geração. Estão documentados casos em que existiu a remissão dos sinais clínicos após tratamento com cefalosporinas de terceira geração, e ainda uma resposta positiva ao uso de rifampicina associada a doxiciclina durante um período de seis meses (Dunn *et al.*, 2001: 313; Sohn *et al.*, 2003; McDonald *et al.*, 2006; Cay *et al.*, 2009; Goel *et al.*, 2013).

A associação e uso de cada categoria de antibióticos estão dependentes dos fatores intrínsecos ao animal, tais como, a idade, estado reprodutivo, estado imunológico, patologias concomitantes, outros fármacos prescritos e estado nutricional (Guzmán-Verri *et al.*, 2012; Hernández-Mora *et al.*, 2013).

12. Profilaxia médica

Em animais marinhos a vacinação ainda não é possível uma vez que não existe vacina disponível (Guzmán-Verri *et al.*, 2012).

No futuro poderão ser considerados os polimorfismos SNPs (do Inglês Single Nucleotide Polymorphism) para a produção de estirpes vacinais da bactéria nas suas espécies marinhas visando os diferentes hospedeiros, bem como a produção de antigénios e anticorpos específicos para a utilização em provas de rastreio serológico. Os SNPs são variações na sequência de ADN que envolve somente uma base nucleotídica na sequência do genoma (Groussaud *et al.*, 2007; Whatmore *et al.*, 2007; Whatmore, 2009; Nymo *et al.*, 2011; Fernandes, 2012).

13. Considerações finais

Todos os anos são reportados em Portugal inúmeros casos de arrojamento de animais marinhos, nas praias ao longo da extensa costa marítima nacional. Este fenómeno pode ser multifatorial, estando também presente como grande causador deste acontecimento o facto de o animal estar infetado por *Brucella* spp., sendo as espécies mais comuns *B.ceti* e *B.pinnipedialis*. Estas espécies afetam maioritariamente cetáceos e pinípedes, mas estudos relativos ao conjunto de animais que podem ser potencialmente seropositivos à *Brucella* spp. revelaram que animais como os da subordem Odontoceti, a subordem Mysticeti, a superfamília Pinnipedia, o urso polar, peixes, gado bovino, caprino, ovino e o Homem estão suscetíveis a desenvolverem a doença. A vertente zoonótica desta infeção é importante na atualidade dada a possibilidade do contacto direto com estes animais.

Devido aos animais marinhos apresentarem uma grande dispersão mundial com muitas populações da mesma espécie a viver em localizações diferentes e a efetuar migrações ao longo de todo o globo, a patologia é disseminada com maior facilidade por diferentes zonas. Outro facto que facilita a transmissão deste agente, e por consequência a patologia, é a natureza social muito marcada, facilitando a transmissão e infeção de novos indivíduos no mesmo grupo por contacto com animais previamente infetados. A Brucelose é frequentemente concomitante a infeções por agentes parasitários (e.g. *Halocercus* spp.), virais (e.g. *Morbilivirus*), e apresenta um quadro de sinais clínicos muito abrangente, tendo como maior ocorrência casos de neurobrucelose com manifestação de problemas natatórios, quadro respiratório com problemas de flutuabilidade, e quadro reprodutivo, com abortos frequentes. O facto de apresentar um conjunto de sinais clínicos vasto e pouco específico, torna essencial o diagnóstico diferencial relativamente a várias doenças parasitárias e virais.

As diferentes provas de diagnóstico disponíveis não apresentam a especificidade desejada para animais marinhos, no entanto a prova de ELISA indireto é a de eleição sendo a prova de Rosa Bengala a mais utilizada por facilidade de utilização e rapidez de resultados. É necessário continuar a trabalhar na formulação de novas provas, mais fiáveis, mais fáceis de usar que apresentem um número muito reduzido de falsos negativos/positivos, sendo ao mesmo tempo muito específica e sensível.

A terapêutica para este agente passa por antibioterapia associada, contudo tal como nos métodos de diagnóstico é uma área que ainda carece de alguma investigação devido aos poucos resultados registados e não existir um tratamento de eleição reportado.

No futuro, será importante o desenvolvimento de estirpes vacinais do agente através de modificação genética.

É importante salientar a necessidade urgente de criar um plano de controlo e monitorização da incidência desta patologia em animais marinhos arrojados e em cativeiro em Portugal, à semelhança do que se desenvolveu na Costa Rica, para que se consiga impedir o contacto de indivíduos infetados com o Homem, de modo a que o potencial zoonótico desta patologia não se concretize e se evite assim a transmissão da patologia tanto do animal para o Homem como do Homem para o animal, evitando assim perdas económicas derivadas do tratamento e resolução da mesma.

14. Referências Bibliográficas

- Baucheron S., Grayon M., Zygmunt M.S., Cloeckert A. (2002) Lipopolysaccharide heterogeneity in *Brucella* strains isolated from marine mammals, *Research in Microbiology*. 153(5): 277–280
- Bossart G.D., Reidarson T.H., Dierauf L.A., and Duffield D.A. (2001) Clinical Pathology. In: Dierauf L.A. & Gulland F. M. D (Eds.) *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine*, 2nd Ed. New York: CRC Press LLC, pp.383–486
- Cay S., Cagirci G., Maden O., Balbay Y., Aydogdu S. (2009) *Brucella* endocarditis - A registry study, *Kardiologia Polska*. 67(3): 274–280
- Cloeckert A., Verger J.-M., Grayon M., *et al.* (2001) Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the *omp2* locus, *Microbes and Infection*. 3(9): 729–738
- Dagleish M. P., Barley J., Finlayson J., Reid R. J. and Foster G. (2008) *Brucella ceti* Associated Pathology in the Testicle of a Harbour Porpoise (*Phocoena phocoena*), *Journal of Comparative Pathology*. 139(1): 54–59
- Dawson C.E., Stubberfield E.J., Perrett L.L., *et al.* (2008) Isolation and characterization of *Brucella* from the lungworms of a harbor porpoise (*Phocoena phocoena*), *Journal of wildlife diseases*. 44(2): 237–246
- Dawson C.E., Perrett L.L., Stubberfield E. J., *et al.* (2008) Phenotypic and molecular characterisation of *Brucella* isolates from marine mammals, *BMC microbiology*. 8: p.224
- Delpino M.V., Fossati C. A. and Baldi P. C., (2004) Occurrence and Potential Diagnostic Applications of Serological Cross-Reactivities between *Brucella* and Other Alpha-Proteobacteria Occurrence and Potential Diagnostic Applications of Serological Cross-Reactivities between *Brucella* and Other Alpha-Proteoba, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 11(5): 868–873
- Diacovich L. and Gorvel, J.-P. (2010) Bacterial manipulation of innate immunity to promote infection. *Nature reviews. Microbiology*, 8(2): 117–128
- Dunn J.L., Buck J.D. and Robeck T.R. (2001). Bacterial Diseases of Cetaceans and Pinnipeds. In: Dierauf L. A. and Gulland F. M. D. (Eds.) *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine*, 2nd Ed. New York: CRC Press LLC, pp. 312–314
- EFSA (2015) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013, *EFSA Journal*. 13(1): 3991

- El-Tras W.F., Tayel A.A., Eltholth M.M. and Guitian J. (2010) Brucella infection in fresh water fish: Evidence for natural infection of Nile catfish, *Clarias gariepinus*, with *Brucella melitensis*, *Veterinary Microbiology*. 141(3-4): 321–325
- Ewalt D.R., Payeur J.B., Martin B.M., Cummins, D.R. and Miller W.G. (1994) Characteristics of a *Brucella* species from a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*), *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.* 6(4): 448–452
- Fernandes M. (2012) *Brucelose dos pequenos Ruminantes: Estudo de focos na área administrativa da divisão de intervenção Veterinária de Vila Real*, Tese de Mestrado. Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa
- Forbes L.B., Nielsen O., Measures L. and Ewalt D.R. (2000) Brucellosis in ringed seals and harp seals from Canada, *Journal of wildlife diseases*. 36(3): 595–598.
- Foster G., MacMillan A.P., Godfroid J., *et al.* (2002) A review of *Brucella* sp. infection of sea mammals with particular emphasis on isolates from Scotland, *Veterinary Microbiology*. 90(1-4): 563–580.
- Foster G., Osterman B.S., Godfroid J., Jacques I. and Cloeckaert A. (2007) *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57(11): 2688–2693.
- Garner M.M., Lambourn D.M., Jeffries S.J., *et al.* (1997) Evidence of *Brucella* infection in Parafilaroides lungworms in a Pacific harbor seal (*Phoca vitulina richardsi*), *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.* 9(3): 298–303.
- Goel V. Hogade S. and Karadesai S. (2013) A case of pediatric systemic brucellosis presenting with urinary symptoms, *Saudi Journal for Health Sciences*. 2(2): 130.
- Goldstein T., Zabka T.S., DeLong R.L., *et al.* (2009) The role of domoic acid in abortion and premature parturition of California sea lions (*Zalophus californianus*) on San Miguel Island, California, *Journal of wildlife diseases*. 45(1): 91–108.
- González L., Patterson I. A., Reid R. J., *et al.* (2002) Chronic meningoencephalitis associated with *Brucella* sp. infection in live-stranded striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*), *Journal of Comparative Pathology*. 126(2-3): 147–152.

- González-Barrientos R., Morales J.-A., Hernández-Mora G., *et al.* (2009) Pathology of Striped Dolphins (*Stenella coeruleoalba*) Infected with *Brucella ceti*, *Journal of Comparative Pathology*. 142(4): 347–352.
- Groussaud P., Shankster S.J., Koylass M.S. and Whatmore A.M. (2007) Molecular typing divides marine mammal strains of *Brucella* into at least three groups with distinct host preferences, *Journal of Medical Microbiology*. 56(11): 1512–1518.
- Guzmán-Verri C., González-Barrientos R., Hernández-Mora G., *et al.* (2012) *Brucella ceti* and Brucellosis in Cetaceans, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2(2): 1–22.
- Hanni K.D., Mazet J.A.K., Gulland F.M.D., *et al.* (2003) Clinical pathology and assessment of pathogen exposure in southern and Alaskan sea otters, *Journal of wildlife diseases*. 39(4): 837–850.
- Hernández-Mora G., González-Barrientos R., Morales J.-A. *et al.* (2008) Neurobrucellosis in stranded dolphins, Costa Rica, *Emerging Infectious Diseases*. 14(9): 1430–1433.
- Hernández-Mora G., Manire C.A., González-Barrientos R., *et al.* (2009) Serological diagnosis of *Brucella* infections in odontocetes, *Clinical and Vaccine Immunology*. 16(6): 906–915.
- Hernández-Mora G., Palacios-Alfaro J. and González-Barrientos R. (2013) Wildlife reservoirs of brucellosis: *Brucella* in aquatic environments and brucellosis serology, *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 32(1): 89–103.
- Jauniaux T.P., Brenez C., Fretin D., *et al.* (2010) *Brucella ceti* infection in harbor porpoise (*Phocoena phocoena*), *Emerging Infectious Diseases*. 16(12): 1966–1968.
- Jefferson T.A., Webber, M.A. and Pitman R.L. (2007) *Marine mammals of the world*. Academic Press
- Malakoff D. (2001) Scientists use strandings to bring species to life, *Science*. 293(5536): 1754–1757.
- Maquart M., Flèche P.L., Foster G., *et al.* (2009) MLVA-16 typing of 295 marine mammal *Brucella* isolates from different animal and geographic origins identifies 7 major groups within *Brucella ceti* and *Brucella pinnipedialis*, *BMC microbiology*. 9: 145.
- McDonald W.L., Jamaludin R., Mackereth G., *et al.* (2006) Characterization of a *Brucella* sp. strain as a marine-mammal type despite isolation from a patient with spinal osteomyelitis in New Zealand, *Journal of Clinical Microbiology*. 44(12): 4363–4370.

- Meegan J., Field C., Sidor I., *et al.* (2010) Development, validation, and utilization of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against *Brucella* species in marine mammals, *Journal of veterinary diagnostic investigation*. 22(6): 856–862.
- Neimanis A.S., Koopman H.N., Westgate A.J., Nielsen K. and Leighton F.A. (2008) Evidence of exposure to *Brucella* sp. in harbor porpoises (*Phocoena phocoena*) from the Bay of Fundy, Canada, *Journal of wildlife diseases*. 44(2): 480–485.
- Nielsen O., Stewart R.E.A., Nielsen K., Measures L. and Duignan P. (2001) Serologic survey of *Brucella* spp. antibodies in some marine mammals of North America, *Journal of wildlife diseases*. 37(1): 89–100.
- Nikaido M., Matsuno F., Hamilton H., *et al.* (2001) Retroposon analysis of major cetacean lineages: the monophyly of toothed whales and the paraphyly of river dolphins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98(13): 7384–7389.
- Nymo I.H., Tryland M. and Godfroid J. (2011) A review of *Brucella* infection in marine mammals, with special emphasis on *Brucella pinnipedialis* in the hooded seal (*Cystophora cristata*), *Veterinary Research*. 42(1): 93.
- O'Hara T.M., Holcomb D., Elzer P., *et al.* (2010) *Brucella* species survey in polar bears (*Ursus maritimus*) of northern Alaska, *Journal of wildlife diseases*. 46(3): 687–694.
- Ohishi K., Takishita K., Kawato M., *et al.* (2004) Molecular evidence of new variant *Brucella* in North Pacific common minke whales, *Microbes and Infection*. 6(13): 1199–1204.
- Ohishi K., Zenitani R., Bando T., *et al.* (2003) Pathological and serological evidence of *Brucella*-infection in baleen whales (Mysticeti) in the western North Pacific, *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 26(2): 125–136.
- Oliveira J.B., Morales J.A., González-Barrientos R.C., Hernández-Gamboa J. and Hernández-Mora G. (2011) Parasites of cetaceans stranded on the Pacific coast of Costa Rica, *Veterinary Parasitology*. 182(2-4): 319–328.
- Pappas G., Akritidis N., Bosilkovski M. and Tsianos E. (2005) Brucellosis, *The new England journal of medicine*. 352: 2325–2336.
- Parsons, E.C.M., Perry C. and Simmonds M.P. (2006) It's not just poor science - Japan's "scientific" whaling may be a human health risk too, *Marine Pollution Bulletin*. 52(9): 1118–1120.

- Perrett L.L., Brew S.D., Stack J.A., MacMillan A.P. and Bashiruddin J.B. (2004) Experimental assessment of the pathogenicity of *Brucella* strains from marine mammals for pregnant sheep, *Small Ruminant Research*. 51(3): 221–228.
- Pessegueiro P., Barata C. and Correia J. (2003) Brucelose – uma revisão sistematizada, *Medicina Interna*. 10(2): 91–100.
- Prenger-Berninghoff E., Siebert U., Stede M., et al. (2008) Incidence of *Brucella* species in marine mammals of the German North Sea, *Diseases of Aquatic Organisms*. 81(1): 65–71.
- Rah H., Chomel B. B., Follmann E. H., et al. (2005) Serosurvey of selected zoonotic agents in polar bears (*Ursus maritimus*), *The Veterinary record*. 156(1): 7–13.
- Serafino J., Conde S., Zabal O. and Samartino L. (2007) Multiplicación de *Brucella abortus* y producción de óxido nítrico en dos líneas celulares de macrófagos de distinto origen, *Revista Argentina de Microbiología*. 39(4): 193–198.
- Sohn A.H., Probert W.S., Glaser C.A., et al. (2003) Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal *Brucella* spp., *Emerging Infectious Diseases*. 9(4): 485–488.
- Tryland M., Derocher A.E., Wiig Ø. and Godfroid J. (2001) *Brucella* sp. antibodies in polar bears from Svalbard and the Barents Sea, *Journal of wildlife diseases*. 37(3): 523–531.
- Tryland M., Sørensen K.K. and Godfroid, J. (2005) Prevalence of *Brucella pinnipediae* in healthy hooded seals (*Cystophora cristata*) from the North Atlantic Ocean and ringed seals (*Phoca hispida*) from Svalbard, *Veterinary Microbiology*. 105(2): 103–111.
- Vizcaíno N., Caro-Hernández P., Cloeckert A. and Fernández-Lago L. (2004) DNA polymorphism in the omp25/omp31 family of *Brucella* spp.: Identification of a 1.7-kb inversion in *Brucella cetaceae* and of a 15.1-kb genomic island, absent from *Brucella ovis*, related to the synthesis of smooth lipopolysaccharide, *Microbes and Infection*. 6(9): 821–834.
- Walsh M.T., Ewing R.Y., Odell D.K. and Bossart G.D. (2001). Mass Strandings of Cetaceans. In Dierauf L. A. and Gulland F. M. D. (Eds.) *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine*, 2nd Ed. New York: CRC Press LLC, pp. 83–96.
- Whatmore A.M. (2009) Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens, *Infection, Genetics and Evolution*. 9(6): 1168–1184.

Whatmore A. M., Dawson C.E., Groussaud P., *et al.* (2008) Marine mammal *Brucella* genotype associated with zoonotic infection, *Emerging Infectious Diseases*. 14(3): 517–518.

Whatmore A.M., Perrett L.L. and MacMillan A.P. (2007) Characterisation of the genetic diversity of *Brucella* by multilocus sequencing, *BMC microbiology*. 7: 34.