

JOSÉ MARIA SOARES CRUZ TELES FEIO

**BRUCELOSE EM PEQUENOS RUMINANTES:
ESTUDO RETROSPETIVO NA ÁREA DE
INTERVENÇÃO DA OPP DE SANTARÉM**

Orientadora: Professora Doutora Ângela Filipa Bártolo Dâmaso

Co-orientador: Doutor Francisco Marçal Grilo

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2022

JOSÉ MARIA SOARES CRUZ TELES FEIO

**BRUCELOSE EM PEQUENOS RUMINANTES:
ESTUDO RETROSPETIVO NA ÁREA DE
INTERVENÇÃO DA OPP DE SANTARÉM**

Dissertação defendida em provas públicas para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, perante o júri, com o Despacho de Nomeação N° 01/2022, de 3 de Janeiro de 2022, com a seguinte composição:

Presidente: Prof^o. Doutora Sofia Van Harten por delegação da Prof^a. Doutora Laurentina Pedroso

Arguente: Prof. Doutor Rui d'Orey

Orientadora: Prof^a. Doutora Ângela Dâmaso

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2022

Agradecimentos

Gostaria de começar por agradecer à empresa 4v-Serviços Veterinários e a todos os seus trabalhadores e colaboradores que me acolheram e ajudaram não só durante o período de estágio, mas durante todo o tempo em que mantivemos uma parceria.

À ACORO, especialmente à Dr^a Maria João Salgueiro pela ajuda e pela disponibilidade no acesso aos dados para esta dissertação.

À Professora Doutora Ângela Dâmaso por toda a ajuda na elaboração desta dissertação, por toda a sua disponibilidade e vontade em ajudar mesmo nesta fase de vida em que a prioridade era o filho.

Um especial agradecimento ao Dr. Francisco Marçal Grilo, meu co-orientador por toda a paciência, ajuda, dedicação e conhecimento que me transmitiu durante todo o período em que o acompanhei, sempre disponível para me ajudar e seguramente que levo daqui uma amizade para a vida.

A toda a minha família com especial agradecimento aos meus pais, Pedro e Catarina, que fizeram tudo para que este objetivo fosse alcançado e por todo o amor que me transmitiram. Sem eles isto não seria possível, obrigado.

Também à minha melhor amiga e também avó, Maria Helena, pois sabe o que significa para mim e o esforço que fez para que eu conseguisse realizar este sonho.

Por último gostaria de agradecer à minha namorada Vera pela paciência, ajuda e amor que me transmitiu durante todo este tempo, parte desta dissertação foi feita com a sua ajuda e dedicação.

Resumo

A infecção causada por *Brucella spp.* é uma doença que afecta diversas espécies animais, incluído o Homem. Por se tratar de uma das zoonoses mais importantes em Portugal desde 1992 que existe programa de erradicação da brucelose dos pequenos ruminantes (PEBPR) de forma a tentar eliminar a doença.

A infecção por Brucelose é causada na maioria das vezes por contacto directo com animais infectados, mas também através dos seus produtos e subprodutos a sua transmissão é possível.

Através deste estudo foi possível calcular a prevalência individual e em rebanhos de brucelose, em ovinos e caprinos na região de Santarém para cada ano em estudo.

A realização deste trabalho permitiu verificar que a área em estudo não é uma área problemática sendo que a prevalência de brucelose foi praticamente nula, com exceção do ano de 2018, contudo o valor dessa prevalência foi muito pequeno sendo sempre inferior a 1% nesse ano e de 0% nos anos de 2017, 2019, 2020 e até julho de 2021.

Através deste estudo e destes resultados leva-nos a crer que as medidas estipuladas pelo governo para a erradicação da doença estão a ser cumpridas.

Palavras-chave: *Brucella spp.*, Brucelose, Santarém, Ovinos, Caprinos

Abstract

The infection caused by *Brucella spp.* is a disease that affects several animal species, including humans. Because it is one of the most important zoonosis in Portugal since 1992 there is a program for the eradication of brucellosis of small ruminants (PEBPR) in order to try to eliminate the disease.

Brucellosis infection is most often caused by direct contact with infected animals, but also through their products and by-products its transmission is possible.

Through this study it was possible to calculate the individual and herd prevalence of brucellosis in sheep and goats in the region of Santarém for each year under study.

This work allowed us to verify that the area under study is not a problem area and the prevalence of brucellosis was practically null, with the exception of the year 2018, however the value of this prevalence was very small being always less than 1% in that year and 0% in the years 2017, 2019, 2020 and until July 2021.

Through this study and these results it leads us to believe that the measures stipulated by the government for the eradication of the disease are being fulfilled.

Keywords: *Brucella spp.*, Brucellosis, Santarém, Sheep, Goats

Lista de Siglas e Abreviaturas

AAT Antigénio Acidificado Tamponado

AC Antes de Cristo

ACORO Associação de Criadores de Caprinos e Ovinos do Ribatejo Oeste

APC Células Apresentadoras e Antigénio

B. abortus *Brucella abortus*

B. canis *Brucella canis*

B. melitensis *Brucella melitensis*

B. neotomae *Brucella neotomae*

B. ovis *Brucella ovis*

B. suis *Brucella suis*

DC Depois de Cristo

DDO Doença de Declaração Obrigatória

DGAV Direção Geral de Alimentação e Veterinária

DSAVRA Direção de Serviços de Alimentação e Veterinária da Região do Alentejo

DSAVRALG Direção de Serviços de Alimentação e Veterinária da Região do Algarve

DSAVRC Direção de Serviços de Alimentação e Veterinária da Região Centro

DSAVRLVT Direção de Serviços de Alimentação e Veterinária da Região de Lisboa e Vale do Tejo

DSAVRN Direção de Serviços de Alimentação e Veterinária da Região Norte

Elisa Do inglês “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”

IE Inquérito epidemiológico

Ig Imunoglobulina

IgE Imunoglobulina E

IgG Imunoglobulina G

LMV Laboratório de Medicina Veterinária

LPS Lipopolissacárido

MPS Sistema Fagocitário Mononuclear

MV Médico Veterinário

OIE Organização Internacional Para a Saúde Animal “World Organization For Animal Health”

OMS Organização Mundial de Saúde

OPP Organização de Produtores Pecuários

PAMPs Padrões Moleculares Associados aos Patógenos

PEBPR Plano de Erradicação de Brucelose dos Pequenos Ruminantes

PRs Pequenos Ruminantes

PRRs Recetores de Reconhecimento Padrão

REV 1 Vacina de *Brucella melitensis* Para Pequenos Ruminantes

SV Serviços Veterinários

TFC Teste de Fixação do Complemento

TRB Teste Rosa Bengala

% Percentagem

Índice

Índice de Tabelas.....	9
Índice de Gráficos	10
Índice de Figuras.....	11
Parte I – Relatório de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária	12
Descrição da Casuística de Estágio.....	12
Parte II Revisão bibliográfica	18
1.1. Brucelose – Nota histórica.....	18
1.2. Género <i>Brucella</i>	19
1.3. Hospedeiros	22
1.4. Brucelose em pequenos ruminantes.....	24
1.4.1. Transmissão	24
1.4.2. Fatores de Risco	26
Idade.....	26
Espécie e raça	26
1.4.3. Patogenia	28
2.4.4. Resposta imune.....	31
2.4.4.1. Imunidade celular	31
2.4.4.2. Imunidade humoral	32
2.4.5. Sintomatologia.....	32
2.4.6. Quadro Lesional.....	34
2.4.7. Diagnóstico.....	35
2.4.7.1. Cultura bacteriana.....	35
2.4.7.2 Esfregaços corados.....	36
2.4.7.3. Diagnóstico sorológico	36
2.4.7.3.1 Teste de fixação do complemento (TFC).....	36
2.4.7.3.2 Teste Rosa Bengala (TRB)	37
2.4.7.3.3. Teste alérgico cutâneo.....	38
2.4.7.3.4. Teste imunodifusão em gel	38
2.4.8. Profilaxia.....	38
2.4.8.1 Vacinação.....	39
2.4.8.2 Maneio.....	40
3 - Brucelose em Portugal.....	41
Parte III – Estudo da Brucelose dos Pequenos Ruminantes na área administrativa de Santarém	44
1. Material e Métodos	44

1.1. Critérios de inclusão	44
1.2. Caracterização da área de intervenção da OPP de Santarém e das explorações em estudo.....	44
1.3. Protocolos de colheita e testagem de amostras:.....	45
1.4. Cálculo da prevalência individual de Brucelose.....	47
1.5. Cálculo da prevalência em rebanho de Brucelose	48
2. Resultados.....	48
3. Discussão e Conclusão	54
Bibliografia	59
Anexos	66
Anexo 1 -.....	66

Índice de Tabelas

Tabela 1: Intervenções realizadas em bovinos no âmbito da sanidade	13
Tabela 2: Intervenções realizadas em ovinos no âmbito da sanidade	14
Tabela 3: Intervenções realizadas em caprinos no âmbito da sanidade	15
Tabela 4: Estrutura Hierárquica da Classificação Científica usada em Biologia	19
Tabela 5: Características epidemiológicas das espécies Brucella	23
Tabela 6: Número de animais testados e número de animais positivos no ano de 2017, 2018, 2019, 2020 e até julho de 2021	53
Tabela 7: Prevalência individual e de exploração de Brucelose dos Pequenos Ruminantes na OPP de Santarém entre janeiro de 2017 e julho de 2021	53
Tabela 8: Rótulo da amostra individual de sangue	71
Tabela 9: Rótulo do conjunto de amostras de sangue	71

Índice de Gráficos

Gráfico 1: Intervenções realizadas em bovinos	13
Gráfico 2: Intervenções realizadas em ovinos	14
Gráfico 3: Intervenções realizadas em caprinos.....	16
Gráfico 4: Intervenções realizadas em suínos.....	17
Gráfico 5: Intervenções realizadas em equinos.....	18
Gráfico 6: Intervenções realizadas em burros.....	18

Índice de Figuras

Figura 1: Esquema de obtenção, manutenção e subida de estatutos sanitários dos efetivos	67
Figura 2: Fluxograma para subida de estatuto não indemne (B2) para estatuto indemne ou oficialmente indemne.....	67
Figura 3: Fluxograma para erradicação de Brucelose em efetivos B2.1	69
Figura 4: Esquema de controlo em efetivos classificados como B3 ou B4.....	70

Parte I – Relatório de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Descrição da Casuística de Estágio

O estágio curricular foi realizado no decurso do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária (MIMV) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, sob a orientação do Dr. Francisco Marçal Grilo e com coorientação científica da Professora Doutora Ângela Dâmaso.

Foi realizado na empresa 4V- Serviços Veterinários, sediado em Santarém, que presta serviços particulares e serviços no âmbito da sanidade animal obrigatória por lei, nomeadamente na Organização de Produtores Pecuários (OPP) do Ribatejo e teve a duração de 5 meses (21 de setembro de 2020 a 21 de fevereiro de 2021).

Durante o período de estágio o autor acompanhou o veterinário responsável nas intervenções médico-veterinárias realizadas, intervenções como MV particular e prestação de serviços para a Associação De Criadores De Caprinos, Ovinos e Bovinos do Ribatejo Oeste (ACORO) em todas as intervenções realizadas em clínica de espécies pecuária que englobou ovinos, caprinos, bovinos, equídeos e suínos.

Nas intervenções realizadas em caprinos, ovinos e equídeos, estas foram realizadas por todo o distrito de Santarém, enquanto as de bovinos para além do distrito de Santarém também foram realizadas no distrito de Évora e do Setúbal. Por outro lado, as intervenções realizadas em suínos foram todas no concelho de Rio Maior.

BOVINOS

Tabela 1: Intervenções realizadas em bovinos no âmbito da sanidade

Intervenções de Sanidade Animal/OPP	
Total: 4100 Animais	Colocação de Brinco e de Identificação Eletrónica
	Colocação de Brinco de Substituição
	Vacinação
	Vacinação com vacina Enterovina e com Biovina S
	Desparasitação com Paramectin a 0,5%
	Realização do Teste de Tuberculina (aviária e mamífera)
	Leitura do Teste de Tuberculina
	Colheita de sangue para pesquisa de Brucelose

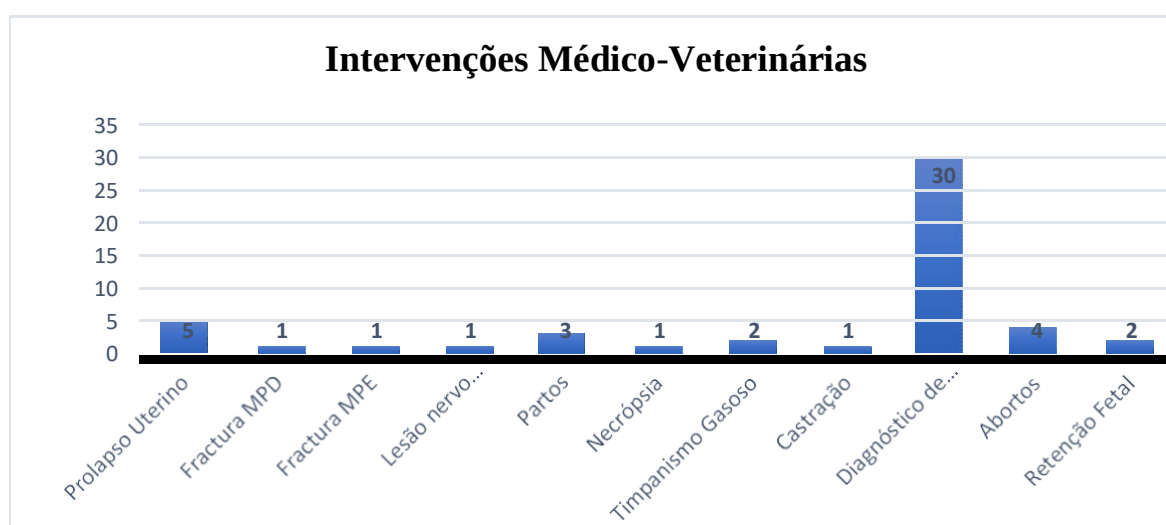


Gráfico 1: Intervenções realizadas em bovinos

OVINOS

Tabela 2: Intervenções realizadas em ovinos no âmbito da sanidade

Intervenção de Sanidades/OPP	
Total: 1980 Animais	Colocação de Brinco e de Identificação Eletrónica
	Colocação de Brinco de Substituição
	Vacinação
	Vacinação com vacina Enterovina e com Biovina S
	Desparasitação com Sinvermin 28,5%
	Colheita de sangue para pesquisa de Brucelose

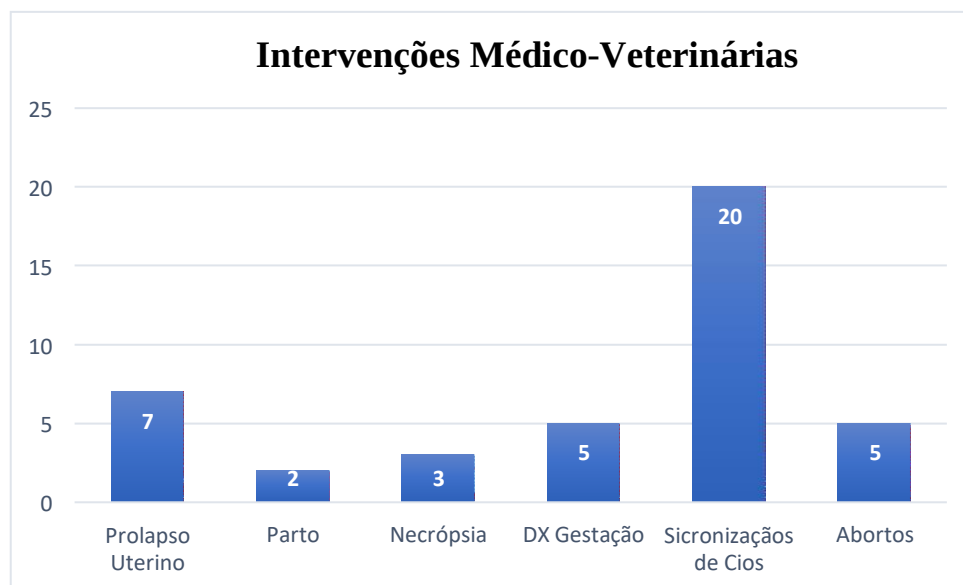


Gráfico 2: Intervenções realizadas em ovinos

CAPRINOS

Tabela 3: Intervenções realizadas em caprinos no âmbito da sanidade

Intervenção de Sanidades/OPP	
Total: 1450 Animais	Colocação de Brinco e de Identificação Eletrónica
	Colocação de Brinco de Substituição
	Vacinação
	Vacinação com vacina Enterovina e com Biovina S
	Desparasitação com Sinvermin 28,5%
	Colheita de sangue para pesquisa de Brucelose

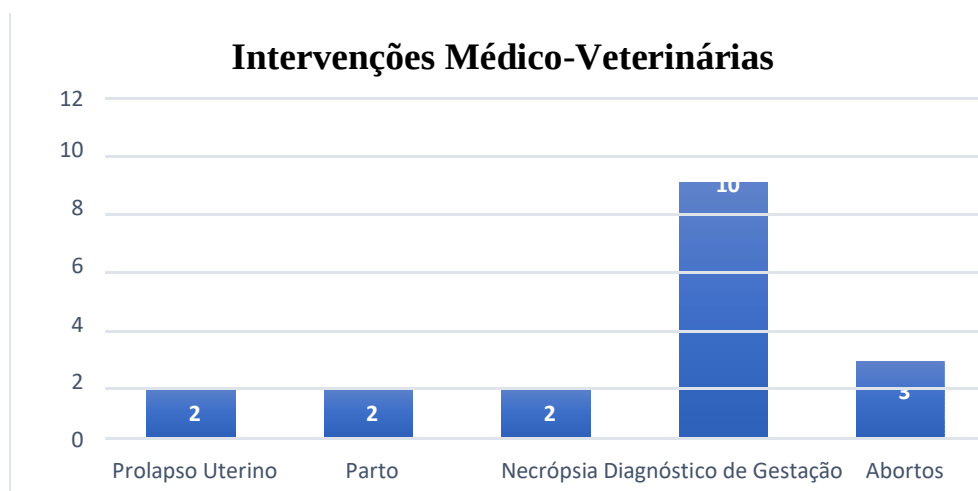


Gráfico 3: Intervenções realizadas em caprinos

SUÍNOS

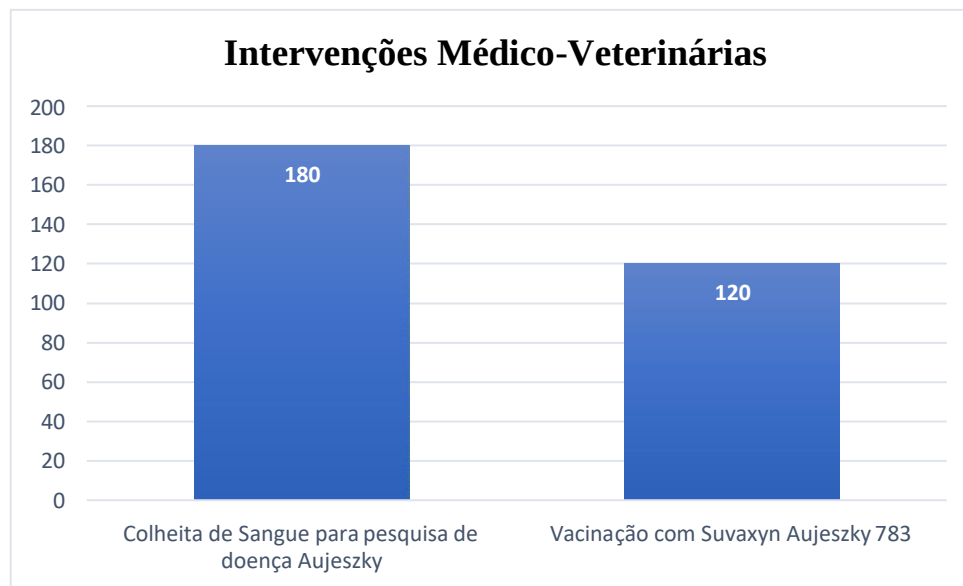


Gráfico 4: Intervenções realizadas em suínos

EQUÍDEOS

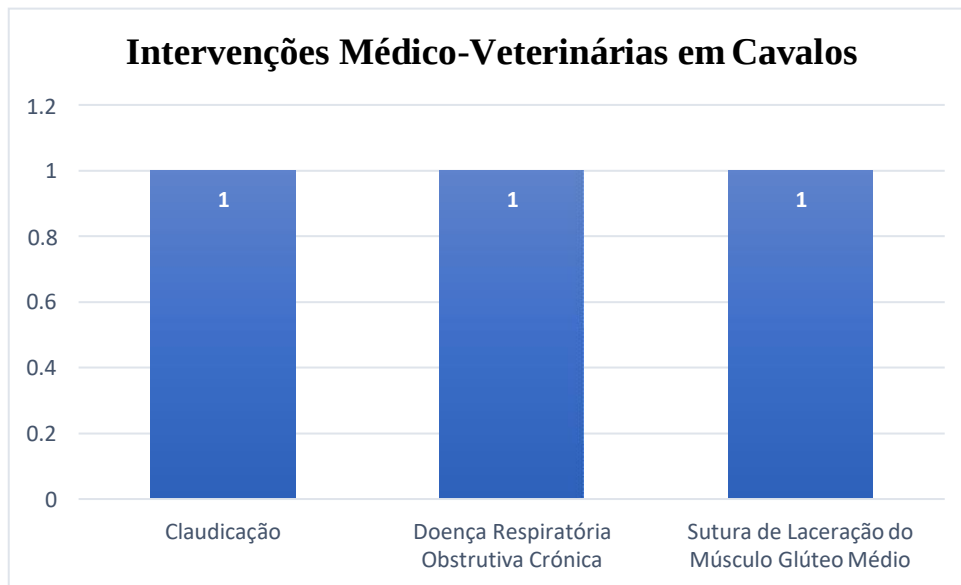


Gráfico 5: Intervenções realizadas em equinos

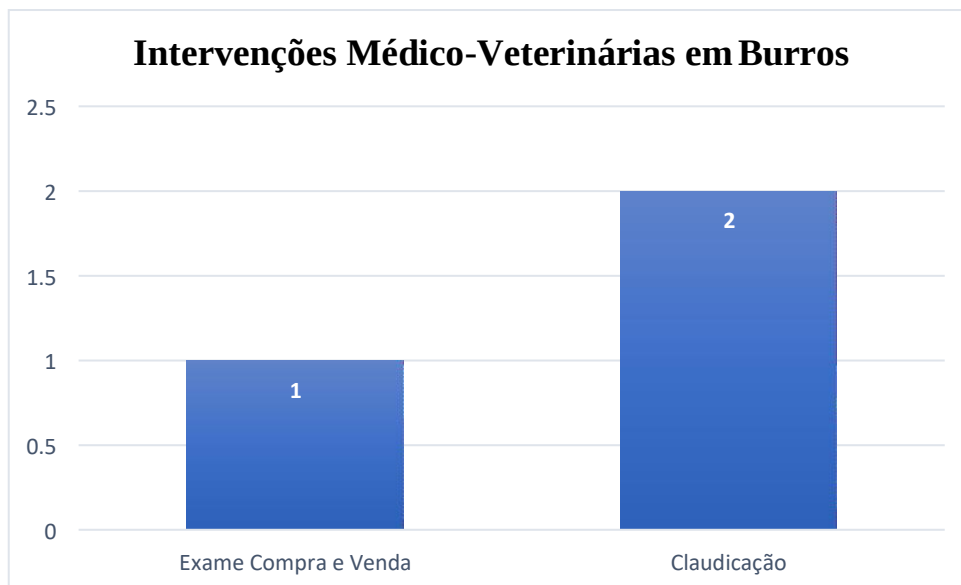


Gráfico 6: Intervenções realizadas em burros

Parte II Revisão bibliográfica

1.1. Brucelose – Nota histórica

Desde sempre que o Homem depende dos animais, não só para desenvolvimento socioeconómico, para companhia, mas sobretudo para alimentação. Não obstante deste facto estes mesmo animais podem transmitir para os humanos uma variedade grande de doenças, que se designam de zoonoses, doenças estas que podem ser potencialmente devastadoras (Pessegueiro *et al.*, 2003).

O termo brucelose refere-se à infeção animal e/ou humana causada pelas diferentes espécies do género *Brucella* (Godfroid *et al.*, 2005).

A brucelose é uma zoonose conhecida desde a antiguidade. Hipócrates, no ano de 460 antes de Cristo (AC) relatava sintomas dos seus pacientes compatíveis com os sinais clínicos de brucelose (Poester *et al.*, 2009).

Recentemente foram realizados estudos em Itália, em esqueletos de pessoas que não sobreviveram à tragédia da erupção do vulcão Vesúvio no ano de 79 depois de Cristo (DC), na cidade de Herculano. Nestes restos mortais foram encontradas lesões ósseas típicas e compatíveis com lesões causadas pela enfermidade brucelose. Como possível justificação para este facto, os autores relacionaram as descobertas feitas nos esqueletos com microscopia eletrónica em queijos, que foram feitos com leite de cabra e posteriormente descobertos carbonizados em escavações na cidade de Herculano, que veio a revelar formas semelhantes a cocos que eram morfológicamente consistentes com *Brucella* spp (Poester *et al.*, 2009).

Também na Bíblia existem referências a abortos em animais, pensa-se que alguns destes poderão ter sido causados por brucelose. Milénios mais tarde, no ano de 1859 foi descrita uma doença por Marston em que os sintomas eram idênticos aos da doença causada pela bactéria *Brucella*. Contudo, apenas no ano de 1887, o agente causador da brucelose (*Micrococcus melitensis*) foi identificado por David Bruce (Nicoletti, 2010).

O agente *Brucella* herdou o seu nome devido a Sir David Bruce, microbiologista e patologista escocês, que na ilha de Malta, através do fígado de um soldado que sofria da chamada Febre de malta (Xavier *et al.*, 2009), doença difícil de diferenciar clinicamente de outras febres endémicas existentes então no litoral mediterrâneo, teve a capacidade de isolar a bactéria (Nicoletti, 2002). Mas apenas 18 anos mais tarde foi estabelecida a relação

zoonótica por um médico maltês, Dr. Zammit, que a isolou a bactéria do leite de cabra (Godfroid, 2005).

Mais tarde, em 1895 Dr. Berhard Bang um veterinário dinamarquês, isolou um pequeno cocobacilo gram-negativo, de tecidos originário de um caso de aborto bovino e denominou-o *Bacillus abortus* (*B. abortus*). Em 1914 foi isolado *Brucella suis* (*B. suis*) de suínos por Traum (Nicoletti, 2010).

1.2. Género *Brucella*

O Comité Internacional de Nomenclatura Bacteriológica (ajudada pelo Comité Internacional de Bacteriologia Sistemática) teve a necessidade de formar um Sub-comité sobre a taxonomia do género *Brucella*, que desenvolveu o quadro de classificação atual (Banai & Corbel, 2010).

O género *Brucella* está inserido na família *Brucellaceae* (família III), ordem *Rhizobiales*, classe *Alphaproteobacteria*, filo *Proteobacteria*, assim como *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Bartonella*, *Ochrobactrum*, *Rickettsia* e *Rhodobacter* com os quais está intimamente relacionado (Araj, 2010).

Relativamente à classificação filogenética com base no sequenciamento do gene que codifica a subunidade ribossomal 16s das bactérias desse género, foram agrupadas na classe α 2-proteobacteria, ordem *Rhizobiales*, família *Brucellaceae* e género *Brucella* (Moreno *et al.*, 1990).

Tabela 4: Estrutura Hierárquica da Classificação Científica usada em Biologia (Adaptado de Ferreira e Sousa, 2000)

Nível Taxonómico	
Reino	Bacteria
Filo/Divisão	Proteobacteria
Classe	Proteobacteria grupo alfa 2
Ordem	Rhizobiales
Família	Brucellaceae
Género	<i>Brucella</i>

A classificação tradicional das espécies de *Brucella* baseia-se essencialmente na preferência de hospedeiro, nas diferenças das características morfológicas e de patogenicidade. Como é sabido, as espécies de *Brucella* apresentam um elevado grau de homologia entre si e no ano de 1985 foi proposto que as espécies do género *Brucella* fossem agrupadas como bioavares de apenas uma única espécie (Moreno *et al.*, 2002) . Foi então proposto que *Brucella melitensis* (*B. melitensis*) fosse a única espécie e as restantes biovares (perfazendo um total de 18 biovares) e ficaria definido então que este género fosse classificado como um género mono-específico (Garrido-Abellan *et al.*, 2001).

Todavia esta nova designação não foi bem acolhida no seio da comunidade científica. Isto porque, não só os laboratórios clínicos e veterinários estavam habituados às designações originais para propósitos epidemiológicos, mas também os investigadores que tentavam evitar confusão no que diz respeito à origem e perigo associado a alguns agentes em particular. Por estes factos, foi acordado o retorno à nomenclatura original pelo Sub-comité Taxonómico de *Brucella* (Ficht, 2010). Foi provado através de análises moleculares a existência de diferenças genómicas entre as espécies e biovares de *Brucella*, congruente com a utilização de critérios como as características fenotípicas, metabólicas, de preferência de hospedeiro e de patogenicidade. Posteriormente a este facto ter sido validado para a classificação do género *Brucella* entrou novamente em vigor a tradicional divisão de espécies e o regresso à taxonomia anterior (Shevtsov *et al.*, 2013).

Brucella spp. são bactérias Gram-negativas, intracelulares facultativas com a capacidade de infetar não só muitas espécies animais, mas também o Ser Humano (Godfroid 2005).

De acordo com Rodriguez e colaboradores (1997) citado por Almeida, (2009) bactérias que pertencem ao género *Brucella* são cocobacilos ou bastonetes curtos, Gram-negativos com 0,6 a 1,5 µm de comprimento e 0,5 a 0,7 µm de diâmetro. São por vezes observados em cadeias curtas, mas mais frequentemente isolados. *In vivo*, apresentam um crescimento lento e são classificados de parasita intracelular facultativo, destituído de cápsula, com ausência de flagelo na sua estrutura e não formador de esporos.

No entanto, em preparações tratadas com anti-soro já foram relatadas estruturas semelhantes a cápsulas (Saxena, 2018).

A maior parte das estirpes precisam de condições anaeróbias, com temperaturas ótimas de 37°C e com suplementação de CO₂. Todas as estirpes perdem a sua efetividade a

temperaturas de 56°C. As condições ótimas de pH para esta bactéria encontram-se entre 6,6 a 7,4 na escala de pH (Saxena, 2018).

O género *Brucella* foi caracterizado relativamente à genética molecular, quase exclusivamente nos últimos 20 anos. A sua complexidade molecular média do genoma é de $2,37 \times 10^9$ daltons (Pessegueiro *et al.*, 2003).

O género propriamente dito, tem a característica de ser extremamente homogéneo. Apresenta uma elevada paridade sequencial de ácidos nucleicos entre as espécies, possuindo desta forma uma homologia de 95 % em estudos de hibridização DNA-DNA, (Verger *et al.*, 1985).

Estas bactérias possuem uma membrana citoplasmática, que é constituída por uma bicamada fosfolipídica, local onde se inserem as proteínas. Possuem também uma parede celular constituída por peptidoglicano e uma membrana externa, característica das bactérias Gram-negativas. Esta parede é constituída por fosfolípidos, proteínas e uma molécula anfipática denominada lipopolissacárido (LPS) e encontra-se a revestir a parede celular. O LPS encontra-se no folheto externo da membrana externa e tem na sua constituição um lípido A, através do qual está ancorado à membrana por uma cadeia lateral que está em contacto com o espaço extracelular, por um polissacárido O e por um núcleo ou core oligossacárido (Protásio, 2015).

No género *Brucella* foi identificado um número significativo de componentes antigénicos. Contudo o antigénio executor da resposta imunitária é o lipopolissacárido S (LPS-S) (Goldbaum *et al.*, 1993).

As bactérias do género *Brucella* podem ser divididas em dois grupos antigenicamente distintos. Este género inclui espécies que podem ocorrer na forma rugosa ou na forma lisa, dependendo do tipo de LPS presente na membrana externa. O LPS pode ser rugoso (R-LPS) (quando a cadeia O lateral não está presente) como é o caso da *Brucella ovis* (*B. ovis*) e *Brucella canis* (*B. canis*) ou podem ser lisas (S-LPS) (quando possuem a cadeia O lateral) que está presente na *B. melitensis*, *B. abortus* e *B. suis* (Poester *et al.*, 2010; Protásio, 2015).

Estas bactérias são catálase e oxidase positivas e na maioria não conseguem fermentar os açúcares. Possuem um metabolismo oxidativo com base na utilização de nitratos (aceitadores de eletrões) (Castro *et al.*, 2005).

Os organismos do género *Brucella* têm como umas das principais características a capacidade de sobrevivência em células fagocitárias e não fagocitárias (Saxena *et al.*, 2018). Podem também ser sequestradas para dentro dos monócitos e macrófagos do sistema fagocitário mononuclear (MPS), como são o baço, a medula óssea, o fígado e os gânglios linfáticos (Saavedra *et al.*, 2019). Contudo, os macrófagos são considerados como as principais células no hospedeiro para esta bactéria se alojar (Corbel, 1997).

Segundo Billard *et al.* (2007), também as células dendríticas são altamente suscetíveis a infeção por *Brucella* spp.

Banai e Corbel (2010) afirmam que as bactérias deste género coram de vermelho quando utilizada a técnica de Ziehl Neelsen modificada.

1.3. Hospedeiros

De entre todas as espécies do género *Brucella* existem as chamadas seis espécies clássicas: *Brucella canis*, *Brucella abortus* biovars 1-6 e 9, *Brucella neotomae* (*B. neotomae*), *Brucella melitensis* bioavrs 1-3, *Brucella suis* biovars 1-3, 4 e 5 e *Brucella ovis* (Moreno *et al.*, 2002; Wattam *et al.*, 2009). Para além destas espécies clássicas, juntam-se mais 4 espécies: *Brucella ceti*, isolada em golfinhos e baleias, *B. microti*, isolada na ratazana comum (Scholz *et al.*, 2008 b) e em raposas vermelhas (Scholz *et al.*, 2008 a), *B. pinnipedialis* em focas e *B. inopinata* (isolada numa mulher após cirurgia para implante mamário (Scholz *et al.*, 2008 c).

Mais recentemente foram isoladas estirpes em roedores nativos da Austrália, babuínos e sapos africanos. Várias novas espécies desde o início da década de 90 têm vindo a ser isoladas, facto que tem contribuído para o aumento do número de espécies conhecidas até hoje e para a possibilidade que novas espécies sejam descobertas futuramente (Saavedra *et al.*, 2019).

Podemos então concluir que de acordo com as diferenças de patogenicidade e de hospedeiro, o género *Brucella* é atualmente classificado em 12 espécies (Tabela 2) distintas e conhecidas (Saavedra *et al.*, 2019).

Tabela 5: Características epidemiológicas das espécies *Brucella* (Adaptado de Saavedra *et al.*, 2019; Dahouk *et al.*, 2013).

Espécies	Biovars	Hospedeiro Animal	Região Predominantes
<i>B. melitensis</i>	1 – 3	Ovelha, cabra, vaca, camelo	América Latina, Mediterrâneo litoral, Península Arábica
	3	Peixe-gato do nilo, cão	
	1	Cavalo	
<i>B. abortus</i>	1 - 6; 9	Bovino, bisonte, búfalo, alce, iaque, camelo	Europa, países asiáticos
<i>B. canis</i>	-	Canídeos	Alemanha, Argentina, Brasil, China, Filipinas, Japão, Madagáscar, México, Papua Nova Guiné, Perú, República Checa
<i>B. ovis</i>	-	Ovino	África do Sul, Alemanha, Argentina, Chile, Espanha, Estados Unidos da América, França, países da antiga União Soviética
<i>B. suis</i>	1 – 3	Porco, javali	América Latina, Europa, Sul Asiático, Sul China
	2	Lebre comum	
	4	Rena	
	5	Roedores	
<i>B. neotomae</i>	-	Rato-do-deserto	Estados Unidos da América
<i>B. microti</i>	-	Ratazana comum, rato-dos-prados	Norte da Europa
<i>B. ceti</i>	-	Baleia, golfinho	Maioritariamente Hemisfério Norte
<i>B. inopinata</i>	-	Desconhecido	-
<i>B. pinnipedialis</i>	-	Pinípedes	Maioritariamente Hemisfério Norte
<i>B. papionis</i>	-	Babuínos	-
<i>B. vulpis</i>	-	Raposa Vermelha	Áustria

Cada uma das espécies está devidamente adaptada ao seu hospedeiro preferencial, mas não é exclusiva, podendo assim infectar outros animais. Os canídeos e suínos para além das suas espécies de *Brucella* características podem também ser infectadas por *B. abortus* e *B. melitensis*. Os bovinos são tradicionalmente o hospedeiro natural de *B. abortus*, mas

também podem e são infetados por *B. melitensis* e *B. suis*. Já os pequenos ruminantes (PR), cabras e ovelhas, são na sua maioria dos casos afetados por *B. melitensis* ainda que em casos raros possam ser infetados por *B. abortus* e *B. suis*, contudo tem muito pouco significado, não só relativamente à infeção dos pequenos ruminantes, mas também à doença humana (Corbel 2006).

1.4. Brucelose em pequenos ruminantes

1.4.1. Transmissão

A brucelose dos pequenos ruminantes, causada por *Brucella melitensis*, continua nos dias de hoje a ter uma grande importância zoonótica em diversas regiões mundiais. Não só nos países em desenvolvimento e emergentes, mas também em algumas regiões desenvolvidas (Europa Ocidental e Meridional) continua a assumir-se como uma doença endémica (Rossetti *et al.*, 2017).

No meio ambiente, *Brucella* spp. é um agente patogénico que não tem a capacidade de se multiplicar, logo é normalmente transmitida diretamente de hospedeiro para hospedeiro (Xavier *et al.*, 2019).

Locais com sombra, humidade, pH neutro e baixas temperaturas ampliam a sobrevivência das *Brucella* spp. (Paulin & Neto, 2002). Apesar deste facto, a duração da sobrevivência depende de diversas variáveis, assim como o número de organismos presentes, a natureza do substrato onde as bactérias se encontram, a temperatura ambiente, o pH, a luz solar e a presença de outros microrganismos contaminantes (Corbel, 2006).

A transmissão entre os animais tem como origem o grande número de organismos excretados para o meio ambiente pelos pequenos ruminantes. Irá também depender de diversos fatores que condicionam a suscetibilidade do hospedeiro e o nível de exposição à *Brucella*. Animais suscetíveis irão ser infetados devido ao contacto direto com outros animais que se encontram infetados e em fase de excreção do organismo ou por outro lado, por contacto com produtos contaminados (excreções urinárias, resíduos placentários, membranas fetais) (Adams *et al.*, 1990).

A via alimentar é a principal via de transmissão entre animais, resultado da ingestão de alimentos contaminados ou mesmo da ingestão da própria bactéria de animais. Material excretado, assim como excreções vaginais e material abortado de animais infetados são as principais fontes de contaminação de zonas alimentares, de pastos, de

estábulos, caminhos comuns, bebedouros e águas (rio, riacho, poça), constituindo as principais fontes de infecção entre animais.

Apesar de raras, contaminações através de sémen, exsudado vaginal, urina, secreções do úbere e fezes também ocorrem (Maurin, 2005). Mais raro ainda é a ocorrência de transmissão entre mãe e filho ao nascimento, em partos naturais, contudo já foi reportada e deve ser considerada (Corbel, 2006).

Durante toda a vida a bactéria está presente no sémen dos carneiros e dos bodes, contudo a sua presença não apresenta um risco relevante de causar infecção quando utilizada a monta natural (Garrido-Abellan *et al.*, 2001). Esta transmissão só mostra ter uma maior importância na infecção por *B. suis* (Robinson, 2003). Apesar disso, a transmissão vertical in útero é possível, o que vai resultar em infecções latentes. Desta forma nos pequenos ruminantes este tipo de transmissão é menos frequente, sendo que a grande maioria destas infecções latentes são adquiridas aquando da ingestão do colostro ou do leite durante o período de amamentação (Grilló & Blasco, 1997).

A infecção por *Brucella* verifica-se quando a bactéria penetra na mucosa conjuntival, oral ou nasal. Após a penetração da bactéria na mucosa, esta é transportada dentro das células fagocitárias ou livre para os linfonodos regionais, onde posteriormente ocorre inflamação e hiperplasia e, podem permanecer durante semanas a meses (Bathke, 1988 citado por Souza, 2009).

Através do parto ou do aborto, animais que se encontrem infetados com brucelose disseminam as bactérias, contaminando assim o meio ambiente e outros animais. Fêmeas que se encontram positivas tornam-se portadoras crónicas após o primeiro aborto e por isto eliminam *Brucella* spp. pelo leite, urina e descargas uterinas durante os próximos partos, com ou sem aborto. Após a terceira gestação pós-infecção os abortos deixam de ocorrer. Isto deve-se ao facto de haver um desenvolvimento de imunidade celular e diminuição dos placentomas (Paulin e Ferreira Neto, 2003).

Na espécie caprina, após a migração e colonização da glândula mamária pelas bactérias e consequente excreção pelo leite durante todo o período de aleitamento, esta excreção por vezes prolonga-se até à lactação seguinte. Por outro lado, na espécie ovina, a secreção de bactérias *Brucella* spp. pelo leite tende a ser mais curta, geralmente não ultrapassa os dois meses (Garrido-Abellan *et al.*, 2001).

Alguns vetores, como por exemplo insetos, foram esporadicamente implicados na transmissão da doença (Cordero del Campillo, 1968). Contudo estes não apresentam um papel importante na transmissão da brucelose e não apresentam importância epidemiológica relevante (Moreno, 2014).

A transmissão entre diferentes explorações ganha especial importância quando existe partilha de pastos e caminho por onde rebanhos de explorações diferentes passam e pastam, pela compra de animais vindos de explorações com estatuto não indomado e pela partilha de machos reprodutores entre diferentes produtores (Corbel 2006).

1.4.2. Fatores de Risco

Idade

Por norma *B. melitensis* afeta animais sexualmente maduros. Animais mais jovens e que ainda não atingiram a maturidade sexual na larga maioria dos casos não são infetados, mas se o forem, não manifestam a doença e apenas têm uma resposta serológica transitória. A sensibilidade à doença aumenta com a gestação e quando estes forem sexualmente maduros (Garrido- Abellan *et al.*, 2001).

Apesar de os animais jovens serem frequentemente resistentes à doença, estes podem ser alvo de infeções latentes e serão assim um risco para o restante grupo quando atingirem a maturidade sexual (Corbel, 2006).

Espécie e raça

As raças de leite apresentam maior sensibilidade à doença comparativamente com as raças de carne. As raças ovinas, são mais sensíveis à *B. melitensis* em comparação com as raças caprinas (Corbel, 2006).

Era pensado que os principais hospedeiros de *Brucella melitensis* fossem os caprinos em vez dos ovinos, isto porque existia uma maior ocorrência de brucelose na espécie caprina quando comparado com a ovina, com especial ênfase na América latina, onde mesmo quando ovelhas e cabras eram criadas em conjunto apenas as cabras contraíam a doença. Contudo mais tarde ficou provado que a diferença na sensibilidade não estava na espécie, mas sim na raça (Garrido-Abellan *et al.*, 2001).

Por outro lado, em Portugal as raças mais sensíveis de ovelhas são as de “cauda grossa” da região do Mediterrâneo, assim como a Merina Branca, a Merina Preta e a Churra Algarvia (Garrido-Abelan *et al.*, 2001).

Fatores individuais

Está demonstrado que obviamente a sensibilidade à doença varia de animal para animal, mesmo em animais da mesma espécie, raça e até família. Sob outra perspectiva, ainda não foi possível demonstrar quais são os fatores responsáveis por diminuir ou aumentar a suscetibilidade e vulnerabilidade dos pequenos ruminantes à brucelose (Garrido-Abellan *et al.*, 2001).

Outros Fatores

A transumância (deslocamento sazonal de rebanhos para locais que oferecem melhores condições de pastoreio), a mistura de animais nas feiras e mercados agrícolas, estabulação em locais pequenos também promovem a transmissão e disseminação mais rápida da doença (Corbel 2006).

Dos principais fatores de risco de contaminação do ambiente e de alto valor epidemiológico, Maurin (2005) identifica fetos abortados, corrimentos uterinos e também restos placentários que levam a que o agente atinja as fontes de água e pastagens onde posteriormente os animais têm acesso para pastoreio.

A época do ano influencia os produtores relativamente à alimentação e manejo dos seus rebanhos, isto porque fatores como a temperatura e a pluviometria condicionam os pastos e o seu estado nutritivo e o que faz com que os pastores ou produtores se tenham de deslocar para locais de pastoreio com cruzamento de rebanhos e de pastoreio comum em busca de melhor alimentação para os seus animais, o que facilita a disseminação da doença (Crespo León, 1994).

A sobrelotação dos estábulos provoca um aumento da exposição à bactéria, sobretudo após o parto ou aborto. Se estes ocorrerem em locais fechados, favorecem a disseminação da doença, comparativamente a partos ou abortos tidos ao ar livre (Megersa *et al.*, 2011).

A ausência de um plano nacional de erradicação da doença no ano referido pelo autor (1999) ou a baixa regularidade de intervenções médico-veterinárias dificultam a erradicação da doença na Península Ibérica e facilitam a sua disseminação nos países onde o plano não é aplicado (Mainar-Jaime & Vázquez-Boland, 1999).

Alguns países têm optado pela descontinuação da vacinação com a vacina Rev-1, o que tem sido um dos principais fatores para a não erradicação da brucelose e consequentemente reaparecimento da doença nestes países (Racloz *et al.*, 2013).

Em Portugal, concluiu-se que existem onze variáveis que possibilitam o aumento do risco de infeção de brucelose e consequentemente são fatores de risco. São eles a existência de rebanhos mistos de ovinos e caprinos; rebanhos vizinhos estarem oficialmente livres ou não de brucelose; auto-substituição de animais por parte do produtor; substituição de animais jovens fêmeas não vacinadas com a vacina Rev-1; não desinfecção dos rebanhos após a remoção do estrume; não separação de animais doentes; não remoção do estrume antes das épocas de partos; não separação de animais em trabalho de parto; mais de 50% dos partos ocorrerem em caminho/pastagens comuns; não remoção eficaz da placenta ou enterro da mesma; não enterrar fetos abortados, nados mortos e descendentes inviáveis (Castelo & Simões, 2019).

1.4.3. Patogenia

A brucelose em pequenos ruminantes é uma doença crónica ou subaguda, que por norma é bem tolerada, mas é responsável por abortos e infertilidade, o que leva a que tenha um importante impacto económico no sector agropecuário (Maurin, 2005).

A porta de entrada da bactéria no hospedeiro é essencialmente através da membrana mucosa da orofaringe, através da conjuntiva ocular e também pelo trato respiratório (Garrido-Abellan *et al.*, 2001).

Após a penetração da bactéria no organismo é desencadeada a resposta imunitária. Esta resposta imunitária é caracterizada pela presença dos neutrófilos, que apesar de não serem realmente eficazes são a primeira linha de defesa do animal (Castro *et al.*, 2005; Gillespie & Hawkey, 2006).

A patogenia das bactérias do género *Brucella* está dependente especialmente de três fatores: na capacidade destas espécies conseguirem sobreviver, permanecer e replicar-se dentro das células hospedeiras; na capacidade de modular a resposta imunitária do hospedeiro; na capacidade de evasão dos mecanismos bactericidas celulares (Castaño *et al.*, 2016).

Na perspectiva da patogénese, a infeção de cabras e ovelhas por *B. melitensis* é similar à infeção dos bovinos por *B. abortus*, apesar de existirem algumas diferenças (Blasco, 2010).

Nas espécies caprina e ovina, quando os animais se encontram sexualmente maduros, a infeção localiza-se essencialmente no sistema reprodutor e por norma produz placentite seguida de aborto nas fêmeas gestantes (tipicamente durante o último terço da gestação) e por outro lado, orquite nos animais machos. Contudo estas manifestações clínicas não são patognomónicas (Corbel, 2006).

Nas fêmeas, após a ocorrência de aborto, a infeção pode persistir até cinco meses, os linfonodos associados e as glândulas mamárias mantêm-se infetadas durante vários anos. Apesar disto, a recuperação espontânea pode acontecer, mas o normal no decorrer da doença é que se mantenha a infeção persistente (European Commission, 2001; Radostits *et al.*, 2007).

No decorrer da infeção quatro diferentes fases podem ser identificadas (Coelho *et al.*, 2014):

1) Penetração e migração local e regional:

Após a inoculação no hospedeiro as bactérias são confrontadas com as defesas celulares do mesmo. Estas bactérias são capturadas e posteriormente transportadas pelas células fagocíticas, através dos ductos linfáticos até aos linfonodos mais próximos do local de entrada onde ocorreu a multiplicação (European Commission, 2001; Garin-Bastuji *et al.*, 2006); Coelho *et al.*, 2014).

Nesta fase inicia-se a infeção e a resposta imunitária, caracterizada por uma resposta imunológica celular (na sua maioria macrófagos e linfócitos T), sendo a resposta serológica ausente ou muito reduzida, mediada por anticorpos específicos (Garin-Bastuji *et al.*, 2006; Coelho *et al.*, 2014).

No caso de o microrganismo permanecer nos linfonodos isto provoca uma hiperplasia linfo-reticular com duração de semanas até meses (Coelho *et al.*, 2014).

2) Disseminação hematogénea/septicémica:

No caso de o agente bacteriano não permanecer nos linfonodos e tenha a capacidade de resistir às defesas do hospedeiro, este é transportado através dos ductos linfáticos e posteriormente é disseminado por via hematogénea (bacteriémia transitória) para quase

todos os órgãos, inclusive o sistema monocítico-macrofágico (baço, fígado, nódulos linfáticos, medula óssea), úbere e órgãos reprodutores (assim como testículos, vesículas seminais, glândulas mamárias, útero grávido) o que vai causar bacteriemia recorrente (esta bacteriemia é detetável após 10 a 20 dias e persiste durante um período de 30 dias a dois meses) coincidentes com períodos de febre, que nas fêmeas está intimamente relacionado com infecção placentária e fetal ,causando na maioria das vezes aborto (Coelho *et al.*, 2014; Kaltungo *et al.*, 2014)

Nas fêmeas gestantes a invasão e multiplicação uteroplacentária é bastante significativa, pelo que não se pode considerar que este órgão ofereça resistência imunológica adequada. A afinidade que a *Brucella melitensis* tem com a placenta fetal e com o endométrio grávido é responsável pelas principais manifestações clínicas em ovelhas e cabras: o aborto no último terço da gestação ou o nascimento de um feto com baixa ou nula viabilidade (Coelho *et al.*, 2014).

O aborto é causado pela especial predileção das bactérias de *Brucella melitensis* pelas células do trofoblasto, onde se dá a multiplicação. Esta predileção é consequência da elevada concentração de hormonas esteroides e eritritol existentes no último terço da gestação.

A invasão e multiplicação da bactéria vai originar mudanças hormonais, assim como a diminuição dos níveis de progesterona, aumentos das concentrações de prostaglandina F2 α , cortisol e estrogénios (Xavier *et al.*, 2010).

3) Fase secundária ou de adaptação:

Nesta fase, a fase secundária ou de adaptação, a sua evolução depende em grande parte da suscetibilidade do hospedeiro e é caracterizado pela presença de bactérias em locais específicos (placenta, tecido mamário, testículos, articulações) com respetiva sintomatologia a acompanhar. Durante esta fase existe eliminação de *Brucella* spp., ou com mais frequência, infecção persistente das glândulas mamárias e linfonodos supranumerários e genitais com excreção de forma intermitente ou de forma constante nas secreções genitais e no leite (Coelho *et al.*, 2014).

4) Cura instantânea ou de doença latente:

Em cabras e ovelhas o período infeccioso não é aparentemente evolutivo para uma situação de infecção latente ou cura espontânea, sendo esta frequente em pequenos ruminantes com idade até aos dois anos (Coelho *et al.*, 2014).

2.4.4. Resposta imune

Por norma, os mecanismos de resposta imune, tantos os celulares como os humorais, são ativados logo após a infeção do animal por *Brucella* (Coelho *et al.*, 2014).

A gravidade da doença causada pela infeção por *Brucella* spp. é determinada por diversos fatores e varia significativamente consoante a espécie, a quantidade do inóculo, a estirpe, a vacinação prévia, a idade e sexo do hospedeiro, assim como a dimensão do rebanho, densidade animal e as condições de manejo (European Commission, 2001; Corbel, 2006). De realçar que a imunidade vacinal pode modificar a relação parasito-hospedeiro. Desta forma é possível observar no campo todos os estádios intermédios entre infeção aguda típica e a resistência completa (European Commission, 2001).

O sistema imune inato confere ao hospedeiro infetado uma vasta proteção contra os diferentes agentes patogénicos e é baseado num repertório de recetores com a capacidade de reconhecer componentes microbianos conservados (PAMPs – padrões moleculares associados aos patógenos) (Albiger *et al.*, 2007). Esta mesma ligação dos PAMPs aos seus respetivos recetores dispara sinais que vão ativar as células apresentadoras de antígeno (APC) que por sua vez vão facilitar a fagocitose da bactéria *Brucella* spp. (Akira, 2006).

2.4.4.1. Imunidade celular

A fase de declive da infeção por *B. melitensis* é coincidente com o início da imunidade celular no início da fase de latência. Após a penetração da bactéria no hospedeiro animal, estas encontram as defesas celulares do animal. A resposta da imunidade celular (essencialmente sob a forma de macrófagos ativados e linfócitos T) constitui o principal mecanismo de proteção do hospedeiro contra a infeção por *Brucella* spp. e determina o destino das bactérias invasoras (European Commission, 2001; Coelho *et al.*, 2014).

As células fagocíticas mononucleares são o principal e mais importante fator da imunidade celular enquanto a imunidade adquirida contra as bactérias intracelulares depende da resposta mediada pelas células T. Esta resposta é usada no teste alérgico da brucelina (Coelho *et al.*, 2014).

A resposta celular, assim como a resposta humoral, pode ser esperada em algumas semanas, contudo esta é variável e pode até não chegar a ser detetada (European Commission, 2001).

2.4.4.2. Imunidade humoral

A resposta imunitária do tipo humoral baseia-se na produção de anticorpos direcionados principalmente contra a LPS das bactérias e desenvolve-se normalmente na primeira semana após penetração da bactéria e consequente infecção (Garrido-Abellan *et al.*, 2001).

Os anticorpos humorais demonstram ter um papel importante na resistência à infecção, contudo o principal mecanismo de defesa usado contra os organismos de *Brucella* spp. é a imunidade mediada por células, que envolvem a produção de linfócitos T citotóxicos e a ativação de macrófagos e da sua atividade bactericida através da libertação de citocinas pelos linfócitos T helper (Corbel, 2006).

Cerca de duas a quatro semanas pós-infecção espera-se uma resposta serológica. Contudo essa resposta é variável e pode estar completamente ausente. É sabido que o padrão de resposta serológico, relativamente à produção de imunoglobulinas (Ig) dos pequenos ruminantes, é bastante similar ao dos bovinos, ou seja, existe um aumento inicial de Ig M nas primeiras três a quatro semanas, seguido de um aumento gradual de IgG e IgA sete a catorze dias pós-infecção, com descida dos isotipos para níveis reduzidos num estadio de cronicidade, mas com preponderância de IgG (European Commission, 2001; Coelho *et al.*, 2014).

Em animais jovens ou sexualmente imaturos, a resposta humoral contra a infecção por *Brucella* é transitória e por vezes ausente. Também se revela ineficaz, isto porque a forma lisa de *Brucella* spp. tem a capacidade de inibir a fusão fagossoma-lisossoma, aumentando então a possibilidade de existir multiplicação dentro dos macrófagos num meio sem anticorpos (European Commission, 2001; Coelho *et al.*, 2014).

Quando aplicada em dose completa por via subcutânea ou conjuntival em animais de reposição jovens, a estirpe vacinal *B. melitensis* Rev.1 pode induzir uma resposta serológica de longa duração para testes de aglutinação, interferindo desta maneira com o rastreio serológico.

2.4.5. Sintomatologia

A brucelose tem a característica de apresentar diversos sinais clínicos inespecíficos, o que consequentemente atrasa e dificulta a chegada ao diagnóstico correto. Tanto machos como fêmeas são igualmente sensíveis (Xavier *et al.*, 2009).

Nos pequenos ruminantes a manifestação clínica mais característica e frequente de infecção por *B. melitensis* é o aborto (Borel *et al.*, 2014).

Seguido do aborto a infertilidade, epididimite e orquite são as principais manifestações clínicas de brucelose em pequenos ruminantes. Tanto ovelhas como cabras, independentemente de serem machos ou fêmeas, quando infetados por *B. melitensis* podem manifestar certas lesões, tais como lesões artríticas, apesar de este tipo de lesão ser raro. Estes sinais são assumidos como característicos, mas não específicos, ou seja, não são patognomônicos de infecção por brucelose (Corbel, 2006; Spickler, 2009). O sinal predominante de infecção aguda é a falha reprodutiva, seja por aborto ou por nascimentos de animais com pouca ou nenhuma viabilidade (Xavier *et al.*, 2009).

A sintomatologia da doença apenas ocorre em fêmeas e machos adultos, sexualmente maduros. Os animais jovens podem ser infetados, mas não irão exibir sinais clínicos até atingirem a idade adulta ou a maturidade sexual (Garrido-Abellan *et al.*, 2001).

É importante realçar que não existe evidência que a sintomatologia de infecção por *B. melitensis* varie de acordo com o biovar em questão (Kaltungo *et al.*, 2014).

Por norma as fêmeas adultas abortam nos últimos dois meses de gestação e este aborto pode e é muitas vezes seguido de retenção placentária. Abortos ocorrem frequentemente na primeira gestação após a infecção por *Brucella melitensis* e nas gestações seguintes ao invés de aborto os cabritos e cordeiros nascem fracos e com pouca viabilidade (Garrido-Abellan *et al.*, 2001).

A taxa de abortos num rebanho é bastante variável, encontra-se entre 10% a 60% (Alton, 1990).

Uma queda na produção leiteira, de no mínimo 10%, após o parto ou aborto é verificada, contudo não apresentam sinais de mamite (tais como tumefação do úbere, dor e relutância ao toque no úbere, aumento da temperatura, alterações nas características do leite (Iowa State University, 2007).

É frequente que o úbere se mantenha permanentemente infetado, especialmente em cabras e vacas e é recorrente a excreção intermitente ou constata do agente *Brucella* spp. no leite nas lactações seguintes (Corbel, 2006).

Os carneiros infetados por *Brucella* spp. apresentam epididimite e orquite unilateral na maioria das vezes, com um aumento do epidídimo (especialmente na porção caudal) que

é facilmente palpável (Baigún, 2000) não só no epidídimo, mas também nas túnicas (Kaltungo *et al.*, 2014).

Nos machos para além das alterações palpáveis também ocorrem alterações na qualidade do ejaculado. Os animais infetados com lesões clínicas evidentes apresentam 55.7% azoospermia, 26.8% oligospermia, 5,7% necrospermia e 11,5% destes animais apresentam sémen com características consideradas normais (Ramos *et al.*, 1966). Para além da má qualidade do sémen, durante a fase aguda da infeção, os machos apresentam exsudado hemorrágico ou exsudado fibrino-purulento (Kaltungo *et al.*, 2014).

Carneiros que se encontrem assintomáticos podem desenvolver subfertilidade leve ou manter a fertilidade normal, aumentando desse modo o risco de propagação da doença no rebanho (Xavier *et al.*, 2009).

Sem diferenciação de sexo, *B. melitensis* tem a capacidade de causar perda de peso, infertilidade e com menos frequência depressão (na altura da fase aguda da infeção) e consequentemente hipertermia e artrites (Alton, 1990).

Em animais adultos a morte também ocorre e é normalmente consequência de metrite aguda seguida de retenção placentária (Gul & Khan, 2007).

No entanto, um grande número de fêmeas não gestantes, tanto de espécie caprina como ovina, mantêm-se assintomáticas após a infeção (Spickler, 2009a).

2.4.6. Quadro Lesional

Em fêmeas infetadas por *B. melitensis* que tiveram aborto no decorrer da doença, os fetos abortados geralmente apresentam um aspeto macroscópico normal. Todavia é possível encontrar nestes fetos fluído hemorrágico na cavidade torácica. Baço, fígado e gânglios linfáticos aumentados de tamanho e pode ainda ser encontrada broncopneumonia e pleurite fibrinosa (Corbel, 2006; Kaltungo *et al.*, 2014). Estes fetos podem apresentar também autólise ou diferentes graus de edema subcutâneo (Spickler, 2009a).

Em animais adultos infetados são achados frequentes: lesões inflamatórias granulomatosas em tecidos linfoides e órgãos, com especial ênfase nos órgãos reprodutivos, nos linfonodos mamários e no úbere. Também em articulações e nas membranas sinóvias estas lesões podem ser encontradas (Coelho *et al.*, 2014). É ainda possível encontrar mastite aguda com a presença de nódulos palpáveis e também produção de leite coagulado e aguado (Kaltungo *et al.*, 2014).

É ainda possível constatar a presença de granulomas espermáticos nos machos infetados (Carvalho Júnior *et al.*, 2012).

Os cotilédones podem apresentar uma coloração avermelhada ou amarelada, ou por outro lado, apresentarem-se necróticos. A região intercotiledonar apresenta espessamento focal (semelhantes a couro) e exsudados na sua superfície (Kaltungo *et al.*, 2014).

Histologicamente em infeções por *Brucella* spp. os achados são sobretudo infiltrações linfocíticas e granulomas com necrose (Kaltungo *et al.*, 2014).

2.4.7. Diagnóstico

A infeção por *Brucella* spp. caracteriza-se por ser uma doença subaguda ou crónica que afecta várias espécies animais. A sua sintomatologia não é patognomónica e, por conseguinte, o diagnóstico está dependente da comprovação da presença de *Brucella* spp. através do isolamento da bactéria, deteção dos antígenos ou de material genético ou ainda através da verificação da resposta imunomediada celular por anticorpos específicos (Corbel, 2006).

2.4.7.1. Cultura bacteriana

De todos os métodos o mais confiável e o que apresenta ser um método inequívoco para diagnóstico de infeção é o isolamento de *Brucella* spp. em cultura e por este motivo trata-se de um teste “Gold Standard” (Vicente *et al.*, 2014) sendo este método também usado para a realização de diversos estudos epidemiológicos e também para monitorizar a eficácia ou não do programa vacinal imposto pelo país. Apesar dos métodos bacteriológicos serem os métodos de eleição, por vezes não se obtém culturas positivas em todos os animais infetados. Apesar destes factos este método, devido às exigentes características do mesmo (risco de contaminação de técnicos, deteção em laboratório, etc.) é na maioria das vezes regalado para segundo plano, optando-se por a escolha de outros métodos (Corbel, 2006). Por estes motivos este tipo de cultura apenas pode ser realizado em laboratórios com nível de biossegurança 3 (Garin-basuji *et al.*, 2006).

Nos pequenos ruminantes para a realização do diagnóstico bacteriológico usam-se meios de cultura de crescimento seletivo através de culturas de conteúdo estomacal de fetos, placenta, leite, fetos abortados e muco vaginal. O isolamento da bactéria pode ainda ser feito recorrendo a material recolhido *post-mortem*, sendo neste caso o úbere, testículos, útero grávido, baço e linfonodos os materiais preferenciais para se fazer a recolha (Corbel 2006).

Quando existe isolamento bacteriológico de *Brucella* spp., o diagnóstico é definitivo e irrefutável (Alton *et al.*, 1988).

2.4.7.2 Esfregaços corados

Quando usados esfregaços placentários, conteúdo estomacal de fetos ou descargas vaginais estes podem ser corados de vermelho através dos métodos de Ziehl-Neelsen modificado e Kusters. Se for observada uma grande quantidade de agregados de organismos intracelulares e fracamente álcool-ácido resistente que apresentam morfologia idêntica a *Brucella*, isto constitui uma prova hipotética de brucelose. Deve-se ter especial atenção a outros agentes infecciosos tais *Coxiella burnetii* ou *Chlamydia* spp, pois estes agentes assemelham-se a *Brucella* spp (Corbel 2006).

2.4.7.3. Diagnóstico sorológico

Os testes de diagnóstico para brucelose recomendados pelo Office International des Epizooties (OIE) para cabras e ovelhas são o teste de fixação do complemento (TFC) e o teste de Rosa Bengala (RBT). Para além destes dois testes recomendados podem ainda ser realizados o teste i-ELISA (Indirect Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) e o ensaio com fluorescência polarizada (FPA) como forma de rastreio. Visto que nenhum dos testes apresenta uma sensibilidade e especificidade de 100% é recomendado a realização de testes em série ou em paralelo (SANCO, 2009).

Relativamente aos testes serológicos, é identificada como a principal desvantagem a incapacidade de diferenciação de anticorpos vacinais de anticorpos produzidos pós-infeção natural, resultando desta maneira numa baixa especificidade quando testados animais vacinados. Por este motivo estes métodos resultam em falsos-positivos (Nicoletti, 2010).

2.4.7.3.1 Teste de fixação do complemento (TFC)

É considerado mundialmente como o teste de confirmação. Independentemente de ser um teste com uma elevada sensibilidade, apresenta pequenas desvantagens como ser um exame complexo, a necessidade de ser realizada em laboratórios bem equipados e com uma equipa técnica adequada e formada para a realização da titulação e manutenção dos reagentes. Este teste também está sujeito a interferência das reações de anti-complementariedade e as amostras hemolisadas não podem ser usadas (McGiven *et al.*, 2003)

Para a realização deste teste existem diversos métodos propostos para a sua realização, sendo que o princípio deste é a quantificação (ICFTU/ml) do grau de hemólise obtido na amostra (OIE, 2016).

Neste tipo de teste pode ocorrer um fenómeno denominado prozona, quando se está a testar soros com baixas diluições, ou por outro lado, podem ocorrer reações anti complementares que tornam o TFC um teste nulo (quando existem bactérias concomitantes ou outros fatores que fixem o complemento levando assim a que exista uma reação positiva mesmo não havendo presença de *Brucella* spp. (Garrido-Abellan *et al.*, 2001).

2.4.7.3.2 Teste Rosa Bengala (TRB)

Como é sabido o TRB é um teste que apresenta uma baixa sensibilidade dos antígenos em pequenos ruminantes, é aconselhado que seja feita uma pequena modificação que consiste em aumentar ligeiramente a quantidade de soro da dose de teste de 25-30µL para a dose de 75-90 µL mantendo o mesmo volume de antígeno (25-30 µL), o que faz com que haja um aumento significativo da sensibilidade sem alteração na especificidade (Garin-Bastuji *et al.*, 2006).

O Teste Rosa Bengala está inserido no grupo de teste de Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) (Corbel, 2006).

O TRB é um teste de aglutinação que tem como característica usar antígeno e RB, a um pH de $3,65 \pm 0,05$. A preparação deste antígeno é feita e preparada a partir de células de *B. abortus* S99 ou S1119-3, sujeitas a centrifugação e suspensão em solução salina de fenol estéril (0.5%) (OIE 2016).

Este teste apresenta como principais vantagens a característica de ser de fácil execução, barato e simples (Corbel, 2006).

Devido à possibilidade de existirem com frequência falsos-positivos é recomendado que quando exista resultado positivo no TRB seja feita a confirmação com o TFC, visto que a sua especificidade é maior (Garrido-Abellan *et al.*, 2001). Embora pese o facto que o TRB seja um teste suficientemente sensível para manter uma vigilância em áreas livres de brucelose, este deve ser realizado em combinação com o TFC para áreas de vigilância em rebanhos localizados em áreas não indemnes de forma que se consiga cumprir o programa de erradicação da doença e abate (Garrido-Abellan *et al.*, 2001).

2.4.7.3.3. Teste alérgico cutâneo

Neste tipo de teste usa-se um preparado de antígenos citoplasmáticos de *Brucella* spp. assim como Brucelina INRA ou Brucellergene OCB (Garrido-Abellan *et al.*, 2001). Consiste na inoculação subcutânea do alérgeno na pálpebra inferior que se espera que tenha uma resposta de hipersensibilidade após 4 horas (momento em que deve ser realizada a leitura do teste).

Este teste pode ser usado como teste de rastreio ou como teste complementar em rebanhos que não estejam vacinados, desde que seja utilizado um antígeno purificado e padronizado (OIE, 2009).

A hipersensibilidade dérmica que o teste alérgico cutâneo causa apenas indica uma prévia exposição do animal ao organismo e não necessariamente uma infeção ativa. Também neste teste podem ocorrer reações falso-positivos em animais já vacinados e por este facto os resultados devem ser interpretados em correlação com os sinais clínicos, história e resultados dos testes bacteriológicos e serológicos. Contudo tem uma maior utilidade quando usado para monitorização dos estatutos dos rebanhos em áreas livres de brucelose (Corbel, 2006).

2.4.7.3.4. Teste imunodifusão em gel

O teste de imunodifusão em gel é um teste de execução fácil comparativamente com ELISE e TFC (Blasco *et al.*, 1999). É usado como teste confirmatório do TRB no diagnóstico de infeção por *Brucella* spp., pois permite a diferenciação de animais previamente vacinados com Rev-1 de animais infetados por *B. melitensis* (Marín *et al.*, 1999).

2.4.8. Profilaxia

É na maioria dos casos mais económico e prático a prevenção de doenças do que tentar o seu controlo ou erradicação (Corbel, 2006).

Em infeção por *Brucella* spp., as medidas de prevenção compreendem uma seleção criteriosa de animais (independentemente de ter sido obtidos do próprio rebanho ou um rebanho de outro produtor, devem ser descendentes de animais livres de *Brucella* (Corbel 2006).

Para as autoridades sanitárias e veterinárias a prevenção de brucelose deve ser prioritária, não só por ser uma importante zoonose, mas também pelo impacto económico que a

doença causa, não só diretamente ao produtor, mas também em outros sectores quando impedimento do livre comércio de produtos de animais seja impedido (Roth *et al.*, 2003).

2.4.8.1 Vacinação

A infeção por *Brucella* spp. é das poucas doenças bacterianas em que as vacinas vivas são eficazes (Moreno, 2014).

A vacinação deve ser usada como primeira escolha para a eliminação da doença (Sanco, 2009).

Na literatura disponível sobre brucelose, a grande maioria dos autores afirma que a vacinação dos pequenos ruminantes é o método mais prático e que apresenta maior eficácia na redução da incidência de brucelose (Nicoletti, 2010).

Está descrito cientificamente que a vacina disponível para cabras e ovelhas, vacina da estirpe Rev-1 de *B. melitensis*, é a medida mais eficaz de prevenção quando administrada na dose recomendada (Alton, 1990). É aconselhada que a sua administração seja feita por via conjuntival (com exceção de animais gestantes que não se recomenda a vacinação), em animais jovens com idades entre os 3 e os 6 meses de vida (Olsen, 2013).

A vacinação quando realizada nas condições descritas promove imunidade vitalícia (Alton, 1990).

A vacinação com Rev-1 apresenta algumas desvantagens tais como a impossibilidade de distinção entre animais previamente vacinados e infetados (quando usados testes de diagnóstico serológicos) e a sua elevada virulência com a capacidade de provocar abortos quando administrados durante o tempo de gestação (Alton, 1990), a virulência para o ser humano com risco para os agricultores e para os Médicos Veterinários no momento da ingestão de leite de cabras e ovelhas não pasteurizado (Blasco, 2011).

As vacinas que existem na atualidade mostram ser seguras e eficazes na prevenção da transmissão e na prevenção do aborto causado por brucelose. Contudo aparentam ser pouco eficazes na prevenção da infeção ou seroconversão (Olsen, 2013).

A dose vacinal de Rev-1 a administrar em pequenos ruminantes é $(0,5-2) \times 10^9$ de organismos viáveis (OIE 2009).

2.4.8.2 Maneio

De forma a evitar a possibilidade de transmissão ou disseminação devem ser evitados os contactos e as misturas de rebanhos de estatuto desconhecido. Quando ocorrem abortos, partos prematuros ou sinais clínicos inespecíficos, mas que ocorrem na doença, deve ser chamado o médico veterinário de forma a identificar a causa dos mesmos.

Animais suspeitos devem ser isolados do restante rebanho até à chegada do diagnóstico definitivo. Os rebanhos devem ser incluídos em planos de vigilância e um programa nacional de erradicação de brucelose deve ser adotado. Após o parto ou aborto, placentas e fetos não viáveis devem ser destruídos de maneira adequada, através de enterro ou queima. Também as áreas contaminadas devem ser cuidadosamente desinfetadas (Corbel, 2006).

Animais comprados de outras explorações devem ser isolados, por um período mínimo de trinta dias e posteriormente realizado outro teste serológico para depois serem adicionados ao rebanho (Corbel, 2006). No caso das fêmeas gestantes adquiridas devem realizar uma quarentena até que completem a gestação, mesmo no caso de não haver sinais de infeção (Radostits *et al*, 2001).

Por lei, os animais devem ser individualmente identificados por marca auricular ou por tatuagem. Todo o movimento de animais entre explorações (com especial ênfase em regiões onde existe uma elevada prevalência da doença) é um princípio básico de controlo animal de brucelose e uma medida necessária e eficaz na prevenção da mesma. Quando o movimento entre explorações é necessário devem ser aplicados testes de pré-movimentação que reduz o risco de disseminação entre explorações e serve, indiretamente, para avaliação da condição sanitária da exploração de origem (European Comission, 2009).

Explorações classificadas como B3 ou B4 (ou seja, indemne de brucelose) apenas deve adquirir animais de explorações que tenham uma classificação sanitária igual ou superior à sua (Garrido-Abellan *et al*, 2001).

Quando construída a maternidade esta deve ser essencialmente composta por baias separadas que possam facilmente ser desinfetadas e limpas (Radostits *et al*, 2001).

3 - Brucelose em Portugal

Programa Nacional de Erradicação da Brucelose

A grande maioria dos programas sanitários nacionais rege-se pela testagem e pelo abate de animais serologicamente positivos. Esta estratégia justifica-se economicamente quando a prevalência da infeção a nível do rebanho é inferior ou igual a 1% (Nicoletti, 2010).

O Programa de Erradicação de Brucelose para Pequenos Ruminantes (PEBPR) é um programa estipulado pelo governo português pelo Decreto-lei nº 244/2000 usando a vacina Rev-1 e administrada em fêmeas entre os 3 e os 6 meses de idade, por via conjuntival, em rebanhos infetados e/ou em unidades epidemiológicas consideradas de risco (Decreto-lei n.º 244/2000, de 27 de setembro 2000).

Em Portugal Continental a brucelose apresenta-se como sendo uma doença endémica. A epidemiologia desta doença, não só a nível nacional, mas também a nível mundial, aparenta ter uma correlação forte entre a distribuição de casos de brucelose humana e animal (Saavedra *et al.*, 2019).

Em diversos estudos realizados sobre a brucelose em Portugal e em alguns países europeus chega-se à conclusão de que a sazonalidade reflete uma tendência geográfica. Isto porque nos casos reportados apresentavam picos de infeção no período de março a junho (que coincide com a altura de maior quantidade de partos nos PR, maior manipulação animal, mais intervenções médico-veterinárias e maior quantidade de leite disponível para transformação (Pessegueiro *et al.*, 2003).

Concretamente no nosso país, Portugal, a Brucelose ocupa o lugar de zoonose com maior impacto na população. Sendo desde 1953 uma DDO sujeita a campanhas de controlos nos PR desde esse ano (Fonseca, 2011).

No ano de 1986, Portugal entrou na então denominada Comunidade Europeia e por consequência dessa entrada no ano de 1992 é aprovado o programa de erradicação de brucelose dos pequenos ruminantes (Decisão 91/217/EEC, 26 de março de 1991), por um período de três anos, sujeito a aprovações anuais que até aos dias de hoje se encontram em vigor, com as devidas e necessárias adaptações. Estrategicamente, Portugal adotou a erradicação com base na classificação sanitária de efetivos (disponível no Anexo I) e no

aumento progressivo de áreas de classificação indemne de brucelose (Direção Geral de Alimentação e Veterinária [DGAV], 2021).

Dois anos após o início do PEBPR em Portugal, no ano de 1993, a prevalência de brucelose nos efetivos era de 12% e foram relatados 1202 casos de brucelose humana, todos causados por *B. melitensis* (DGAV, 2019).

Durante os anos seguintes os efetivos foram ficando sob vigilância, contudo foi visível a existência de pequenas diferenças de prevalência entre regiões geográficas, nomeadamente a região do Norte que continua a ser a mais afetada. Segundo os últimos dados disponíveis pela DGAV (2019), nos últimos seis anos a percentagem de rebanhos positivos teve um decréscimo de 1.21% em 2012 para 0.73% em 2018, enquanto a quebra percentual de animais positivos foi de 0.323% em 2012 para 0.105% em 2018.

Consoante estava previsto no ano de 2017 foi implantado o mais recente PEB (em vigor até há data de hoje) em Portugal e que abrangeu uma cobertura total de efetivos de 97.04% com pequenas variâncias (92.39% dos efetivos na região de Lisboa e Vale do Tejo e de 99.69% na região Centro) (DGAV, 2019).

Conforme foi disponibilizado pela DGAV (2019), nos últimos dados disponíveis é notório o papel fundamental que o PEB tem nos efetivos, onde é verificado que nas 5 regiões de Portugal oficialmente não indemnes apenas a região do Norte apresenta pontos percentuais acima de 1 (2.25% de prevalência nos efetivos), todas as outras encontram-se abaixo de 1 % (Centro – 0.09%; Lisboa e Vale do Tejo – 0.37%; Alentejo – 0.16%; Algarve- 0.93%).

DGAV (2019) afirma que no último ano 72 animais na região do Norte estavam infetados (21 rebanhos), 6 em Lisboa e Vale do Tejo (4 rebanhos), 4 no Alentejo (1 rebanho) e 12 no algarve (4 rebanhos). Todos os animais positivos foram abatidos conforme a legislação em vigor e os restantes animais foram retestados até que consigam obter o estudo de indemne (B4).

É através do PEB que a DGAV e a União Europeia prevêem que no ano de 2024 a prevalência de brucelose seja de 0%. Estimam que no ano de 2020 a prevalência fosse de 0.40%, no ano de 2021 0.20%, no ano de 2022 0.10%, no ano de 2023 0.05% e por fim no ano de 2024 se atingir o estatuto de oficialmente indemne (DGAV, 2019).

O PEB é aplicado a Portugal continental e pela primeira vez em 2018 foi alargado para a região autónoma da Madeira (este plano tem como objetivo garantir o estatuto de região indemne no ano de 2023) (DGAV, 2019).

Segundo a Comissão Europeia a Região Autónoma dos Açores está reconhecida como oficialmente indemne de *Brucella melitensis*. Apesar deste facto esta região mantém um programa de vigilância para que seja mantido o seu estatuto de indemne (DGAV, 2021).

Juntamente com os rastreios serológicos, com o Teste de Rosa Bengala, Fixação de Complemento, abate de animais positivos para erradicação da doença, é também aplicada a vacinação de animais jovens com a vacina Rev-1 em certas áreas geográficas de Portugal continental onde existe maior prevalência da doença, tais como algumas regiões do centro administradas pela Direção de Serviços de Alimentação e Veterinária da Região de Lisboa e Vale do Tejo (DSAVRC), em toda a área do Algarve administrada pela Direção de Serviços de Alimentação e Veterinária da Região do Algarve (DSAVRALG), em Trás-os-Montes geridos pela Direção de Serviços de Alimentação e Veterinária da Região do Norte (DSAVRN) e em algumas zonas administradas pela Direção de Serviços de Alimentação e Veterinária da Região de Lisboa e Vale do Tejo (DSAVRLVT) (DGAV, 2019).

Com tudo isto, os objetivos desta Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária foram:

- Calcular a prevalência individual brucelose de pequenos ruminantes na área em estudo durante o período entre janeiro de 2017 e julho de 2021;
- Calcular a prevalência em rebanhos de brucelose de pequenos ruminantes na área de intervenção da OPP de Santarém estudo durante o período entre janeiro de 2017 e julho de 2021;
- Descrever os protocolos de colheita e testagem de amostras para pesquisa de Brucelose
- Descrever as explorações positivas a brucelose em pequenos ruminantes;
- Discutir os fatores de risco associados a positividade de brucelose em pequenos ruminantes na OPP de Santarém entre janeiro de 2017 e julho de 2021.

Parte III – Estudo da Brucelose dos Pequenos Ruminantes na área administrativa de Santarém

1. Material e Métodos

As informações aqui apresentadas foram obtidas através do Programa Informático de Saúde Animal (PISA.NET), a partir de arquivos da OPP de Santarém (ACORO), através do Sistema Nacional de Informação e Registo Animal (SNIRA), através dos relatórios enviados pelo LMV com os resultados dos testes serológicos realizados, através de informações recolhidas pelo autor junto do Médico-veterinário que este acompanhou, através de observações feitas pelo autor nas explorações visitadas e recolhidas através de dados disponíveis pela Câmara Municipal de Santarém.

1.1. Critérios de inclusão:

Foram selecionados 55.815 animais durante o período em estudo de 2017 a julho de 2021, com base nos seguintes critérios:

- serem cabras, ovelhas, bodes e carneiros de exploração inscrita na OPP de Santarém;
- todos os animais necessitavam de estar identificados com brinco e ID electrónica
- idade superior a seis meses de vida, pois só a partir desta idade caprinos e ovinos independentemente do sexo estão elegíveis para a colheita de sangue para pesquisa de brucelose.

1.2. Caracterização da área de intervenção da OPP de Santarém e das explorações em estudo

Com base em informação retirada do site da Câmara Municipal de Santarém, foi possível caracterizar a região no que diz respeito a:

- Área geográfica,
- Cursos de água
- Fronteiras terrestres

1.3. Protocolos de colheita e testagem de amostras:

As amostras de sangue utilizadas para testagem de agentes de Brucelose foram colhidas através de um protocolo seguido por todos os Médicos Veterinários Executores, nomeadamente:

1. É feita a contenção física adequada do animal em estação;
2. É realizada uma assépsia do local escolhido (na região da veia jugular) para punção usando algodão embebido em álcool a 70%, na direção do pelo;
3. É realizado um garrote (do lado esquerdo ou do lado direito) e posterior veno-punção na veia jugular localizada no pescoço;
4. As punções são realizadas com uma agulha estéril KRUUSE, de 18G x 1½ de 1,2 x 40mm, usando uma agulha para cada animal;
5. O sangue é colhido para um frasco/copo de colheita descartável com capacidade de 50 a 100mL, em polipropileno com tampa de rosca vedante. A quantidade de sangue colhida é no mínimo 0,5 mL e nunca superior a 2/3 da capacidade do tubo;
6. Posteriormente à colheita de sangue as marcas auriculares com a identificação do animal são lidas com um bastão ligado por Bluetooth ao programa PISA.NET. A identificação é impressa na hora e colada no tubo com o respetivo sangue. Esta identificação contém o número do animal e o número de ordem como exemplificado na tabela 7;
7. Os tubos com os sangues são deixados à temperatura ambiente, com o cuidado de proteger do calor excessivo, até os coágulos se formarem e começaram a retrain. Após serem observados os coágulos as amostras são refrigeradas ($5\pm3^{\circ}\text{C}$) (num prazo máximo de 72 horas após-colheita);
8. Todas as amostras colhidas e identificadas de cada exploração são fechadas num saco de plástico de utilização única e em polipropileno e também identificados como apresentado na tabela 8;
9. As amostras de cada exploração são entregues na ACORO - OPP da Divisão de Intervenção Veterinária do Ribatejo, e posteriormente enviadas para o Laboratório de Medicina Veterinária (LMV), laboratório certificado e aprovado pela DGAV para a realização do Teste de Rosa Bengala e Teste de Fixação de Complemento e consequente diagnóstico de brucelose.

O protocolo de receção de amostras e testagem com o Teste de Rosa Bengala é o seguinte:

1. É preparado o antigénio usando células morta de *B. abortus* S99 ou S1119-3, usadas para centrifugação a 23.000g durante 10 minutos a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ e posteriormente são re-suspensos numa solução salina de fenol estéril (0,5%) a uma taxa de 1g a 22,5 ml. A cada 35mL desta suspensão são adicionados 1ml de rosa bengala a 1% em água purificada estéril. A mistura é agitada durante duas horas à temperatura ambiente. A mistura é depois filtrada usando algodão estéril e centrifugada a 10.000g para depositar células coradas, que se devem apresentar como uma suspensão rosa intensa e um com $\text{pH}=3,65 \pm 0,05$. No final da filtração em algodão, a suspensão é filtrada duas vezes usando um pré-filtro de fibra de vidro Sartorius No. 13430, ajustado para um PCV de aproximadamente 8%;
2. No início de cada dia, um soro de controle que tenha fornecido uma reação positiva mínima é testado antes do início do teste para verificar a sensibilidade e as condições do teste;
3. As amostras de soro e antigénio são levadas à temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$);
4. São colocados 25-30 μl da cada uma das amostras de soro num quadrado da placa de hemoaglutinação da OMS (Organização Mundial de Saúde);
5. O frasco do antigénio é bem agitado e colocado um volume igual de antigénio próximo a cada mancha do soro na placa;
6. Imediatamente após a última gota de antigénio ser colocada na placa, é misturado o soro e o antigénio por completo, usando um vidro limpo para cada teste, até ser produzida uma zona circular com aproximadamente 2cm de diâmetro;
7. A mistura é agitada suavemente durante quatro minutos à temperatura ambiente num agitador tridirecional;
8. É feita a leitura da aglutinação logo após os 4 minutos de ter sido agitada.

Segundo o Decreto-lei nº 244/2000, sempre que o Teste de Rosa Bengala seja positivo é obrigatório a realização do teste de Fixação de Complemento seguindo sempre os seguintes passos:

1. É usada uma placa de microtitulação de 96 poços padrão com fundos redondos (U);

2. Volumes de 25 µl de soro de teste diluído inativado são colocados no poço na primeira, segunda e terceira linha (a primeira linha é um controle anti complementar para cada soro);
3. Volumes de 25 µl de tampão TFC são adicionados aos poços da primeira linha para compensar a falta de antigénio;
4. Volumes de 25 µl de tampão TFC são adicionados a todos os outros poços, exceto os da segunda linha. Diluições de duplicação em série são então transferidas usando volumes de 25 µl de soro da terceira linha em diante; 25 µl da mistura resultante na última linha são descartados;
5. Volumes de 25 µl de antígeno, diluídos até a concentração de trabalho, são adicionados a cada poço, com exceção da primeira linha;
6. Volumes de 25 µl de complemento, diluídos para o número de unidades necessárias, são adicionadas a cada poço;
7. Poços de controle contêm:
 - I. Diluente apenas
 - II. Complemento + diluente
 - III. Antígeno + complemento + diluente

Estes poços são configurados de maneira a obter um volume total de 75 µl em cada caso;

8. As placas são incubadas a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos e um volume 25 µl de SRBCs sensibilizados foi adicionado a cada poço;
9. As placas são incubadas novamente a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos;
10. Os resultados são lidos após as placas terem sido centrifugadas a 1000g por 10 minutos a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

1.4. Cálculo da prevalência individual de Brucelose

O cálculo da prevalência individual anual de Brucelose na OPP de Santarém foi feito a partir da seguinte fórmula:

$$P(\text{ano}) = \frac{N}{T} \times 100$$

Sendo:

P – Prevalência individual (%)

N - Número de animais com resultado positivo ao teste de Rosa Bengala e de Fixação do Complemento no ano respetivo

T – Número total de amostras testadas respetivo ano

1.5. Cálculo da prevalência em rebanho de Brucelose

O cálculo da prevalência em rebanho anual de Brucelose na OPP de Santarém foi feito a partir da seguinte fórmula:

$$P(\text{ano}) = \frac{N}{n} \times 100$$

Sendo:

P – Prevalência em rebanho (%)

N - Número de rebanhos com resultado positivo ao teste de Rosa Bengala e de Fixação do Complemento no ano respetivo

n – Número de rebanhos total

2. Resultados

Caracterização da Zona de Intervenção da OPP Santarém:

O concelho de Santarém está situado no centro do país, na margem direita do rio Tejo, faz fronteira com os concelhos do Cartaxo e de Almeirim a Sul, com os de Porto de Mós, Alcanena e Torres Novas a Norte, a Este com os da Golegã, Chamusca e Alpiarça e a Oeste com os de Rio Maior e Azambuja. Está inserida na província Ribatejana sendo considerada capital de distrito (CMSantarém, 2021)

O concelho apresenta uma área de 56.260 hectares e é parte integrante da NUT II da Lezíria Do Tejo. Registava à data do último Recenseamento Geral da População (XV) e do Recenseamento Geral da Habitação (V) realizado em 2011 um total de 62200 cidadãos residentes (CMSantarém, 2021).

2.2 Prevalência individual de Brucelose

$$P(2018) = \frac{1}{55815} \times 100$$

$$P = 0,0018\%$$

A prevalência individual de brucelose em cabras e ovelhas na área de estudo foi nula nos anos de 2017, 2019, 2020 e até julho de 2021) ou mínima (um animal positivo) no ano de 2018 (Tabela 9) .

O valor da prevalência individual de brucelose durante o período em estudo foi quase insignificante, apresentado o valor para prevalência de 0,0000179163307355. Este valor é um valor muito baixo (um caso positivo em 55.815 testados) o que vem de encontro ao estipulado por DGAV (2019) em que define que em 2024 o valor desta prevalência em todo o território português seja de 0. Este valor é indicativo que na área de intervenção da OPP de Santarém dos PR o PNEB está a ser cumprido e estamos no bom caminho para atingir os objetivos.

2.3. Prevalência em rebanho de Brucelose

$$P(2018) = \frac{1}{327} \times 100$$

$$P = 0,306\%$$

A prevalência em rebanho de Brucelose apenas no ano de 2018 pode ser calculada uma vez que nos anos de 2017, 2019, 2020 e até julho de 2021 não existiram rebanhos positivos e como tal a prevalência será sempre de 0 como descrito na tabela 9.

Apenas no ano de 2018 onde existiu um rebanho com casos positivo (num universo de 327 rebanhos no respetivo ano) e como tal a prevalência em rebanho foi de 0,3058103975535%

2.4. Presença de possíveis fatores de risco na exploração positiva para a ocorrência de brucelose

A exploração onde foi detetado o caso positivo é uma exploração de pequena dimensão e nunca teve mais de nove animais. À data do caso positivo, encontravam-se na exploração cinco animais, quatro fêmeas e um macho, todos eles ovinos de raça Merina. Os animais encontravam-se em regime extensivo, delimitado pela vedação da propriedade com pouco mais de dois hectares sem qualquer tipo de contato com outros efetivos animais.

Relativamente ao histórico de intervenções Médico-veterinárias:

- Teve começo no ano de 2014 aquando da abertura da exploração com cinco animais
- colocação de identificação electrónica e de brinco,
- vacinação com vacina Enterovina e com Biovina S,
- desparasitação com Sinvermin 28,5%
- colheita de sangue para pesquisa de brucelose e classificação sanitária do rebanho.

Passados dois meses foi realizada a reinspecção:

- obtendo no ano seguinte a classificação de B4.

Nos anos de 2015, 2016 e 2017:

- vacinação com vacina Enterovina e com Biovina S,
- desparasitação com Sinvermin 28,5%
- colheita de sangue para pesquisa de brucelose
- Sem nenhuma alteração e manteve-se classificado como B4

No ano de 2018:

- Foram enviados um total de amostras sanguíneas de 5 animais e um resultado foi positivo para brucelose. A exploração desceu na classificação para B4S e posteriormente para B2.1.

No ano de 2019:

- como obrigatório pelo PEBPR foram feitas colheitas de sangue com o período de tempo estipulado, como é possível constatar no Anexo I.

No ano de 2021:

- em junho de 2021 foi realizada a última reinspecção, subindo desta forma para a classificação de B4 uma vez que depois do animal positivo ter sido positivo em nenhum outro momento da colheita de sangue e posterior pesquisa de brucelose foi obtido algum resultado positivo ou duvidoso.

Relativamente há exploração onde o caso positivo de Brucelose foi detetado, os abortos não parecem ter despoletado uma chamada de atenção por parte do produtor. Por ano apenas uma ovelha era posta à cobrição com o carneiro de maneira que apenas houvesse apenas um parto anual na sua exploração, pois não era seu objetivo aumentar o seu efetivo, mas sim renovação dos animais mais velhos.

Por outro lado o proprietário afirma que não teve percepção de nenhum aborto ocorrido na sua exploração e por esse motivo não foi comunicado ao Médico Veterinário responsável pela exploração, uma vez que ao abrigo do Despacho 178/2007 no artigo 7º do DL nº244/2000 de 27 de setembro de 2000 os proprietários são obrigados a notificar o Médico Veterinário de qualquer aborto ovino ou caprino que tenha existido, de forma a que seja aberta uma investigação epidemiológica com colheita de material para a realização do diagnóstico bacteriológico

Por outro lado, alguns fatores podem ser considerados fatores de risco e ter tido influência no resultado positivo do animal em 2018 tais como:

- a não separação de animais doentes (inexistência de local na exploração onde fosse possível fazer a separação dos animais, contudo foi referido pelo produtor que nunca teve um animal doente ou pelo menos que tivesse percepção de qualquer doença);
- não remoção do estrume antes das épocas de partos (na exploração não existia qualquer tipo de remoção de estrume);

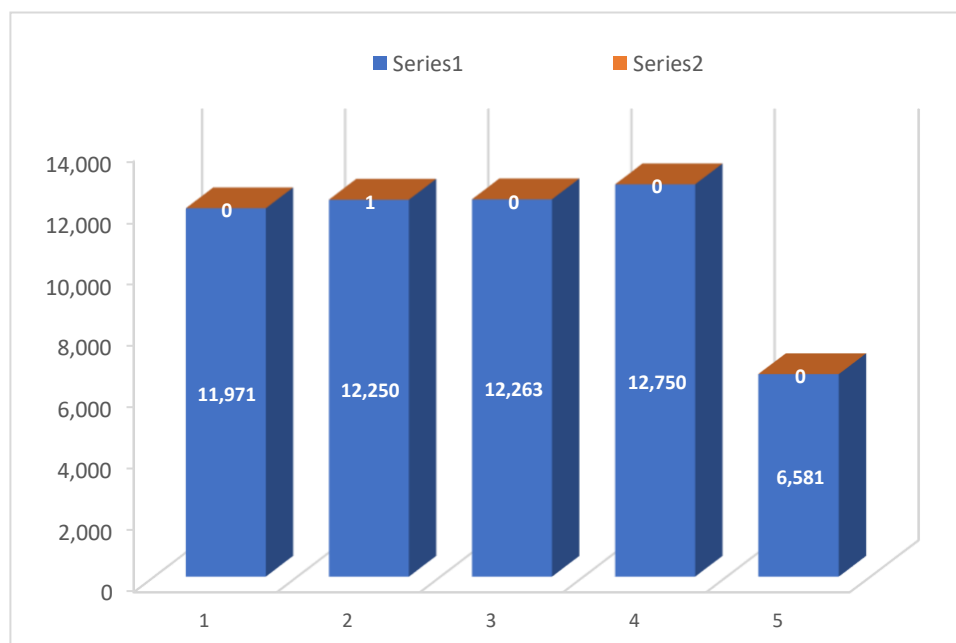
- não remoção eficaz da placenta ou enterro da mesma (uma vez que só havia um parto anual, com exceção do ano de 2019 em que ocorreram dois partos, na sua exploração o proprietário afirma todos os partos ocorridos foram sem ajuda ou supervisão e que nunca removeu membranas placentárias do seu terreno);
- não enterrar fetos abortados, nados mortos e descendentes inviáveis (neste caso revelou-se ser um fator pouco importante uma vez que o produtor afirmou que durante os anos todos nunca teve um aborto ocorrido na sua exploração);

O inquérito epidemiológico foi realizado, contudo não houve um fator chave que fosse identificado como crucial para a presença da doença no animal, mas houve um fator que apesar de não ter sido provado e ser pouco provável de acontecer pode ter tido influência:

- Passagem de responsabilidade da gestão do rebanho para os filhos, em particular para uma filha, após a morte do pai em 2016. A ocupação principal desta pessoa incluía contacto com peles de ovinos, caprinos, bovinos e outras espécies animais

Rastreios

Tabela 6: Número de animais testados e número de animais positivos no ano de 2017, 2018, 2019, 2020 e até julho de 2021



Legenda: 1 – 2017; 2 – 2018; 3 – 2019; 4 – 2020; 5 – até julho 2021.

Serie 1- Número animais testados
Serie 2 - Número de animais positivos

Tabela 7: Prevalência individual e de exploração de Brucelose dos Pequenos Ruminantes na OPP de Santarém entre janeiro de 2017 e julho de 2021

Brucelose PR	2017	2018	2019	2020	2021
Nº de explorações/rebanhos testadas	300	327	355	321	155
Nº de explorações/rebanhos positivas	0	1	0	0	0
% de explorações/rebanhos positivas	0%	0,305%	0%	0%	0%
Nº de animais testados serologicamente	11 971	12 250	12 263	12 750	6 581
Nº de animais positivos	0	1	0	0	0

% de animais positivos	0%	0,0082%	0%	0%	0%
Nº de animais abatidos	0	1	0	0	0

3. Discussão e Conclusão

Este estudo analisou a população total de animais com mais de seis meses de idade pertencentes à totalidade de explorações inscritas na OPP de Santarém. o que permitiu avaliar a prevalência de Brucelose dos Pequenos Ruminantes na área intervencionada pela OPP de Santarém. No entanto é importante realçar que existe a possibilidade de haver animais que não se encontram inscritos nem registados nesta área de intervenção, possibilidade essa que é de difícil negação neste estudo, pois depende da seriedade de todos os intervenientes que possuem animais.

Existe a possibilidade de proprietários não registarem nem realizarem a sanidade obrigatória nos seus pequenos ruminantes quando se destinam a consumo interno. Esta possibilidade é um fator de risco de transmissão de brucelose, uma vez que estes animais, se positivos, não são identificados e eliminados, e mantêm a infeção nesse efetivo e potencialmente em efetivos vizinhos.

A região administrativa da DGAV de Santarém e a DSAVRLVT não constituem uma zona problemática do país. De momento, apenas a região Norte do País, abrangida pela DSAVN, é considerada problemática pois apresenta uma prevalência de rebanho de 2,25%. Em todas as restantes regiões do país, a prevalência é inferior a 1% e especificamente a DSAVLVT apresenta uma prevalência de 0,37%) relativamente à brucelose e por esse motivo não são administradas vacinas em animais jovens com Rev-1. casona região da DSAVRN, a vacinação é obrigatória de maneira a tentar controlar a disseminação e reduzir a prevalência da doença, não só a nível individual como de rebanho, como está estipulado no PEBPR e como é referido pela DGAV (2019).

Na duração deste estudo, as prevalências obtidas foram 0% em todos os anos, com exceção do ano de 2018 em que, de todos os animais testados, apenas um animal testou positivo para Brucelose quando realizado o TRB e confirmado por TFC. Todos estes resultados são muito inferiores não só aos valores nacionais, mas também aos valores

Regionais (Direção de Serviços de Alimentação e Veterinária da Região de Lisboa e Vale do Tejo – DSVAVLVT), como é afirmado pela DGAV (2019).

Como foi possível observar no ano de 2017, 2019, 2020 e 2021 a prevalência individual de brucelose em cabras e ovelhas na área de intervenção da OPP de Santarém foi nula, o que contrasta com os dados relativos à Direção de Serviços de Alimentação e Veterinária na região onde esta OPP está inserida (Região de Lisboa e Vale do Tejo) em que a prevalência de brucelose foi de 0.37% no último ano em que estão disponíveis os resultados.

De acordo com um estudo realizado por Cunha (2015) onde foram realizadas colheitas de sangue para posterior análise serológica para pesquisa de brucelose em PR na área de intervenção da OPP Monção Melgaço a prevalência individual de brucelose foi de 0,008% no ano do estudo, o que se assemelha ao estudo realizado pelo autor em que a prevalência apenas foi superior a 0 no ano 2018 (0.0082%). Tanto a área de estudo realizada por Cunha (2015) (DSVRN, que é uma zona crítica e onde está implementado o PEBPR com vacinação com Rev-1) como a área onde incidiu o presente estudo apresentam resultados abaixo de um ponto percentual. Isto mostra a eficácia do PEBPR em que mesmo em zonas problemáticas existem áreas em que a disseminação da doença e a sua prevalência estão a ser controladas e têm decrescido de ano para ano, encaminhando-se desta forma para a tentativa de erradicação da doença em Portugal estipulada para 2021.

Por outro lado, outro estudo realizado por Fernandes (2012) realizado em Vila Real refere que apesar dos esforços nunca foi possível nesta região atingir um valor menor que 1,5% de prevalência de brucelose em rebanhos. A região administrativa da DAV de Vila Real ainda se mantém uma zona problemática do país no que diz respeito ao controlo de brucelose). Tudo isto demonstra que a área abrangida pela OPP Santarém se encontra no bom caminho para a erradicação da doença e a cumprir os requisitos do PEBPR.

Isto pode ser explicado devido às diferenças dos tamanhos e regimes dos rebanhos usados na DSVAVLVT (onde incidiu o presente estudo) e na DSVAN (área onde foi realizado estudo por Fernandes (2012), uma vez que na região Norte é comum o uso de pastagens comuns, de caminhos e águas comuns e onde existe contacto entre diferentes rebanhos com frequência, o que não se aplica tanto na região de Lisboa e Vale do Tejo onde esse

regime de pastoreio não é tanto usado e onde animais de diferentes rebanhos raramente tem contato.

McDermott & Arimi (2002) afirmam que a prevalência elevada de brucelose está intimamente relacionada com o tamanho dos rebanhos; quanto maiores os rebanhos, maior a probabilidade de a prevalência de brucelose ser superior a 0%, o que vai de encontro com o estudo apresentado pelo autor, uma vez que esta zona em estudo é maioritariamente composta por rebanho de pequena dimensão e esse motivo pode ser mais um dos motivos para a prevalência de brucelose neste estudo ser inferior à média nacional.

Castelo e Simões (2019) afirmam que a auto-substituição de animais por parte do produtor e a substituição de animais jovens fêmeas não vacinadas com a vacina Rev-1, a existência de rebanhos vizinhos não indemnes, a existência de rebanhos mix, ou seja, rebanhos de cabras e ovelhas sem separação, assim como mais de 50% dos partos ocorrerem em caminho/pastagens comuns podem aumentar o risco de infeção de brucelose nos PR e são considerados por isso fatores de risco. Porém, na exploração que testou positivo, o efetivo era apenas constituído por ovinos, manteve-se constante não tendo sido adquiridos animais de outras explorações desde 2014, todos os rebanhos vizinhos estavam indemnes ou oficialmente indemnes brucelose (estatuto sanitário B3 e B4, respetivamente, finalmente; os animais desta exploração encontravam-se estabulados e não tinham acesso a nenhum tipo de pastagem ou caminho comum partilhado por qualquer outro tipo de animal.

Radostits e colaboradores (2001) afirmaram que também os partos são situações propícias para disseminação de Brucelose no meio ambiente, isto porque as matérias resultantes de partos ou abortos têm uma grande carga bacteriana de *Brucella* spp., materiais como placentas ou fetos inviáveis e corrimentos uterinos.

Como DGAV (2013) afirma esta área não é problemática e por esse motivo os animais não são vacinados, contudo segundo Minas (2006) uma vez que estes animais não são vacinados todos esses estão suscetíveis à doença e aumentando assim a possibilidade da sua disseminação.

Após a morte do proprietário a gestão do rebanho e da propriedade passou para a filha. Os animais inscritos na sua marca de exploração mantiveram-se no mesmo local (numa

propriedade fechada e junto há habitação, usando os animais quase exclusivamente para “limpeza de terreno”).

Por falta de conhecimento e experiência no manejo dos animais por parte da filha a manejo dos animais manteve-se inalterado. Por outro lado, existe uma mínima possibilidade de a transmissão de brucelose ter sido feita através do couro de animais na fábrica onde a herdeira trabalhava, contudo não existem estudos científicos que provem a veracidade deste facto.

O animal abatido foi um ovino de dois anos de idade, nascido dentro da exploração e filho de dois animais pertencentes à exploração. Aquando da colheita de sangue para a pesquisa de Brucelose este animal não apresentava sintomatologia compatível com infeção por *Brucella* spp. nem qualquer tipo de sinal clínico que diferencia de um estado de homeostase.

Por outro lado, não devemos descartar a possibilidade de este animal ser um falso positivo. Apesar do animal ter testado positivo para o teste de Rosa Bengala e posteriormente ter testado positivo para o teste de confirmação (Teste de Fixação do Complemento) esta possibilidade não deve ser posta de lado. Isto deve-se ao facto de todos os animais, com exceção do macho, se encontrarem a coabitar juntos, partilharem o mesmo bebedouro, o mesmo pasto, estarem sempre em contacto directo e nenhum dos outros animais apresentou qualquer tipo de sinal clínico nem testou positivo ou duvidoso no despiste de brucelose.

Era de esperar que se fosse um “real positivo” outros animais da mesma exploração testassem positivo nos testes de rastreio, o que não aconteceu e desde esse caso isolado no ano de 2018 até a actualidade a exploração não teve nenhum outro caso positivo.

A reacção de falso positivo pode acontecer devido a diversas situações entre as quais se for realizado em unidade epidemiológicas onde os animais foram vacinados com a vacina viva Rev-1, independentemente de como foi feita a vacinação (dose e via), é esperado que reacções falso positivo aconteçam. Para além deste facto um grande número de bactérias, em especial *Yersinia enterocolitica* O: 9 quando presente no animal irá induzir uma resposta de anticorpos que causam reacções de falso positivo quando realizado o teste serológico FC. (OIE, 2016). A Presença desta bactéria no animal positivo poderia ser um facto, uma vez que não há despiste para a presença ou não de bactérias concomitantes aquando da positividade do TRB e do TFC, impedindo assim um diagnóstico serológico

positivo preciso.

Uma série de fatores afetam a escolha do método: a atividade anticomplementar em amostras de soro de baixa qualidade é mais evidente com a fixação a frio, enquanto a fixação a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ aumenta a frequência e intensidade das prozonas, e várias diluições devem ser testado para cada amostra.

Por outro lado alguns factores podem ter influenciado o resultado positivo , podendo deste modo ter sido um falso-positivo, factores esses tais como : a presença de bactérias de *Brucella* de espécies diferentes que não a espécie *B. melitensis* (apesar de ser uma situação rara); aquando do uso do reagente este possuir partículas ressequidas que podem levar a uma reação de falso positivo, o não congelamento de nenhum dos componentes; ter havido uma rápida rotação das laminas que causará rutura das ligações entre os AC da amostra e as partículas de latex; o reaproveitamento de materiais tais como ponteiras plásticas de micropipetador (que devem ser descartadas entre cada amostra para não haver reações cruzadas); a não homogeneização energética da suspensão; a não verificação da ocorrência do fenómeno prozona (que deve ser sempre verificado, pois a ocorrência deste fenómeno leva a resultados falso-positivos); a possibilidade de ter existido contaminação química ou microbiana no momento da abertura dos componentes, uma vez que após a abertura dos mesmos estes tornam-se susceptíveis a contaminações; a utilização de material com validade fora do previsto, material contaminado ou realizado em condições inadequadas; a não espera que os materiais atingiam a temperatura ambiente no momento do seu uso; a não utilização de controlos fornecimentos pelo kit de teste RB e FC; ter existido um tempo insuficiente ou demasiado tempo no momento da agitação da lâmina; a não utilização ou reaproveitamento das lâminas previamente fornecidas pelo kit e ainda uma interpretação incorreta ou inequívoca dos resultados pode ter acontecido (Young, 1997).

Em jeito de conclusão, podemos verificar que na área em estudo o PEBPR tem sido cumprido e por isso a OPP está a progredir para o objetivo da erradicação de brucelose, contudo outras áreas como as do Norte ainda estão a mais longe da erradicação da doença e é necessário que todos os intervenientes, incluindo proprietários, Médicos-veterinários, OPP e DSAV continuem a manter os esforços.

Teoricamente, de maneira geral as OPP cumprem os programas sanitários, contudo alguns fatores tais como o acompanhamento às brigadas das OPP feito por delegações da DGAV, visitas mais recorrentes do médico-veterinário, medidas de biossegurança podem ser

melhoradas (começando pelos Médicos-veterinários que devem por exemplo usar botas diferentes para cada exploração ou lavá-las e desinfetá-las entre explorações), mas também a sensibilização dos proprietários para o problema da brucelose e a necessidade também dos produtores serem instruídos relativamente a como minimizar e evitar a possibilidade da disseminação da doença, cumprindo sempre o PEBPR, podem ser melhorados para se conseguir atingir o objetivo.

O sucesso na erradicação da brucelose dos pequenos ruminantes assenta em grande parte na formação dos produtores para que tenham real noção do problema que é a brucelose, não só a nível económico para os próprios, mas sendo uma doença de declaração obrigatória é igualmente um problema de saúde pública.

Como sugestão seria útil realizar um inquérito que avaliasse o conhecimento dos produtores relativamente à doença e dessa maneira serem detetadas falhas de informação e comunicação que possam estar a ocorrer.

Podemos então concluir que o sucesso da erradicação depende da correta aplicação do PEBPR, com um bom sistema de vigilância com colaboração e trocas de informações entre os sectores veterinários e de saúde pública e uma partilha de informação aberta entre Médicos-veterinários, OPP e produtores.

Como principal limitação deste estudo encontramos a possibilidade de existirem animais que se encontrem na DSVLVT, mas que não estejam inscritos em nenhuma OPP e por essa razão esse animais nunca terão sido submetidos a sanidade animal obrigatória e consequente pesquisa de Brucelose.

Concluimos que na área em estudo a prevalência individual de brucelose nos anos de 2017, 2018, 2019, 2020 e até julho de 2021 foi quase sempre nula o que demonstra que a região administrativa da OPP de Santarém está em cumprimento do PEBPR e que está a caminhar em direção à sua erradicação, que apenas se atingirá se todos os intervenientes colaborarem juntos.

Bibliografia

1. Adams G., Davis D., Ficht T., Kopec J., Templeton J., Williams J. (1990) *Brucella abortus* in captive Bison. Serology, Bacteriology, Pathogenesis and Transmission to Cattle. *Journal of Wildlife Diseases*: Vol 26 No. 3: 360-371. Akira, S. 2006. TLR Signaling. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 311: 1-16
2. Albiger, B., Dahlberg, S., Henriques-Normark, B., & Normark, S. (2007). Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: Focus on the Toll-like receptors. *Journal of Internal Medicine*, 261(6), 511–528.
3. Alton. G.; Jones.M.; Angus, D. 1988. Techniques for the Brucellosis Laboratory. Paris: INRA
4. Alton, G. 1990 "*Brucella suis*" In Animal Brucellosis, edited by Inc. Florida, Eds. Nielsen and Duncan. CRC Press p.411-422
5. Almeida, T. (2009). *A Última Década no Centro Hospitalar da Cova da Beira, E.P.E.*
6. Araj, G. F. (2010). Update on laboratory diagnosis of human brucellosis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2010, 12–17. Acedido em 4 de maio de 2021 em: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.06.014>
7. Baigún R, Conigliaro AS & Luna F. Aislamiento de *Brucella ovis* y control de reaccionantes serológicos en epididimitis ovina. *Vet. Arg.*, 2000, 17:103-107.
8. Banai, M., & Corbel, M. (2010). Taxonomy of *Brucella*. *The Open Veterinary Science Journal*, 4(1), 85–101. <https://doi.org/10.2174/1874318801004010085>
9. Billard, E., Dornand, J., & Gross, A. (2007). Interaction of *Brucella suis* and *Brucella abortus* rough strains with human dendritic cells. *Infection and Immunity*, 75(12), 5916–5923. Acedido a 12 de Junho de 2021 em: <https://doi.org/10.1128/IAI.00931-07>
10. Blasco, J. M. (2010). Control and eradication strategies for *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. *Prilozi, Sec. Biol. Med. Sci*, 165,31(1), 145–165. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2010.10.003>
11. Borel, N., Frey, F., Gottsteins, B., Hilbe, M., Pospischil, A., Franzoso, D., & Waldvogel, A. (2014). Laboratory diagnosis of ruminant abortion in Europe. *Zurich Open Repository and Archive, University of Zurich*, 200, 218–229.
12. Carvalho Júnior, C. A., Moustacas, V. S., Xavier, M. N., Costa, E. A., Costa, L. F., Silva, T. M. A., Paixão, T. A., Borges, A. M., Gouveia, A. M. G., & Santos, R. L. (2012). Andrological, pathologic, morphometric, and ultrasonographic

- findings in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. *Small Ruminant Research*, 102(2–3), 213–222. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.08.004>
13. Castelo, C., & Simões, J. (2019). Risk factors of brucellosis (re-)incidence in sheep and goat flocks in an endemic area of Portugal. *Tropical Animal Health and Production*, 51(2), 487–490. Acedido em 12 Junho de 2021 em: <https://doi.org/10.1007/s11250-018-1706-4>
 14. Castaño, M. J., Navarro, E., & Solera, J. S. (2016). *International Encyclopedia of Public Health* (Vol. 1). (2nd ed.). Academic Press
 15. Castro, H. A., González, S. R., & Prat, M. I. (2005). Brucelosis: una revisión práctica. *Acta Bioquímica Clínica Latino Americana Vol 39 n 2*, 203–216. Acedido em 13 de Maio de 2021 em <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=53539208>
 16. Coelho, A., García Díez, J., & Coelho, A. C. (2014). Brucelosis en pequeños rumiantes: Etiología, epidemiología, sintomatología, diagnóstico, prevención y control. *Revista Electronica de Veterinaria*, 15(5), 553–561.
 17. Coelho, A.M., de Lurdes Pinto, M., García-Díez, J., Coelho, A.C., 2015b. Impact of *B. melitensis* Rev-1 vaccination on brucellosis prevalence. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 39, 261–270.
 18. Corbel, M. J. (1997). Brucellosis: An Overview. *Emerging Infectious Diseases*, 3(2), 213–221. Acedido a 15 maio de 2021 em <https://doi.org/10.3201/eid0302.970219>
 19. Corbel, M. J. (2006). Brucellosis in humans and animals. In *WHO, OIE Library catalogue in publication Data*.
 20. Cordero del Campillo, M., 1968. Sobre la Epizootología y Profilaxis de la Brucelosis Ovina.
 21. Crespo León, F. (1994). INFLUENCIA DE LOS ELEMENTOS Y FACTORES BRUCELOSIS DEL GANADO OVINO Y CAPRINO. *Papeles de Geografía*, 6, 189–209.
 22. Dahouk, S. Al, Sprague, L. D., & Neubauer, H. (2013). New developments in the diagnostic procedures for zoonotic brucellosis in humans. Isolation of brucellae from blood and tissues. *Revue Scientifique et Technique de l'OIEv.*, 32(1), 177–188.
 23. Decreto-Lei nº 24422000 de 27 de Setembro de 2000

24. Den Hartigh, A.B., Paixão T.A., Santos R.L., Tsolis R.M., Xavier M.N. Pathogenesis of *Brucella* spp. *The Open Veterinary Science Journal*, 4, 2010: 109-118.
25. Ferreira WF, Sousa JC. Microbiologia. LIDEL, 2000. (vol. 2) 1º edição
26. Ficht, T. (2010). *Brucella* taxonomy and evolution. *Future Microbiology*, 5(6), 859–866. Acedido a 10 de Maio de 2021 em: <https://doi.org/10.2217/fmb.10.52>
27. European Commission. (2001). *Brucellosis in Sheep and Goats (Brucella melitensis)* (No. SANCO C.2/AH /R23/2001). DG(SANCO)/7247/2004.
28. Garin-Bastuji, B., Blasco, J. M., Marín, C., & Albert, D. (2006). The diagnosis of brucellosis in sheep and goats, old and new tools. *Small Ruminant Research*, 62(1-2 SPEC. ISS.) Keynote Lectures of the 6th International Sheep Veterinary Congress, 63–70. Acedido a 10 maio de 2021 em: <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.08.004>
29. Gillespie, S. H., & Hawkey, P. M. (2006). Principles and Practice of Clinical Bacteriology: Second Edition. In *Principles and Practice of Clinical Bacteriology: Second Edition*.
30. Godfroid, J., Cloeckaert, A., Liautard, J.-P., Kohler, S., Fretin, D., Walravens, K., Garin-Bastuji, B., & Letesson, J.-J. (2005). From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Veterinary Research*, 36, 313–326
31. Goldbaum, F. A., Leoni, J., Wallach, J. C., & Fossati, C. A. (1993). Characterization of an 18-Kilodalton *Brucella* Cytoplasmic Protein Which Appears To Be a Serological Marker of Active Infection of Both Human and Bovine Brucellosis. *Journal Of Clinical Microbiology*, 31(8), 2141–2145.
32. Gracia, R C, Zarain, P L e Laguna, Y M. (2006) Mecanismos de Patogenicidad e Interacción: Parásito-Hospedero II. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla: BUAP
33. Grilló, M.-J., & Blasco, J. M. (1997). Transmission of *Brucella melitensis* from sheep to lambs. *Veterinary Record*, 140, 602–605.
34. Gul, S., & Khan, A. (2007). Epidemiology and Epizootology of Brucellosis: a Review. *Pakistan Veterinary Journal*, 27(3), 145–151.
35. Kaltungo, B., Saidu, S., Musa, I., & Baba, A. (2014). Brucellosis: A Neglected Zoonosis. *British Microbiology Research Journal*, 4(12), 1551–1574. Acedido a 10 maio de 2021 em: <https://doi.org/10.9734/bmrj/2014/11061>

36. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 6th edition. OIE, Paris 2008 (p. 1343)
37. Mainar-Jaime, R., & Vázquez-Boland, J. (1999). Associations of veterinary services and farmer characteristics with the prevalences of brucellosis and border disease in small ruminants in Spain. *Preventive Veterinary Medicine, January*, 193–205.
38. Marín, C. M., Moreno, E., Moriyón, I., Díaz, R., & Blasco, J. M. (1999). Performance of competitive and indirect enzyme-linked immunosorbent assays, gel immunoprecipitation with native hapten polysaccharide, and standard serological tests in diagnosis of sheep brucellosis. *American Society for Microbiology- Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 6(2), 269–272.
39. Maurin, M. (2005). La brucellose à l'aube du 21^e siècle. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 6–16.
40. McDermott, J.J., Arimi, S.M., 2002. Brucellosis in sub-Saharan Africa: epidemiology, control and impact. *Vet. Microbiol., Brucellosis S.I.* 90, 111–134.
41. McGiven, J. A., Tucker, J. D., Perrett, L. L., Stack, J. A., Brew, S. D., & MacMillan, A. P. (2003). Validation of FPA and cELISA for the detection of antibodies to *Brucella abortus* in cattle sera and comparison to SAT, CFT, and iELISA. *Journal of Immunological Methods*, 278(1–2), 171–178.
42. Megersa, B., Biffa, D., Niguse, F., Rufael, T., Asmare, K., & Skjerve, E. (2011). Cattle brucellosis in traditional livestock husbandry practice in Southern and Eastern Ethiopia, and its zoonotic implication. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 1–8.
43. Minas, A., 2006. Control and eradication of brucellosis in small ruminants. *Small Rumin. Res., Keynote Lectures of the 6th International Sheep Veterinary Congress* 62, 101–107.
44. Moreno, E., Stackebrandt, E., Dorsch, M., Wolters, J., Busch, M., & Mayer, H. (1990). *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria. *Journal of Bacteriology*, 172(7), 3569–3576. Aceido a 22 de Maio de 2021 em: <https://doi.org/10.1128/jb.172.7.3569-3576.1990>
45. Moreno, Edgardo. (2014). Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. *Frontiers in Microbiology*, 5(MAY), 1–18.
46. Moreno, Edgardo, Cloeckert, A., & Moriyón, I. (2002). *Brucella* evolution and

- taxonomy. *Veterinary Microbiology*, 90(1–4), 209–227.
47. N. Xavier, M., A. Paixao, T., B. den Hartigh, A., M. Tsolis, R., & L. Santos, R. (2010). Pathogenesis of *Brucella* spp. *The Open Veterinary Science Journal*, 4(1), 109–118. <https://doi.org/10.2174/1874318801004010109>
 48. Nicoletti, P. (2010). BRUCELLOSIS: PAST, PRESENT AND FUTURE. *College of Veterinary Medicine, University of Florida, Gainesville; FL, USA*, 32(Brucellosis: past, present and future), 21–32.
 49. Nicoletti, Paul. (2002). A short history of brucellosis. *Veterinary Microbiology*, 90(1–4), 5–9. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00209-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00209-2)
 50. OIE., (2018). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2018. 2.1.4. Version adopted in May 2016.
 51. Olsen, S. C. (2013). Recent developments in livestock and wildlife brucellosis vaccination. *Bacterial Diseases of Livestock Research Unit, National Animal Disease Center, Rev.sci.tech.Off.int.Epi* 32(1), 207–217. Acedido a 11 de Junho de 2021 em: <https://doi.org/10.20506/rst.32.1.2201>
 52. Paulin, L. M., & Neto, J. S. F. (2002). Artigo de revisão. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 105–112.
 53. Pessegueiro, P., Barata, C., & Correia, J. (2003). Brucelose – uma revisão sistematizada. *Medicina Interna*, 10(2), 91–100.
 54. Poester, F., Figueiredo, V. C. F., Lôbo, J. R., Gonçalves, V. S. P., Lage, A. P., Roxo, E., Mota, P. C., Muller, E. E., & Ferreira Neto, J. S. (2009). Estudos de prevalência da brucelose bovina no âmbito do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose: Introdução. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 61, 1–5.
 55. Poester, Fernando, Nielsen, K., Samartino, L. E., & Yu, W. L. (2010). Diagnosis of Brucellosis. *The Open Veterinary Science Journal*, 4, 46–60.
 56. Protásio, S. (2015). *Tipagem Molecular de Estirpes de Brucella spp.*
 57. Racloz, V., Schelling, E., Chitnis, N., Tropical, S., & Zinsstag, J. (2013). Persistence of brucellosis in pastoral systems. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 61–70.
 58. Radostits, O. M., Gay, C. C., Hinchcliff, K. W., & Constable, P. D. (2007). *Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats* (10th ed.). Saunders Ltd.
 59. Ramos, A., Mies, A., Schenck, J., Vasconcellos, L., Prado, O., Fernandes, J., &

- Blobel, H. (1966). *Epididimite ovina. Levantamento clínico no Rio Grande do Sul*. 211–213.
60. Robinson, A. (2003). *Guidelines for coordinated human and animal brucellosis surveillance*. FAO ANIMAL PRODUCTION AND HEALTH PAPER.
 61. Rossetti, C. A., Arenas-Gamboa, A. M., & Maurizio, E. (2017). Caprine brucellosis: A historically neglected disease with significant impact on public health. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(8), 1–17. Acedido a 14 maio de 2021 em : <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005692>
 62. Saavedra, M. J., Ballem, A., Queiroga, C., & Fernandes, C. (2019). Etiology: the Genus *Brucella*. In *Nova Science Publishers, Inc. New York*.
 63. SANCO. (2009). Working Document on Eradication of Bovine, Sheep and Goats Brucellosis in the EU accepted by the "Bovine" and "sheep and Goats" Brucellosis subgroups of the Task Force on Monitoring animal disease eradication
 64. Saxena, N., Singh, B. B., & Saxena, H. M. (2018). Brucellosis in Sheep and Goats and its Serodiagnosis and Epidemiology. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(1), 1848–1877.
 65. Shevtsov, A., Tarlykov, P., Zholdybayeva, E., Shevtsova, E., Momynkulov, D., Sytnik, I., & Karibaev, T. (2013). *Draft Genome Sequence of the Live Vaccine Strain Brucella abortus* 82. 1(6). <https://doi.org/10.1128/genomeA.01101-13>.
 66. Spickler, A. R. (2009a). *Brucellosis*. Iowa: Center for Food Security and Public Health. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.701.225>
 67. Spickler, A. R. (2009b). *Ovine and Caprine Brucellosis: Brucella melitensis*. Iowa: Center for Food Security and Public Health.
 68. Souza, F. (2009). *DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA RESIDUAL DE UMA CEPA MUTANTE DE Brucella abortus*.
 69. Verger, J. M., Grimont, F., Grimont, P. A. D., & Grayon, M. (1985). *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 35(3), 292–295. Aceido a 12 março de 2021 em : <https://doi.org/10.1099/00207713-35-3-292>
 70. Vicente, A. F., Antunes, J. M. A. P., Lara, G. H. B., Mioni, M. S. R., Allendorf, S. D., Peres, M. G., Appolinário, C. M., Listoni, F. J. P., Ribeiro, M. G., & Megid, J. (2014). Evaluation of three formulations of culture media for isolation of *Brucella* spp. regarding their ability to inhibit the growth of contaminating organisms. *BioMed Research International*, 20.

71. Wattam, A. R., Williams, K. P., Snyder, E. E., Almeida, N. F., Shukla, M., Dickerman, A. W., Crasta, O. R., Kenyon, R., Lu, J., Shallom, J. M., Yoo, H., Ficht, T. A., Tsolis, R. M., Munk, C., Tapia, R., Han, C. S., Detter, J. C., Bruce, D., Brettin, T. S., ... Boyle, S. M. (2009). Analysis of Ten *Brucella* Genomes Reveals Evidence for Horizontal Gene Transfer Despite a Preferred Intracellular Lifestyle. *Journal of Bacteriology*, 191(11), 3569–3579.
- Acedido a 22 maio de 2021 em : <https://doi.org/10.1128/JB.01767-08>
72. Xavier, M. N., Costa, É. A., Paixão, T. A., & Santos, R. L. (2009). The genus *Brucella* and clinical manifestations of brucellosis. *Ciência Rural*, 39(7), 2252–2260. Acedido a 5 de março de 2021 em: <https://doi.org/10.1590/s0103-84782009005000167>
2. Young, D. S. (1997). Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests. *Annals of Clinical Biochemistry*, 34(6), 579–581. <https://doi.org/10.1177/000456329703400601>
- 1.
 2. Young J. (2005) Principles and Practices of Clinical Bacteriology. In: Gillespie S., Hawkey P., eds. *Brucella spp.* 2^a ed. Wiltshire, England: Anthony Rowe ltd,: 265-268.

Anexos

Anexo 1 -

Classificação Sanitária dos Rebanhos

Segundo a diretiva 91/68/CEE presente no Decreto de Lei nº 244/2000 de 27 de setembro, atualmente as classificações sanitárias de caprinos e/ou ovinos no âmbito do PEBPR são as seguintes:

B2 – Não indemne de Brucelose

B2.1 – Efetivo infetado onde foi isolado e identificado bactérias do género *Brucella* spp.

B3 – Indemne de Brucelose

B3 S – Indemne de Brucelose suspenso

B4 – Oficialmente indemne de Brucelose

B4 S – Oficialmente indemne de Brucelose suspenso

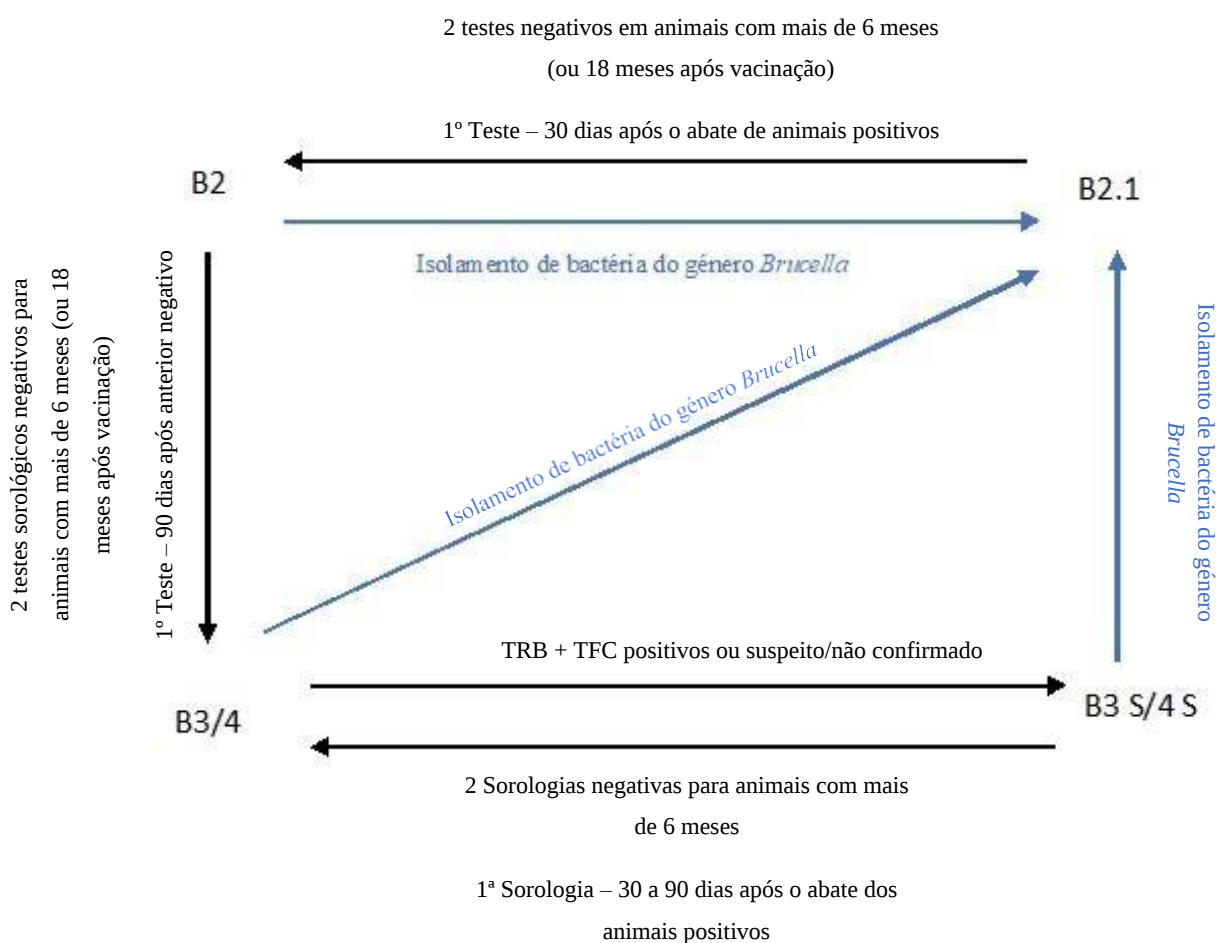


Figura 1: Esquema de obtenção, manutenção e subida de estatutos sanitários dos efetivos (adaptado DGAV 2019)

Efetivo B2 – Efetivo ovino e/ou caprino não indemne brucelose

Um efetivo é considerado não indemne de brucelose quando:

- Não reúne condições para obtenção de estatuto oficialmente indemne (B4) ou indemne (B3);
- Sempre que existam resultados serológicos positivos, em controlos com intervalo de 3 meses, a todos os animais com mais de 6 meses, mesmo que não tenha sido isolado o agente;
- O PEBPR não esteja a ser cumprido.

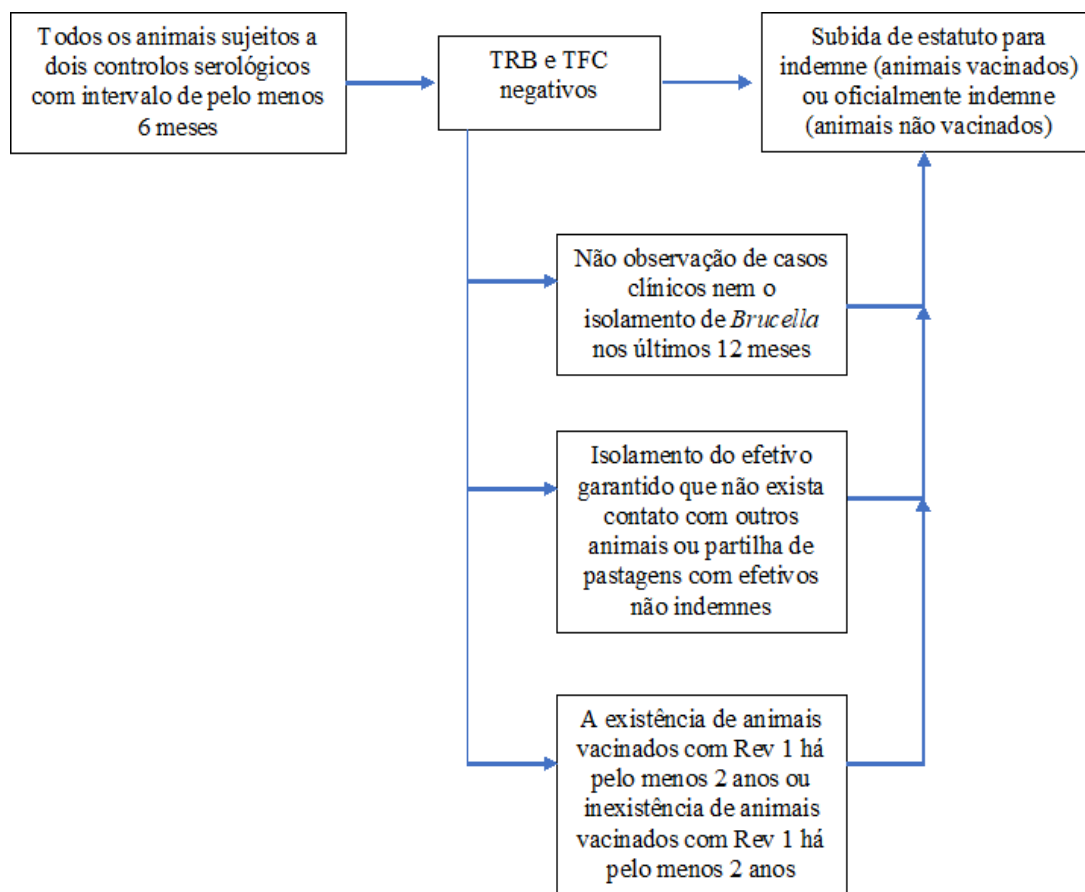


Figura 2: Fluxograma para subida de estatuto não indemne (B2) para estatuto indemne ou oficialmente indemne (Adaptado DGAV 2019)

Efetivos B2.1 – Efetivo ovino e/ou caprino com isolamento e identificação de *Brucella*

Nestes efetivos deverão ser realizados os seguintes passos:

- A realização de um inquérito epidemiológico no efetivo infetado, no prazo máximo de 14 dias, onde devem ser referidos os principais fatores de risco que possam estar na origem da infeção;
- A exploração é colocada sob sequestro sanitário, com notificação oficial do proprietário. O sequestro só acaba quando o efetivo estiver oficialmente livre da brucelose, ou seja, quando a exploração atingir a classificação B3 ou B4;
- Deve haver interdição de movimento de todas as espécies animais que possam ser suscetíveis a infeção por *Brucella* spp. (para dentro ou para fora da exploração), com exceção de animais que vão para abate sanitário;
- Todos os animais que tenham estado em contato com animais desta exploração, ou explorações contíguas, são consideradas suspeitas e a totalidade desses efetivos é submetido a controlo de testes oficiais (TRB e TFC) no prazo máximo de 30 dias.

Para efeitos de subida de estatuto o controlo serológico deve ser realizado segundo este esquema:

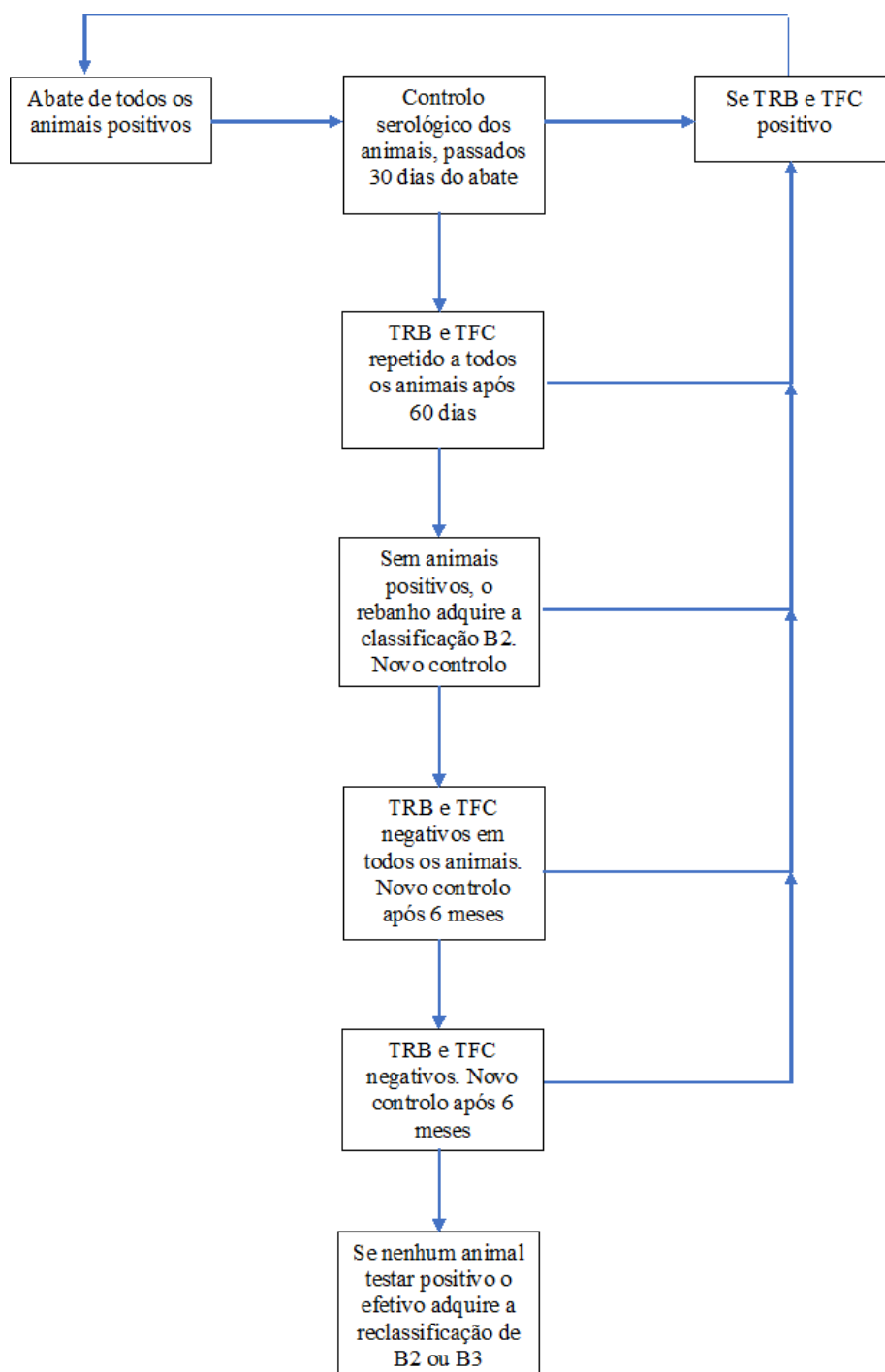


Figura 3: Fluxograma para erradicação de Brucelose em efetivos B2.1 (Adaptado DGAV 2019)

Efetivos B3 e B4 – Efetivo ovino e/ou caprino indemne de brucelose e oficialmente indemne de brucelose respetivamente

Nestes efetivos é realizado um controlo anual à totalidade dos animais do rebanho, com mais de 6 meses de idade. São considerados B3 ou B4 todos os efetivos que apresentem resultados negativos no TRB e TFC, descendo de escalão para B3 S ou B4 S sempre que algum dos animais se apresente positivo nos testes realizados.

A existência de animais vacinados com Rev 1 há pelo menos 2 anos (B3) ou inexistência de animais vacinados com Rev 1 há pelo menos 2 anos (B4) é o que diferencia a classificação de B3 e B4.

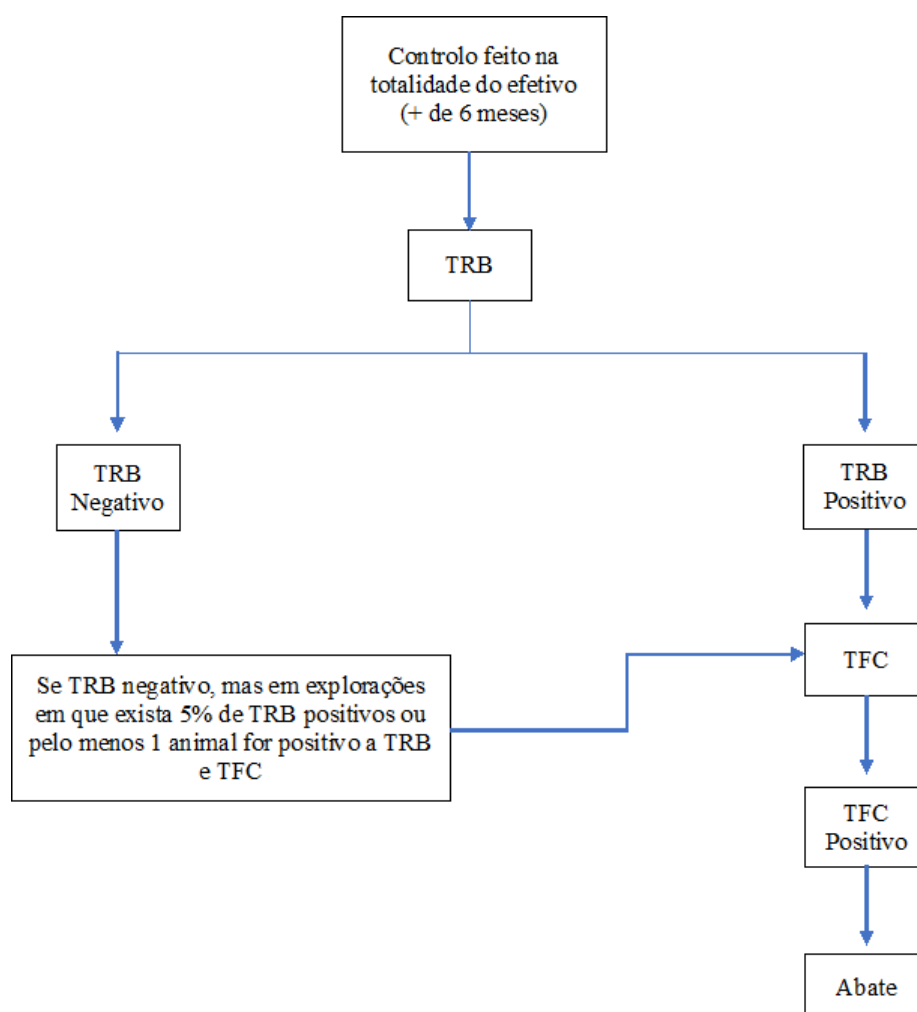


Figura 4: Esquema de controlo em efetivos classificados como B3 ou B4 (Adaptado DGAV 2019)

Anexo 2 – Rótulos de amostra individual e de conjunto de sangue

Tabela 8: Rótulo da amostra individual de sangue

Código de Identificação do Animal: PT	Nº de Ordem:
--	--------------

Tabela 9: Rótulo do conjunto de amostras de sangue

Espécie:	Data da Colheita: / /
Tipo de Amostra: Nº Total:	Marca da Exploração:
Responsável pela colheita:	Requisição nº: