

MARIA INÊS CARDOSO COSTA

**DETERMINAÇÃO DA PREVALÊNCIA DE
BRUCELOSE BOVINA E DOS SEUS FATORES DE
RISCO PARA A POPULAÇÃO, NUMA ZONA RURAL
DA NAMÍBIA**

Orientadora Científica: Ana Cristina Ferreira

**UNIVERSIDADE LUSÓFONA DE HUMANIDADES E TECNOLOGIAS DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

LISBOA

2021

MARIA INÊS CARDOSO COSTA

**DETERMINAÇÃO DA PREVALÊNCIA DE
BRUCELOSE BOVINA E DOS SEUS FATORES DE
RISCO PARA A POPULAÇÃO, NUMA ZONA RURAL
DA NAMÍBIA**

Dissertação defendida em provas públicas para obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, no dia 16 de Abril de 2021, com o Despacho de Nomeação de Júri N° 124/2021 de 6 de abril de 2021, com a seguinte composição de júri:

Presidente: Professora Doutora Sofia Van Harten (por delegação da Professora Doutora Laurentina Pedroso);

Arguente: Professora Doutora Sandra Cavaco Gonçalves;

Orientadora: Professora Doutora Ana Cristina Ferreira

**UNIVERSIDADE LUSÓFONA DE HUMANIDADES E TECNOLOGIAS DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
LISBOA**

2021

Agradecimentos

Num trabalho deste género, conta-se, inevitavelmente, com o apoio e incentivo de diversas pessoas e entidades. Neste sentido, gostaria de expressar o meu sincero agradecimento a todos aqueles que tornaram possível a sua realização:

À faculdade de Medicina Veterinária da ULHT que me atribuiu uma bolsa de investigação, que aliviou uma parte dos custos inerentes a este estudo.

À fundação Cheetah Conservation Fund e a toda a sua equipa de veterinários, nomeadamente Dr. Sydney, Dr. Moyo e enfermeira Vistoria. que me aceitaram e me permitiram ir até um lugar tão mágico como a Namíbia, de modo não só a realizar este estudo, como também o meu estágio de mestrado. Tive uma formação bastante holística graças a todos os projetos que fui suficientemente sortuda de integrar.

Aos meus pais, Carlos Costa e Ana Cardoso, e à minha irmã, Ana Rita Costa, que, felizmente, sempre me incentivaram a seguir o meu sonho. Sem o seu apoio emocional incondicional não teria conseguido alcançar os meus objetivos pessoais. Obrigado por toda a paciência, atenção, força e conselhos que prestaram em momentos menos fáceis.

À minha outra irmã Filipa Lourenço, e aos seus pais, Tina e Lourenço, que tanto me ajudaram e apoiaram durante toda a minha vida, substituindo a minha primeira família quando estes não puderam estar presentes.

Ao meu namorado, Francois Jenkins, que me acompanhou e sempre demonstrou uma enorme vontade para ajudar na elaboração deste trabalho. Sou grata por o ter tido a caminhar ao meu lado, pela sua paciência, compreensão e ajuda, mas especialmente por sempre me presentear com um sorriso e com a sua calma, aquando momentos de desespero durante a realização deste estudo.

À minha orientadora, professora Ana Cristina Ferreira, pela amabilidade e prontidão que desde logo demonstrou na orientação deste trabalho. Foi a professora que me introduziu de maneira bastante cativante ao universo da brucelose, o meu mais sincero obrigado por tudo.

Dr. Laurie Marker, diretora executiva da Cheetah Conservation Fund, por toda a orientação e incentivo durante o meu estágio. Foi um verdadeiro privilégio e honra, ter tido a oportunidade de ter trabalhado consigo.

À professora Margarida Alves á professora Ângela Dâmaso que me ajudaram na aquisição do material que foi necessário para a realização deste estudo.

A todos os meus amigos de Portugal e da Namíbia, que sempre me apoiaram e estiveram presentes quando precisei aliviar pressões e desassombrar a mente. Um especial obrigado ao Himeezembi Kuhanga que me ajudou, entre muitas outras coisas, na tradução do questionário para otjiherero, à Lauren Pfeiffer, ao Vini, Verónica, Pedro e Leonor que sempre me ouviram e apoiaram.

Um especial obrigado à minha prima Ana Isabel Cardoso, que adotou os meus/nossos gatinhos durante a minha estadia na Namíbia. Não sei o que teria feito sem ti.

Não posso deixar de agradecer a todos os proprietários e produtores que se dispuseram a participar neste estudo.

O meu mais sincero obrigado por tudo.

Acknowledgements

In such a work, it inevitably has the support and encouragement of several people and entities. In this regard, I would like to express my sincere gratitude to all those who made it possible:

The Faculty of Veterinary Medicine at ULHT, which awarded me a research scholarship, which alleviated part of the costs inherent in this study.

To the Cheetah Conservation Fund and its entire team of veterinarians, Dr. Sydney, Dr. Moyo and veterinary technician Vistoria, who accepted me and allowed me to go to a place as magical as Namibia, in order not only to carry out this study but also my master's internship. I had a very holistic training thanks to all the projects that I was lucky enough to integrate.

To my parents, Carlos Costa and Ana Cardoso, and to my sister, Ana Rita Costa, who, fortunately, always encouraged me to follow my dream. Without your unconditional emotional support I would not have been able to achieve my personal goals. Thank you for all the patience, attention, strength and advice you provided in less easy times.

To my other sister Filipa, and her parents, Tina and Lourenço, who helped and supported me so much throughout my life, replacing my first family when they could not be present.

To my boyfriend, Francois Jenkins, who accompanied me and always showed an enormous willingness to help in the elaboration of this work. I am grateful to have had him walk by my side, for his patience, understanding and help, but especially for always granting me a smile and his calmness, during moments of despair during this study.

To my supervisor, professor Ana Cristina Ferreira, for the kindness and readiness that she immediately showed in the guidance of this work. It was you who introduced me, in a very captivating way, to the universe of brucellosis.

To Dr. Laurie Marker, executive director of Cheetah Conservation Fund and my external supervisor, for all her guidance and encouragement throughout my internship. It was a real privilege and an honor for me to have had the opportunity to work with you.

To professor Margarida Alves and professor Ângela Dâmaso who helped me acquire the material that was necessary to carry out this study.

To all my friends from Portugal and Namibia, who have always supported me and were present when I needed to relieve pressure and alleviate my mind. A special thanks to Himeezembi Kuhanga who helped me, among many other things, in the translation of the questionnaire to otjiherero, to Lauren Pfeiffer, Vini, Verónica, Pedro and Leonor who listened and supported me.

A special thanks to my cousin Ana Isabel Cardoso, who adopted my / our kittens during my stay in Namibia. I don't know what I would have done without you.

Lastly thanks to all the owners and production managers who were willing to participate in this study.

My most sincere thank you for everything.

Resumo

A Brucelose é uma doença zoonótica que infeta uma grande variedade de espécies animais e o Homem. É uma das zoonoses mais disseminadas a nível mundial, sendo responsável por consideráveis perdas económicas, bem como por uma grande morbilidade humana em áreas endémicas. Os agentes etiológicos da brucelose são rebactérias do género *Brucella*, sendo que *B. abortus*, *B. melitensis* e a *B. suis* têm maior disseminação e acarretam maiores implicações na saúde pública.

Este estudo teve como objetivos a avaliação da seroprevalência de brucelose bovina em diferentes áreas de reserva comunitárias na região de Otjozondjupa da Namíbia, utilizando o teste de aglutinação rápida com o antigénio Rosa de Bengala (RBT) e a identificação dos potenciais fatores de risco associados à infeção nos animais e no Homem através da análise de questionários.

Áreas de reserva comunitárias ou comunas são entidades autónomas e democráticas, administradas por membros eleitos, com limites fixos que são acordados com as vilas, comunidades ou proprietários de terras adjacentes. O estabelecimento de comunas na Namíbia é incentivado pelo governo, a fim de capacitar os agricultores a utilizar de maneira sustentável os recursos naturais, especialmente os recursos da vida selvagem.

Para a realização deste trabalho foram colhidas amostras de sangue a 186 bovinos para posterior diagnóstico serológico. Simultaneamente, foram realizados questionários aos proprietários, responsáveis de produção ou produtores de maneira a compreender as suas características demográficas, práticas de biossegurança, de manejo animal e de consumo de produtos de origem animal, bem como o seu nível de consciencialização acerca da brucelose.

Com este trabalho chegou-se à conclusão que o conhecimento que a população em estudo detém relativamente à brucelose é bastante fraco, o que se reflete nas suas práticas de biossegurança e manejo animal. Não foi possível averiguar uma verdadeira prevalência da doença, uma vez que os resultados nos testes RBT foram na sua totalidade positivos. Estes resultados sugerem que a positividade geral se deve à vacinação, com S19, e não a uma possível infeção.

Palavras-Chave: Brucelose; Bovinos; Fatores de risco; Namíbia

Abstract

Brucellosis is a zoonotic disease that infects a wide variety of animal species and humans. It is one of the most widespread zoonoses worldwide, being responsible for considerable economic losses, as well as for a great human morbidity in endemic areas. The etiological agents of brucellosis are bacteria of the genus *Brucella*, with *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. suis* having greater dissemination and having greater implications for the public health.

This study aimed to assess the seroprevalence of bovine brucellosis in different conservancies in the Otjozondjupa region of Namibia, using the rapid agglutination test with the Rose de Bengal antigen and the identification of potential risk factors associated with the infection in animals through the analysis of questionnaires in the region under study.

Conservancies are autonomous and democratic entities, administered by elected members, with fixed limits that are agreed with the adjacent villages, communities, or landowners. The establishment of conservancies in Namibia is encouraged by the government to enable farmers to use natural resources in a sustainable manner, especially wildlife resources.

To carry out this study, blood samples were collected from 186 cattle for subsequent serological diagnosis. Simultaneously, questionnaires were given and / or carried out to owners / production managers in order to understand their demographic characteristics, biosafety practices, animal management and consumption of animal products, as well as their level of awareness about brucellosis.

With this work it was concluded that the knowledge that the study population has regarding brucellosis is quite low, which is reflected in their practices of biosafety and animal management. It was not possible to ascertain a true prevalence of the disease since the results on the RBT tests were in their entirety positive. These results suggest that the general positivity is due to vaccination, with S19, and not to a possible infection.

Keywords: Brucellosis; Cattle; Risk Factors; Namibia

Abreviações / Siglas

RBT – Teste Rosa de Bengala

FC – Teste de Fixação do Complemento

FMV-ULHT – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

CCF – Cheetah Conservation Fund

DP – Desvio Padrão

Ig – Imunoglobulinas

Índice geral

Agradecimentos	1
Acknowledgements	3
Resumo	5
abstract	6
Abreviações / Siglas	7
Índice Geral.....	8
Índice de Tabelas.....	11
Índice de Figuras	12
Casuística de estágio	13
1. Introdução	14
1.1 Brucelose.....	14
1.2 Namíbia e a Brucelose.....	15
1.3 O género <i>Brucella</i>	16
1.4 Patogenia e Epidemiologia da brucelose bovina	17
1.5 Fatores de risco da brucelose animal	20
a. Fatores de risco associados às características biológicas de <i>brucella spp.</i>	20
b. Fatores de risco associados ao hospedeiro	20

i. Idade	20
ii. Género	21
iii. Espécie.....	21
c. Fatores de risco associados com a exploração	22
i. Tamanho do efetivo	22
ii. Produção de diversas espécies.....	22
d. Fatores de risco associados ao manejo animal e ambiente	24
1.6 Diagnóstico	26
1.7 Controlo e Prevenção da brucelose na Namíbia.....	29
1.8 Caracterização das explorações na área de reserva comunal no distrito de Okakarara, na Namíbia, e os fatores de risco de maior relevância a nível local para brucelose bovina.....	31
1.9 Objetivos	36
2. Materiais e métodos.....	37
2.1 Área de estudo	37
2.2 Caracterização da amostra.....	39
2.3 Colheita das amostras e obtenção do soro	39
2.4 Realização dos questionários.....	40
2.5 Diagnóstico serológico: teste rosa de bengala (RBT)	42
3. Resultados.....	43

3.1	questionários	43
3.1.1	características demográficas e das explorações	43
3.1.2	conhecimento, atitudes e práticas relativamente á brucelose bovina	45
3.2	teste de RB	47
4.	Discussão dos resultados	48
5.	Conclusões	52
6.	Limitações do estudo	53
8.	Apêndices	I
	Questionário em português	I
	Questionário em inglês	III
	Questionário em afrikaans	V
	Questionário em otjiherero	VII
	Termo de consentimento para participação no estudo	IX

Índice de tabelas

Tabela 1: Respostas registradas relativamente a características demográficas e das explorações nas áreas de reserva comunais do distrito de Okakarara, 2019	44
Tabela 2: Respostas registradas relativamente aos conhecimentos, atitudes e práticas relativamente á brucelose bovina adotados nas explorações nas áreas de reserva comunais do distrito de Okakarara, 2019	46
Tabela 3: Resumo dos fatores de risco encontrados nas áreas de reserva comunitárias da região de Okakarara	49

Índice de figuras

Figura 1: Mangas de contenção em duas explorações	32
Figura 2: Grupo de bovinos a serem libertados de manhã para regressarem ao fim do dia	33
Figura 3: Bebedouro com várias pedras de sal espalhadas pelo solo	33
Figura 4: A partilha de bebedouros por diferentes grupos de animais é comum nas áreas de reservas comunitárias da região de Otjozondjupa	34
Figura 5: Coexistência de ruminantes domésticos com a fauna selvagem; foto tirada em área de reserva comunitária adjacente à região em estudo.	35
Figura 6: Mapa da reserva da paisagem do grande Waterberg.	37
Figura 7: Mapa das vilas da área de reserva comunitária do distrito de Okakarara, com a zona de grande conflito entre humanos e vida selvagem destacada	38
Figura 8: Mapa das vilas da área de reserva comunitária do distrito de Okakarara, com a zona de grande conflito entre humanos e vida selvagem destacada	39
Figura 9: Dr. Sydney na realização de uma entrevista	41
Figura 10: Distribuição do género e grupo etário da amostra por exploração	47
Figura 11: Meio de transporte usado durante o estudo e condições das estradas na região em estudo	53

Casuística de estágio

A casuística para este trabalho restringiu-se, a um grupo de 186 bovinos, cruzamentos e raças puras de Brahman, Bonsmara, Simmentaler e Simbra, oriundos de 14 explorações diferentes, na região de Otjozondjupa, no centro-este da Namíbia. Foram recolhidas amostras sanguíneas a todos os animais, para posterior diagnóstico serológico (RBT). A recolha das amostras foi realizada durante uma saída de campo com duração de sete dias. Durante este período foram visitadas 14 explorações e realizados 14 questionários a proprietários ou responsáveis de produção.

A recolha das amostras foi realizada pela autora do trabalho e pela equipa de veterinários da fundação Cheetah Conservation Fund (CCF), composta por dois médicos veterinários e um assistente. O diagnóstico serológico das amostras foi posteriormente realizado no laboratório de Reprodução da fundação CCF.

A realização das horas práticas necessárias para a conclusão do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da FMV-ULHT, foi feita na fundação CCF. Durante este período foram abordadas várias áreas clínicas em diferentes departamentos da fundação. De um modo geral a casuística clínica, que necessitou de intervenção veterinária, deu-se no departamento dos cães pastores de raça pastor da Anatólia, no departamento dos pequenos ruminantes de leite e de carne e no departamento das chitas.

Com os cães pastores da anatólia foram comuns lesões traumáticas provocadas por outros cães ou fauna selvagem. No departamento de pequenos ruminantes observaram-se inúmeros problemas ortopédicos, de podologia e de origem viral. No departamento das chitas a intervenção veterinária limitou-se a intervenções de urgência, como a resolução de obstruções GI, dentisteria e check-ups anuais, onde é necessário a sedação dos animais.

1. Introdução

1.1 Brucelose

A Brucelose é uma doença zoonótica que se encontra disseminada a nível mundial, sendo responsável por consideráveis perdas económicas e elevada morbilidade humana nas áreas endémicas. A brucelose em humanos é conhecida por Febre de Malta, Febre Mediterrânea, Febre Cipriota, Febre Napolitana, Febre de Gibraltar, Febre da Crimeia, Febre de Cartagena, Febre de Rock, Febre de Barcelona, doença de Corps e Febre Ondulante (Corbel, 2006).

Em 1859, Marston descreveu esta doença pela primeira vez, relatando casos de febre ondulante seguidos de morte, ocorridos na Ilha de Malta, no Mar Mediterrâneo, sendo por isso, primeiramente denominada “Febre de Malta”. Em 1887, um médico inglês, Sir David Bruce isolou pela primeira vez uma bactéria do baço de soldados britânicos, mortos na Ilha de Malta, denominando-a como *Micrococcus melitensis* (Vasallo, 1992). Bernhard Bang, um patologista veterinário dinamarquês, em 1895, isolou um microrganismo do útero e membranas fetais resultantes de aborto de vacas, identificando-o como *Bacillus abortus*. No entanto, só em 1918, nos Estados Unidos da América, Alice Evans, demonstrou que as bactérias isoladas por Bruce e Bang apresentavam similaridades morfológicas e imunológicas (Seleem *et al.*, 2010) e, em 1920, Meyer e Shaw, propuseram a criação do Género *Brucella* (Meyers & Shaw, 1920).

A sua distribuição mundial, os seus efeitos económicos negativos e a variedade de animais que afeta são alguns fatores que fazem da brucelose uma doença de grande importância para a saúde pública (Godfroid *et al.*, 2011).

Geralmente a infeção em animais provoca aborto o que, consequentemente, resulta em enormes perdas económicas. A transmissão da infeção ocorre, normalmente, por contacto direto entre animais, inalação ou ingestão de produtos infetados. A transmissão sexual não é um meio muito relevante em bovinos, mas deve ter-se em conta que a doença pode ser transmitida por inseminação artificial e, portanto, só devem ser usados para recolha de esperma touros com estatuto sanitário conhecido (Corbel, 2006). A infeção por *Brucella* spp., tal como outras infeções, depende da virulência e da dose bacteriana a que o hospedeiro animal é sujeito, bem como da sua resistência/suscetibilidade e estado imunitário.

No Homem, a brucelose geralmente manifesta-se com uma variedade de sinais clínicos não específicos que incluem fadiga, artrite e febre. A brucelose humana é uma doença debilitante que carece de sintomas patognomônicos, o que dificulta a sua distinção de outras condições febris. A forma mais frequente de infecção no Homem ocorre através do consumo de produtos lácteos não pasteurizados, embora possa também ocorrer por contato direto com tecidos de animais infetados (Corbel, 2006). *B. melitensis* é responsável pela maioria dos casos relatados de brucelose humana, provocando a forma mais grave da doença, seguida por *B. abortus* e *B. suis*. Uma vez que não existe vacina humana nem evidência significativa de transmissão de humano para humano, o controlo da brucelose animal, a pasteurização do leite e outras medidas de higiene alimentar são as únicas opções para reduzir a ocorrência de brucelose no Homem.

1.2 Namíbia e a Brucelose

A Namíbia é um país da África Austral e está localizada na costa sudoeste do continente, entre as latitudes 17,5 ° e 29 ° sul e 11,5 ° e 25,5 ° este. A Namíbia faz fronteira a Norte com Angola, Zâmbia e Zimbábue a nordeste, Botswana a este, África do Sul a sul.

A área de superfície total do país é de 824 295 km² e apenas 2.113 milhões de habitantes.

A verdadeira situação epidemiológica da brucelose no continente africano é desconhecida. No entanto, apesar da subnotificação e da escassez de dados epidemiologicamente válidos, existem evidências que mostram que a brucelose é um problema generalizado no continente (Akakpo, 1987; Ducrotoy *et al.*, 2014; Grace *et al.*, 2012; Mangen *et al.*, 2002; McDermott *et al.*, 2013; Thimm & Wundt, 1976). A primeira evidência da doença no país foi reportada em ovinos da raça karakul em 1953 (Godfroid *et al.*, 2011), e desde então já foi reportada em ovelhas (Magwedere *et al.*, 2011), Spring-bok (Madzingira *et al.*, 2014; Madzingira, 2015; Madzingira, 2016) e outros ruminantes selvagens (Depner, 2010). Madzingira e Sezuni (2017) publicaram um estudo com o objetivo de determinar a seroprevalência de brucelose numa exploração de bovinos de leite. Durante um período de quatro anos apenas um animal testou positivo para *Brucella* spp., resultando numa prevalência de 0.01%. Este estudo apresentou limitações notáveis que impossibilitam a extrapolação dos resultados para a realidade nacional. O estudo limitou-se a uma única exploração comercial de

leite, sem historial de aborto e onde medidas de controlo de brucelose são implementadas. (Magzingira *et al.*, 2017).

Dada a escassez de informação sobre a brucelose humana e animal na Namíbia, o risco atual das populações adquirirem a doença é desconhecido, podendo apenas ser extrapolado a partir das informações disponíveis de outros países. Não obstante, o governo namibiano impõe medidas específicas relativas ao controlo, prevenção e vigilância da brucelose em animais, que serão descritas no ponto sete deste capítulo (1.7 Controlo e Prevenção da Brucelose na Namíbia).

Uma melhor perceção acerca do conhecimento, das atitudes e das práticas que uma população apresenta em relação à brucelose pode auxiliar a determinar potenciais fatores de risco para a infeção humana e animal e, mais importante, melhorar as políticas de controlo/profilaxia da brucelose (Lindahl *et al.*, 2015).

1.3 O género *Brucella*

Os agentes etiológicos da brucelose são as bactérias do género *Brucella*, parasitas intracelulares facultativos aeróbios que infetam uma larga variedade de mamíferos domésticos, selvagens (incluindo mamíferos marinhos) e o Homem (WHO, 2016). O género *Brucella* está incluído na família *Brucellaceae*, ordem *Rhizobiales* e classe *Alphaproteobacteria* (Fitch, 2010).

Atualmente, estão reconhecidas 12 espécies distintas de *Brucella* (*B.*), agrupadas de acordo com o seu hospedeiro preferencial e outras características fenotípicas e/ou genotípicas, nomeadamente, *B. abortus* (bovinos), *B. melitensis* (pequenos ruminantes), *B. suis* (suínos), *B. ovis* (ovinos), *B. canis* (canídeos), *B. neotomae* (roedores), *B. microti* (roedores), *B. ceti* (cetáceos), *B. pinnipedialis* (pinípedes), *B. inopinata* (isolada num implante mamário, desconhecendo-se ainda o hospedeiro animal), *B. papionis* (babuíños) e *B. vulpis* (raposa) (Osterman & Moriyon 2006; Foster *et al.*, 2007; Scholz *et al.*, 2008; Scholz *et al.*, 2010; Whatmore *et al.*, 2014; Hofer *et al.*, 2011).

Os organismos do género *Brucella* são cocobacilos Gram-negativos, não capsulados, sem capacidade de locomoção e de formar esporos e medem entre 0,6 a 1,5 µm de comprimento e 0,5 a 0,7 µm de largura. Estas bactérias possuem um invólucro celular, composto por membrana externa e membrana interna, que envolve o periplasma constituído por peptidoglicano e componentes solúveis. Os componentes mais importantes do invólucro celular

de *Brucella* são o lipopolissacárido (LPS) e o hapteno nativo (um polissacárido secundário) (Moriyón *et al.*, 1998). Existem também proteínas características (Cloeckaert *et al.*, 2002) e lípidos de ornitina (Moreno *et al.*, 2002). No entanto, o componente mais abundante e relevante na resposta imunitária é o lipopolissacárido (LPS), uma molécula chave na virulência desta bactéria que modula a resposta imune do hospedeiro (Cardoso *et al.*, 2006). Tal como noutras bactérias Gram-negativas, o LPS é constituído por uma parte glucolípida inserida na membrana externa, e outra polissacarídica, dirigida para o exterior e que se divide em duas partes, o núcleo oligossacarídico, mais interno, e a cadeia-O polisacarídica, mais externa.

O género *Brucella* tem a particularidade única, entre as bactérias Gram-negativas, de incluir, além de estirpes mutantes rugosas das estirpes lisas, espécies permanentemente rugosas (*B. ovis* e *B. canis*).

1.4 Patogenia e Epidemiologia da brucelose bovina

Todas as espécies de *Brucella* são bactérias gram-negativas, intracelulares, com tropismo para o trato reprodutor. *Brucella* spp. provoca uma infeção persistente no sistema reticuloendotelial dos seus hospedeiros naturais. Os sinais mais comuns de infeção por *B. abortus* em bovinos são abortos e infertilidade em machos. Em bovinos gestantes, *B. abortus* provoca uma infeção crónica, replicando-se preferencialmente dentro de trofoblastos corioalantóicos da placenta, resultando em placentite, morte fetal e aborto (Enright, 1990). Machos infetados podem desenvolver sinais sistémicos de infeção, sendo orquite a lesão mais significativa ligada á infeção por *B. abortus*, estando muitas vezes associada a vesiculite seminal e epididimite (Lambert *et al.*, 1963).

A transmissão venérea não é considerada uma via principal de infeção, mas a inseminação artificial com sémen contaminado é uma potencial fonte de infeção (Rankin, 1965).

A infeção com *B. abortus* ocorre mais frequentemente através das mucosas nasal e oral. Após a penetração da mucosa, *Brucella* spp. são fagocitadas por macrófagos e neutrófilos e transportadas até aos linfonodos regionais, onde se multiplicam levando a linfadenite. A partir dos linfonodos regionais, *brucella* pode disseminar-se livremente ou no interior de macrófagos, por via hemática e linfática, e instalar-se noutros órgãos e linfonodos, em particular linfonodos

supramamários, úbere, útero gestante, fígado, baço, testículos e outras glândulas sexuais acessórias masculinas. (Godfroid *et al.*, 2004; Neta *et al.*, 2010).

A infecção do útero gestante ocorre através da circulação da bactéria na corrente sanguínea e as alterações variam de acordo com a intensidade da infecção e o tempo de gestação. O tropismo que *brucellae* apresenta com o sistema reprodutor de ruminantes, pensa-se estar relacionado com a sua afinidade com o eritritol, presente nestes órgãos (Sangari *et al.*, 200; Godfroid *et al.*, 2004). Altas concentrações de eritritol estimulam o crescimento de *B. abortus* e *B. melitensis*. Em ruminantes, a concentração de eritritol aumenta gradualmente durante a gestação. As lesões uterinas principais causadas por brucelose localizam-se nos placentomas, nomeadamente placentites. Estas lesões podem impedir a troca de nutrientes com o feto e causar stress ou morte fetal. No entanto os mecanismos indução de aborto por *Brucella* spp. ainda não estão completamente compreendidos.

A brucelose é uma zoonose que prejudica gravemente a produtividade animal e a saúde humana em todo o mundo. Na brucelose todas as infeções humanas derivam do contacto direto ou indireto com animais infetados (Corbel, 2006). Julga-se que, mesmo nos países desenvolvidos, a verdadeira incidência da brucelose poderá ser cinco ou mais vezes superior à que os números oficiais sugerem, este facto é atribuído ao subdiagnóstico e à subdeclaração obrigatória (Pessegueiro *et al.*, 2003).

A importância desta doença em países em desenvolvimento levou a Organização Mundial da Saúde a classificá-la como uma doença zoonótica negligenciada.

A severidade da doença é, em grande medida, determinada pela espécie de *Brucella* a que o indivíduo foi exposto, isto é, depende da espécie do animal hospedeiro que atua como fonte de infeção.

Há ainda a considerar os fatores ambientais que afetam a capacidade de *brucellae* sobreviver fora dos hospedeiros mamíferos. Elevada humidade, baixas temperaturas e ausência de luz solar direta podem favorecer a sobrevivência de *brucellae* por vários meses em água, fetos abortados, membranas placentárias, fezes, feno, edifícios, equipamentos e roupas.

A brucelose bovina é causada por *B. abortus*. No entanto outras espécies não bovinas, incluindo o Homem, também podem contrair a doença e desempenhar um papel na sua prevalência e transmissão. *B. abortus* tem sete bio vares reconhecidos, sendo os bios vares 1, 2, 3, 4 e 9 os mais relatados. A caracterização das espécies ao nível do bio variedade pode ser

importante para determinar a origem de algumas infecções (Crawford *et al.*, 1979; Garcia *et al.*, 1988; Díaz, 2013).

Equinos que coabitam com bovinos infetados também podem manifestar a doença que normalmente se manifesta com edema característico da bursa supraespinhal. (Muñoz *et al.*, 2010; Díaz 2013). A infecção em cães por *Brucella abortus* foi demonstrada em condições experimentais e de campo. Os cães desempenham um papel importante na distribuição da doença, alimentando-se de fetos abortados, arrastando-os e disseminando a bactéria (Baek *et al.*, 2003; Bricker *et al.*, 1994).

A principal via de entrada de brucellae é a oral, pela ingestão de alimentos ou água contaminados com secreções ou restos fetais abortados de bovinos infetados, ou lambendo as secreções vaginais, órgãos genitais, fetos abortados ou vitelos recém-nascidos de vacas infetadas. Como já foi descrito anteriormente, embora a via venérea não seja considerada epidemiologicamente importante na transmissão da brucelose em bovinos, o sêmen infetado usado na inseminação artificial pode ser importante. Vacas infetadas eliminam brucellae pelo leite e isto é fundamental para sua transmissão aos vitelos. (Samartino, 2003; Samartino & Enright, 1993; OIE, 2010)

A brucelose é geralmente assintomática em fêmeas não gestantes, mas fêmeas adultas e gestantes infetadas com *B. abortus* desenvolvem placentite, que normalmente causa aborto entre o quinto e o nono mês de gestação. Mesmo na ausência de aborto, há uma grande libertação de bactérias pela placenta, fluidos fetais e exsudados vaginais. A glândula mamária e linfonodos regionais também podem ser infetados e as bactérias podem ser excretadas no leite (Philippon *et al.*, 1970; OIE, 2010).

Depois de contrair a infecção, regra geral, os animais abortam durante a gestação seguinte, no entanto 80% dos animais infetados abortam apenas uma vez. Na maioria dos casos, as gestações posteriores chegam ao termo sem sinais aparentes ou com o nascimento de vitelos fracos, mas os animais infetados sofrem infecções uterinas e mamárias repetidas, com a bactéria evidente em produtos do parto e no leite. Estes animais continuam a eliminar um grande número de *brucella* tornando-se fontes de infecção para outros animais. Os machos adultos infetados podem desenvolver orquite e a brucelose pode causar infertilidade em ambos os sexos. Os machos castrados usados para engorda não são importantes na distribuição da doença (Carvalho Neta *et al.*, 1979; Samartino, 2003; OIE, 2010).

1.5 Fatores de Risco da brucelose animal

Os fatores de risco da brucelose podem ser categorizados em relação às características biológicas da bactéria, da população animal e do manejo animal (Coelho *et al.*, 2015).

a. Fatores de risco associados às características biológicas de *Brucella* spp.

Brucella abortus é o agente etiológico da brucelose bovina, no entanto também afeta outras espécies, como búfalos ou alces. Esta característica de *B. abortus* representa um desafio no controlo da bactéria na população animal, com especial importância em áreas onde animais de produção têm contacto com fauna selvagem (Godfroid, 2002). *B. abortus* é um agente patogénico humano estando os surtos associados a bovinos infetados e à ingestão de produtos lácteos contaminados (Seleem *et al.*, 2010).

Brucella melitensis pode afetar a maioria dos animais domésticos, no entanto ovinos e caprinos de leite são especialmente suscetíveis. Ovinos têm uma suscetibilidade diferente dependendo da raça, enquanto esta associação não foi relatada em caprinos. *B. melitensis* é o principal agente etiológico de brucelose em pequenos ruminantes, embora ovinos também possam ser infetados por *B. ovis*. Foram descritos casos esporádicos em ovinos e caprinos infetados com *B. abortus* e *B. suis* (OIE, 2018).

Suíños são igualmente suscetíveis à infeção por *B. melitensis*. No entanto a brucelose suína é causada por *Brucella suis* biovars 1, 2 ou 3. A doença causada por biovars 1 e 3 é semelhante, enquanto a causada por bio var 2 difere na variedade de hospedeiros que afeta, sendo mais limitado quer na sua distribuição geográfica e na sua patologia (OIE, 2012). Em suínos domésticos a transmissão durante a cópula é muito comum (OIE, 2012; EFSA journal, 2009). A inseminação artificial com sêmen contaminado também deve ser considerada um risco (OIE, 2012).

b. Fatores de risco associados ao hospedeiro

i. Idade

A idade tem sido referida como um dos fatores intrínsecos associados à brucelose. De acordo com vários estudos a seroprevalência de brucelose é superior em bovinos com idade superior a 5 anos, em pequenos ruminantes com mais de 2 anos de idade (Borba *et al.*, 2013;

Ashagrie *et al.*, 2011; Sanogo *et al.*, 2012; Solorio-Rivera *et al.*, 2007), e superior em javalis (Muñoz *et al.*, 2010) e em camelos (Al-Majali *et al.*, 2008) adultos.

Prevalências superiores de brucelose em animais adultos estão também associadas ao contacto mais prolongado com animais infetados ou com o meio ambiente (Megersa *et al.*, 2011). Todavia, a baixa prevalência em animais mais jovens pode ser falsa, uma vez que animais jovens podem ser infetados assintomáticos (Megersa *et al.*, 2011), passando despercebida.

Em conclusão, a maior seroprevalência de brucelose observada em animais adultos deve-se ao aumento da suscetibilidade á doença, após a maturidade sexual e gestação.

ii. Género

De acordo com diversos estudos, o sexo do animal tem influência na prevalência de brucelose bovina, caprina e ovina (Mumma *et al.*, 2006; Solorio-Rivera *et al.*, 2007; Muñoz *et al.*, 2010; Megersa *et al.*, 2011).

Em ruminantes e cães foi observada uma maior suscetibilidade à infeção de brucelose em fêmeas quando comparada a machos. Ruminantes fêmeas e cadelas apresentam maior suscetibilidade á infeção de brucelose, o mesmo foi observado em cadelas em comparação com cães machos (Talukder *et al.*, 2012). Esta associação deve-se à biologia intrínseca da bactéria e ao seu tropismo para tecidos fetais.

A infeção de brucelose em machos manifesta-se clinicamente em epididimites e orquites, que muitas vezes levam à antecipação do abate do animal, o que pode explicar a aparente menor prevalência em machos (Coelho *et al.*, 2015).

iii. Espécie

A brucelose apresenta menor prevalência em pequenos ruminantes em relação a grandes ruminantes (Megersa *et al.*, 2011; Ahmed *et al.*, 2010) e inferior em ovelhas do que em cabras (Rahman *et al.*, 2011; Jackson *et al.*, 2004; Musallam *et al.*, 2015; Coelho *et al.*, 2015)

A transmissão de brucelose em ruminantes ocorre através da excreção de materiais contaminados do trato genital feminino. A excreção vaginal de *Brucella spp.* em caprinos dura cerca de 2-3 meses. Em ovinos, a excreção é menor e menos prolongada, cessando 3 semanas

após o parto ou aborto (Coelho *et al.*, 2015) A *brucellae* também é excretada através do leite ou sêmen (Poester *et al.*, 2013). A excreção de *brucellae* no leite é geralmente intermitente e aparece apenas 6 a 12 dias após o aborto. Em cabras, a excreção é mais abundante e mais prolongada, portanto há um risco aumentado de infecção por meio do consumo de leite caprino (Poester *et al.*, 2013).

c. Fatores de risco associados com a exploração

i. Tamanho do efetivo

Um importante fator de risco para a seropositividade de brucelose é o número do efetivo na exploração. (Coelho *et al.*, 2015).

A seropositividade é maior em grandes grupos de animais. Esta maior prevalência de brucelose foi associada a vários fatores, como um maior número de animais testados em grupos maiores significa que a probabilidade de detectar pelo menos um animal soropositivo é maior (Solorio-Rivera *et al.*, 2007) ou um maior número de animais aumenta a probabilidade de transmissão da doença pelo contato entre animais (Coelho *et al.*, 2015).

A menor prevalência de brucelose em rebanhos de pequenas dimensões pode estar associada ao tipo gestão da exploração e ao manejo dos animais (Coelho *et al.*, 2015). Rebanhos de pequenos ruminantes geralmente pastam em pastagens próximas ou contíguas à exploração, evitando o contato com outros animais ou a utilização de caminhos ou estradas comuns. Outro fator é o tamanho da exploração, como as instalações são menores, a limpeza, desinfecção e remoção dos dejetos têm procedimentos mais fáceis e menos demorados para o proprietário, bem como menos dispendiosos. Em explorações de grandes ruminantes, as dimensões das instalações são maiores e a remoção dos dejetos e a desinfecção requerem a disponibilidade de equipamentos mecânicos e consequentemente um maior investimento. Um aumento da prevalência de brucelose associada à diminuição dos procedimentos de remoção, limpeza e desinfecção de dejetos foram descritos (Coelho *et al.*, 2015).

ii. Produção de diversas espécies

A produção de várias espécies no mesmo rebanho é considerada um fator de risco para a brucelose (Al-Majali *et al.*, 2008; Megersa *et al.*, 2011). Este aumento da prevalência onde várias espécies se misturam, pode estar associado a maiores chances de ser soropositivo devido a múltiplas fontes de infecção.

Ainda não foi determinado se *B. melitensis* pode ser mantida numa população de bovinos na ausência de pequenos ruminantes. *B. melitensis* causa aborto em bovinos de forma semelhante a *B. abortus*.

A prática de misturar bovinos, seja por meio de pastagem ou a partilha de bebedouros, é um fator de risco significativo para a brucelose (Muma *et al.*, 2007; Al-Majali *et al.*, 2009; Islam *et al.*, 2013).

Pastagens comunitárias devem ser tratadas como uma unidade e medidas profiláticas devem ser aplicadas a todos os animais (Sammartino *et al.*, 2006)

Estudos (Megersa *et al.*, 2011) demonstraram que a doença é facilmente transmitida em áreas onde sistemas de produção extensiva predominam, baseados no pastoreio e na alta mobilidade dos animais. A mobilidade ou a deslocação dos animais, aumenta a probabilidade de contato com outros grupos potencialmente infetados ou com fauna selvagem (Coelho *et al.*, 2015).

A presença de cães foi descrita como um fator de risco para a infecção por brucelose em animais de produção e representa uma potencial ameaça epidemiológica em áreas endêmicas de brucelose sem programas de controlo profilático. Os cães são um potencial risco na difusão de brucelose, atuando como disseminadores mecânicos, alimentando-se de fetos abortados, arrastando-os e espalhando a bactéria.

A brucelose canina é geralmente causada por *B. canis*, embora a infecção por *B. abortus*, *B. suis* e *B. melitensis* já tenham sido relatadas (Sammartino *et al.*, 2006). *B. abortus* e *B. melitensis* podem ser transmitidos de bovinos para cães que acabam por desempenhar um papel de vetor. *Brucella* pode induzir a doença em cães por meio de ingestão de tecidos reprodutivos infetados (Baek *et al.*, 2003). Cães infetados com *B. abortus* podem excretar a bactéria para o meio ambiente através da urina, secreções vaginais, fetos abortados ou fezes (Coelho *et al.*, 2015).

Se uma cadela grávida estiver infetada com *B. abortus*, pode abortar, e os tecidos e secreções vaginais têm um grande potencial para transmitir *Brucella* a bovinos suscetíveis (Baek *et al.*, 2003; Sammartino *et al.*, 2006). Os cães também podem ser infetados com *B. suis* através da ingestão de fetos suínos abortados.

A eliminação de bovinos ou de pequenos ruminantes infetados pode não necessariamente erradicar a doença (Baek *et al.*, 2003; Coelho *et al.*, 2015).

d. Fatores de risco associados ao manejo animal e ambiente

Animais de explorações de leite têm uma probabilidade muito maior de contrair brucelose, e também de espalhar mais rápido do que animais de exploração de carne. O motivo não é um fator genético ou fisiológico, mas sim fatores de manejo. Os animais de explorações leiteiras vivem em áreas menores, onde há maior concentração de animais, havendo maior contacto direto quando estão no pasto ou aquando da ordenha (Sammartino *et al.*, 2006). Além disto, considera-se que animais de explorações de leite estão submetidos a mais condições de stress, levando a uma maior suscetibilidade á infeção por brucelose (Kataria *et al.*, 2010). A persistência da infeção no úbere e nos gânglios linfáticos supramamários leva a uma excreção constante ou intermitente no leite em lactações sucessivas, o que constitui uma importante fonte de infeção para humanos e animais jovens.

Procedimentos de ordenha inadequados associados a lesões cutâneas nas mãos, foram reportados como formas de transmissão zoonótica de brucelose (Islam *et al.*, 2013). A transmissão através de lesões cutâneas do úbere também é outra forma de infeção.

A compra e venda de animais são considerados fatores de risco da brucelose. Esta prática aumenta o risco de introdução de um animal infetado em um rebanho (Matope *et al.*, 2011). Este fator de risco tem maior importância em áreas endémicas ou em países onde há ausência de programas de controle. No entanto, em países onde se praticam programas de controlo de teste e abate, para a movimentação de animais são obrigatórios testes de pré-movimentação que consistem no diagnóstico serológico de brucelose antes do animal deixar a exploração.

A influência da zona agroecológica foi referida como fator de risco de brucelose. Foi observada uma maior seroprevalência de brucelose em zonas secas, uma vez que as áreas de pastagem são escassas, os animais procuram pastagens em áreas de grandes dimensões, implicando contato irrestrito de animal com animal potencialmente transmitindo a infeção, conforme descrito anteriormente (Silva *et al.*, 2000). Além disto, a transmissão devido à inalação de aerossóis de descargas fetais ou abortos contaminados é possível.

As estações do ano têm impacto no manejo dos animais e na sua nutrição, principalmente em sistemas de produção que envolvem transumância ou práticas nómadas (Reviriego *et al.*, 2000). A precipitação afeta o desenvolvimento e o estado nutricional da pastagem. Estes fatores influenciam a reprodução dos animais mantidos em sistemas extensivos

e, portanto, o tempo de partos e abortos. Em sistemas intensivos, o isolamento de animais pós-parto em maternidades reduz a disseminação da infecção para o resto do grupo (Islam *et al.*, 2013).

A limpeza e desinfecção das instalações e a remoção adequada do estrume, foram descritas como fator de proteção contra a infecção por brucelose (Reviriego *et al.*, 2000; Blasco, 1997; Al-Talafhah *et al.*, 2003). Este facto está associado á baixa resistência de *Brucella spp.* à maioria dos agentes desinfetantes. Em canis existe um risco semelhante de brucelose. Canis com manejo impróprio de fezes e construída com materiais como telhas, madeira e pisos de terra são considerados de maior risco de infecção, uma vez que mantêm a exposição à urina, fezes ou secreções reprodutivas (Coelho *et al.*, 2015)

Ectoparasitas em cães podem atuar como vetores mecânicos da brucelose. *Brucellae* foi isolada do conteúdo estomacal de *Stomoxys calcitrans*, *Ornithodoros* e *Musca autumnalis* (Coelho *et al.*, 2015)

Como já foi mencionado anteriormente, os cães misturados com grandes e pequenos ruminantes nas explorações, têm apresentado um papel importante na epidemiologia da brucelose. No entanto, cães vadios que permanecem soltos nas ruas e percorrem longas distâncias também atuam como disseminadores do agente e aumentam o risco de infecção de outros animais e humanos através da contaminação ambiental (Coelho *et al.*, 2015)

A sobrevivência de *Brucella* fora de um hospedeiro mamífero é relativamente persistente em comparação com outras bactérias patogénicas não esporuladas em circunstâncias semelhantes. Condições favoráveis são pH > 4, baixas temperaturas, ausência de luz solar direta e alta humidade. *Brucella* pode persistir por vários meses na água, placentas abortadas, fezes, lã, instalações, equipamentos e roupas (Coelho *et al.*, 2015). *Brucella* pode sobreviver por 40 dias em solo seco e 60 dias em solo húmido, 144 dias a 20 ° C e 40% de humidade relativa, por vários meses em água potável de 4 ° C a 8 ° C e dois anos e meio a 0 ° C, 30 dias na urina, 75 dias em fetos abortados, mais de 200 dias nas secreções uterinas e vários anos em tecidos congelados ou meios de cultura (Sammartino *et al.*, 2006).

1.6 Diagnóstico

São várias as provas que se podem fazer para diagnosticar brucelose, no entanto não existem testes com 100% de sensibilidade e especificidade. Devem-se considerar todos os fatores que afetam a relevância do método de teste e os resultados do teste para uma interpretação ou diagnóstico específicos (OIE, 2016).

O diagnóstico definitivo depende não só da manifestação de sinais clínicos (aborto, nascimento de animais débeis, retenção placentária e esterilidade de machos e fêmeas) e epidemiológicos (avaliação do histórico dos rebanhos nas explorações), como também do resultado de provas laboratoriais. O diagnóstico laboratorial da brucelose inclui:

- (i) o isolamento e identificação do agente etiológico (diagnóstico bacteriológico);
- (ii) a deteção de DNA dos microrganismos (diagnóstico molecular)
- (iii) a presença de anticorpos no sangue/soro e/ou leite (diagnóstico serológico).

O diagnóstico bacteriológico baseia-se no isolamento e classificação da bactéria, o que permite identificar a doença de um modo inequívoco. No entanto, apesar dos métodos bacteriológicos possuírem elevada especificidade e capacidade de diferenciação entre espécies e bio vares, são procedimentos muito complexos, demorados e com custos elevados. Estes métodos são realizados a partir do isolamento da bactéria nas amostras biológicas colhidas, com posterior identificação e tipificação (caracterização de bio vares). Em animais vacinados é necessário proceder a provas complementares para diferenciais entre estirpe de campo e vacinal.

No diagnóstico molecular existem diversos métodos para o estudo da diversidade e filogenia de *Brucella spp.* Testes como o *Multilocus Variable Number Tandem Repeat Analysis*, o *Multilocus Sequence Typing*, a análise de polimorfismos únicos, bem como a sequenciação de todo o genoma, têm mostrado ser muito eficientes na confirmação entre recidiva e reinfeção em humanos, na caracterização de surtos, na identificação de diferentes genótipos com diferentes potenciais patogénicos e na avaliação da estabilidade entre lotes de vacinas.

Existem testes de diagnóstico diretos, como os descritos anteriormente e testes de diagnóstico indiretos, que são aplicados *in vivo* (teste intradérmico) ou *in vitro* (principalmente ao leite ou sangue).

Após um primeiro contacto com um agente externo, o sistema imunológico produz proteínas (imunoglobulinas/anticorpos) específicas de uma célula ou partícula invasiva (antigénio). A resposta imune primária caracteriza-se pela produção de imunoglobulinas (Ig) do tipo IgM, embora as IgG ocorram rapidamente, com predominância das IgG1 e IgG2. A presença de IgM no soro a testar indica, geralmente, uma infeção recente, no entanto, a concentração destas tende a diminuir progressivamente, pelo que num estado avançado da doença a principal imunoglobulina detetada é do tipo IgG. Quando estes anticorpos específicos estão presentes na amostra animal, ligam-se aos antigénios com a formação de complexos imunes (complexo antigénio-anticorpo) que serão detetados nas técnicas imunológicas (Nielsen, 2002)

O teste intradérmico consiste na inoculação intradérmica de um extrato antigénico purificado de *B. abortus* (brucelina). A leitura da reacção é realizada 48 horas depois da inoculação. Esta prova não resulta em reacções falso positivas, sendo considerada uma prova de excelência para confirmação da infeção a nível individual (Ferreira & Simões, 2018)

Os métodos de diagnóstico serológico são métodos indiretos, e são os mais utilizados, devido não só à sua exequibilidade, mas também, porque permitem o diagnóstico rápido de um grande número de amostras. Estes métodos têm sido preferidos como técnicas de diagnóstico laboratorial, especialmente em programas oficiais de erradicação da brucelose. Baseiam-se na deteção de anticorpos específicos contra *Brucella spp* em vários fluídos corporais como leite, sangue, muco vaginal e sêmen (OIE, 2016).

Testes como a aglutinação Rápida com o antigénio Rosa de Bengala (RBT), Aglutinação Lenta, Fixação do Complemento (FC) e os ensaios imunoenzimáticos (ELISA, do inglês “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”) são os mais utilizados para o diagnóstico serológico da brucelose. A interpretação dos resultados obtidos nestas provas deve ser efetuada em conjunto com os dados clínicos e epidemiológicos existentes e, sobretudo, com o diagnóstico bacteriológico (*in vivo* ou *post-mortem*) que, no caso de ser positivo, confirma de modo inequívoco a doença (OIE, 2016)

O RBT é considerado um teste de rastreio adequado dado a sua simplicidade de execução, baixo custo e o facto de permitir a sua utilização em larga escala. O antigénio utilizado neste teste é uma suspensão de células de *B. abortus* a 8%, coradas pelo Rosa de Bengala e tamponado a pH 3.65, detetando maioritariamente imunoglobulinas do tipo IgG1 (OIE, 2016). É uma prova simples onde a reacção do antigénio com eventuais anticorpos

específicos, presentes na amostra de soro leva à formação e visualização de grumos (aglutinação). Os resultados expressam-se como positivos e negativos, não sendo possível quantificar a aglutinação. O RBT não diferencia os anticorpos vacinais dos anticorpos naturais, que são produzidos para combater uma infeção, podendo por isto dar resultados falsos positivos.

O teste de FC continua a ser considerado um teste sensível e mais específico, sendo utilizado como um teste confirmatório das reações positivas ao RBT (OIE, 2016; Alton *et al.*, 1988). Deteta maioritariamente anticorpos do isótipo IgG1. É uma técnica muito laboriosa que depende de produtos biológicos que limitam a sua utilização como teste de rotina. A prova consiste em duas fases: fixação e hemólise. Na primeira, a amostra de soro a testar e o antigénio de *brucella* são misturados com o complemento. Na segunda é adicionado o sistema hemolítico, que indica a fixação do complemento. Caso existam anticorpos específicos do antigénio no soro o complemento é fixado e consequentemente não haverá lise dos glóbulos vermelhos e o soro é positivo. Se não existirem anticorpos específicos, o complexo anticorpo-antigénio não se forma na primeira fase e o complemento permanece livre para lisar os glóbulos vermelhos originando hemólise, consequentemente o soro é negativo (Alton *et al.*, 1988). É uma prova complexa que exige uma elevada quantidade de reagentes, de controlos e titulações. A proporção destes reagentes (complemento, hemolisina, glóbulos vermelhos e diluente) deve ser cuidadosamente equilibrada para se obterem resultados credíveis (Alton *et al.*, 1988).

De um modo geral, a especificidade (capacidade de detetar animais verdadeiros negativos) e sensibilidade (capacidade de detetar animais verdadeiros positivos) dos testes RBT e FC podem ser limitadas pelo facto de detetarem com maior facilidade IgM presentes no soro, imunoglobulinas com menor especificidade antigénica. Em algumas ocasiões não é detetada nenhuma resposta humoral ou podem ser detetadas respostas inespecíficas, confundindo a interpretação dos resultados obtidos (Nielsen, 2002). Estes resultados são muitas vezes atribuídos a reações falso-positivas, que se devem a reações cruzadas entre as espécies lisas de *Brucella* e outras bactérias com estrutura antigénica similar, especialmente a *Yersinia enterocolitica* O:9 (Corbel & Cullen, 1970). Acresce que, como a maioria dos testes sorológicos, além de não serem suficientemente específicos na presença de reações falso-positivas, estes testes podem resultar positivos em ruminantes após a vacinação contra *B. abortus* S19 ou *B. melitensis* Rev.1 (OIE, 2016).

1.7 Controlo e Prevenção da Brucelose na Namíbia

A brucelose pode ser considerada um paradigma para a necessidade de uma estratégia “Um mundo, Uma saúde” (*One World, One Health*), dado que o controlo e consequente erradicação da doença passa pela cooperação entre a indústria, os produtores e autoridades de saúde pública e veterinária. O conceito *One World, One Health* engloba a metodologia que a saúde humana, animal e ambiental estão intimamente ligadas e que a melhoria numa destas áreas está sujeita à interdependência de todas as três. Assim, a colaboração entre profissionais das várias disciplinas e setores é fundamental para se chegar a soluções que levem à mitigação de doenças como a brucelose.

De acordo com Corbel (2006) as medidas de prevenção da brucelose incluem:

- a seleção criteriosa de animais aquando da compra ou introdução de animais nos rebanhos, devendo estes ser descendentes de animais livre de *brucella*. Devem ser também realizados testes serológicos antes da colocação no rebanho;
- evitar contacto e mistura com rebanhos de estatuto desconhecido para a doença;
- Se possível deve ser realizada assistência técnica para diagnosticar a causa de abortos, partos prematuros e outros sinais clínicos. Os animais suspeitos devem ser isolados até a realização de testes de diagnósticos apropriados;
- Deve efetuar-se a destruição adequada de placentas e fetos abortados (enterro ou queima), e a desinfeção das áreas contaminadas deve ser feita cuidadosamente.

Para o controlo e erradicação da brucelose animal devem-se implementar medidas de higiene, vacinação e teste e abate de animais seropositivos (Corbel, 2006)

Atualmente não há vacinas contra *Brucella* disponíveis para uso em humanos e as vacinas disponíveis para uso em animais não permitem a diferenciação entre animais infetados e vacinados, em testes de diagnóstico sorológico (Mandal *et al.* 2017) distinção imperativa para avaliar o sucesso de qualquer programa de vacinação e para estimar verdadeira prevalência da doença depois da administração das vacinas.

A brucelose é uma das poucas doenças bacterianas nas quais as vacinas vivas são eficientes (Moreno, 2014). Na Namíbia a vacinação de vitelos é obrigatória antes dos 9 meses, e programas de controlo de movimentação de animais estão em vigor (Ducrotoy *et al.* 2015)

Para o controlo e prevenção da brucelose é fundamental aplicar iniciativas que ensinem as pessoas a proteger-se a si mesmas, às suas famílias e às suas comunidades da doença por meio de melhorias sustentáveis e da educação. Algumas áreas de foco possíveis são o saneamento e higiene, segurança alimentar, biossegurança e técnicas de gestão de animais que sejam cultural e financeiramente viáveis.

Na Namíbia a brucelose é uma doença de declaração obrigatória. Existe um grande esforço por parte das entidades públicas competentes em implementar programas de controlo e erradicação da brucelose eficazes, no entanto, a verdadeira situação no país não se encontra devidamente documentada.

No país é obrigatória a vacinação de bovinos antes dos nove meses de idade, sendo a vacina S19 aplicada a vitelos que tenham entre três e oito meses e a vacina RB51 a vitelos com idade superior a oito meses. No entanto a vacinação do efetivo caprino e ovino é voluntária.

São realizados testes serológicos (FC) obrigatórios a todos os animais importados.

Quando um animal é testado positivo, o proprietário tem um prazo de 30 dias para efetuar o abate, sob a supervisão de um veterinário oficial.

1.8 Caracterização das explorações na área de reserva comunal no distrito de Okakarara na Namíbia e os fatores de risco de maior relevância a nível local para brucelose bovina

Áreas de reserva comunitárias são entidades democráticas autónomas, administradas por membros eleitos pela comunidade local, com limites fixos acordados com as comunidades ou proprietários de terras adjacentes (Els, 2004; Weaver & Petersen, 2008)

Estas unidades de reserva são reconhecidas pelo Ministério do Meio Ambiente e Turismo da Namíbia e são obrigadas a ter planos de gestão da vida selvagem, a realizar assembleias gerais anuais e a preparar relatórios financeiros. Cada área de reserva comunitária possui um plano de gestão do uso do território, definindo áreas demarcadas apenas para a vida selvagem e áreas utilizadas para outros fins (por exemplo, agricultura ou produção animal). Este conceito de gestão do território fornece mecanismos para mitigar o grande conflito existente entre o Homem e a vida selvagem.

Áreas de reserva comunais foram legalmente criadas para o usufruto da comunidade de forma sustentável dos recursos naturais e fauna selvagem. São dados incentivos financeiros de maneira a promover uma maior valorização da fauna selvagem e estimular comunidades a incorporar práticas de conservação da vida selvagem em estratégias de subsistência diárias.

O conflito existente entre o homem e a fauna selvagem é agravado pela competição por comida e espaço. Sendo a pecuária uma estratégia de investimento importante para as comunidades locais, a predação por carnívoros selvagens torna-se uma ameaça direta à sua subsistência. Com o estabelecimento de áreas de reserva comunitárias, o governo compensa monetariamente perdas de animais por predação e adota outras medidas de incentivo a uma coexistência pacífica.

O sistema de gestão pecuária praticado no distrito de Okakarara apresenta vários desafios relevantes para a sustentabilidade económica e ambiental e para a manutenção da sanidade animal dentro das explorações. Nomeadamente o elevado número de animais por exploração, as explorações mistas (com produção de grandes e pequenos ruminantes nos mesmos parques), a partilha de pontos de água e de comida, o contacto com fauna selvagem e, sobretudo, a falta de conhecimento dos proprietários acerca de boas práticas de sanidade animal (Hangara *et al.*, 2011)

Nas áreas de reserva comunitárias da região, a produção animal é feita em regime extensivo e os animais são criados para ambas produção leiteira e de carne. O efetivo geralmente pertence a uma família e não a um indivíduo, e os subprodutos das explorações servem normalmente para a subsistência familiar e não para fins comerciais (Mendelsohn, 2006).

As explorações são bastante rústicas, sem grandes infraestruturas associadas, sendo estas muitas vezes constituídas por uma manga rudimentar, ou um corredor improvisado com os materiais disponíveis (Figura 1). Ainda relativamente a infraestruturas de apoio á exploração, normalmente existem áreas cercadas, próximas das zonas residenciais, onde os animais ficam confinados durante a noite. No entanto, nas explorações tradicionais, não existem áreas especificamente designadas para ordenhas, partos e isolamentos.



Figura 1: Mangas de contenção em duas explorações

A rotina de pasto dos animais em produção é baseada num sistema itinerante ou nomádico, onde os animais pastam livremente em zonas não cercadas e ao fim do dia regressam às explorações (Figura 2). Durante o dia os animais são acompanhados por um pastor e um cão aquando do pasto, para proteção do efetivo contra ataques por fauna selvagem (Mendelsohn, 2006).



A alimentação dos animais é baseada unicamente no pasto disponível, não havendo qualquer suplementação nutricional adicionada à dieta, com exceção de pedras de sal junto aos pontos de água (Mendelsohn, 2006) (Figura 3).



Os pontos de água são muitas vezes partilhados por diferentes explorações (Figura 4)



Figura 4: A partilha de bebedouros por diferentes grupos de animais é comum nas áreas de reservas comunitárias da região de Otjozondjupa

As comunidades das áreas de reserva comunais do distrito de Okakarara são compostas maioritariamente por Hereros. A cultura herero está intimamente relacionada com a produção pecuária. A riqueza e influência social é, culturalmente, medida através do tamanho do efetivo. A maior evidência da importância tradicional da produção de bovinos são os trajes usados pelas mulheres da tribo, que se assemelham à figura de um bovino.

Como foi descrito no capítulo dos fatores de risco para brucelose, a incidência da doença é maior nas áreas de produção pastoril e diminui com o tamanho do rebanho e tamanho da propriedade (McDermott, Arimi, 2002). Está também associada à movimentação extensiva do gado e à presença de pastos e fontes de água de uso comum a diversos rebanhos. Segundo Magona et al. (2009) alguns dos fatores responsáveis pelo aumento da transmissão no sistema pastoril incluem a movimentação intensa do gado, o maior número de animais, a maior possibilidade de contacto com ruminantes selvagens infetados e o agrupamento de rebanhos em áreas comuns de pastagem e fonte de água (Figura 5).



Figura 5: Coexistência de ruminantes domésticos com a fauna selvagem; foto tirada em área de reserva comunitária adjacente à região em estudo.

Fonte: G. Potgieter *In*: conservationnamibia.com/factsheets/communal-conservancies.php

Previamente à elaboração da componente prática desta dissertação, e dada a ausência de literatura ou de relatórios com o histórico sanitário das explorações, foi realizada uma revisão teórica dos fatores de risco de maior relevância para a zona em estudo.

Devido às características das explorações acima descritas, e com o fundamento teórico exposto no capítulo dos fatores de risco, depreende-se que os fatores de risco para a brucelose bovina com maior relevância na área em estudo são:

- o elevado número de animais por exploração;
- as produções de várias espécies na mesma exploração;
- a partilha de água e de comida;
- o contacto com a fauna selvagem.

1.9 Objetivos

Este estudo teve como objetivos específicos:

- Determinar a seroprevalência da brucelose bovina numa área rural da Namíbia;
- Caracterizar e avaliar os conhecimentos, as práticas e as atitudes dos produtores de animais relativamente à brucelose bovina;
- Identificar os fatores de risco específicos da população em estudo.

2. Materiais e Métodos

2.1 Área de Estudo

A área selecionada para este estudo foi a antiga “terra de hereros” (*Hereloland*), que agora consiste em herdades comerciais e comunitárias nas regiões de *Omaheke* e *Otjozondjupa*, no centro-este da Namíbia, pertencente à área de conservação da paisagem do grande Waterberg (tradução do inglês *Greater Waterberg Landscape Conservation Area*). Apenas as herdades comunitárias da região de Otjozondjupa, distrito de Okakarara foram selecionadas para este estudo (Figura 6)

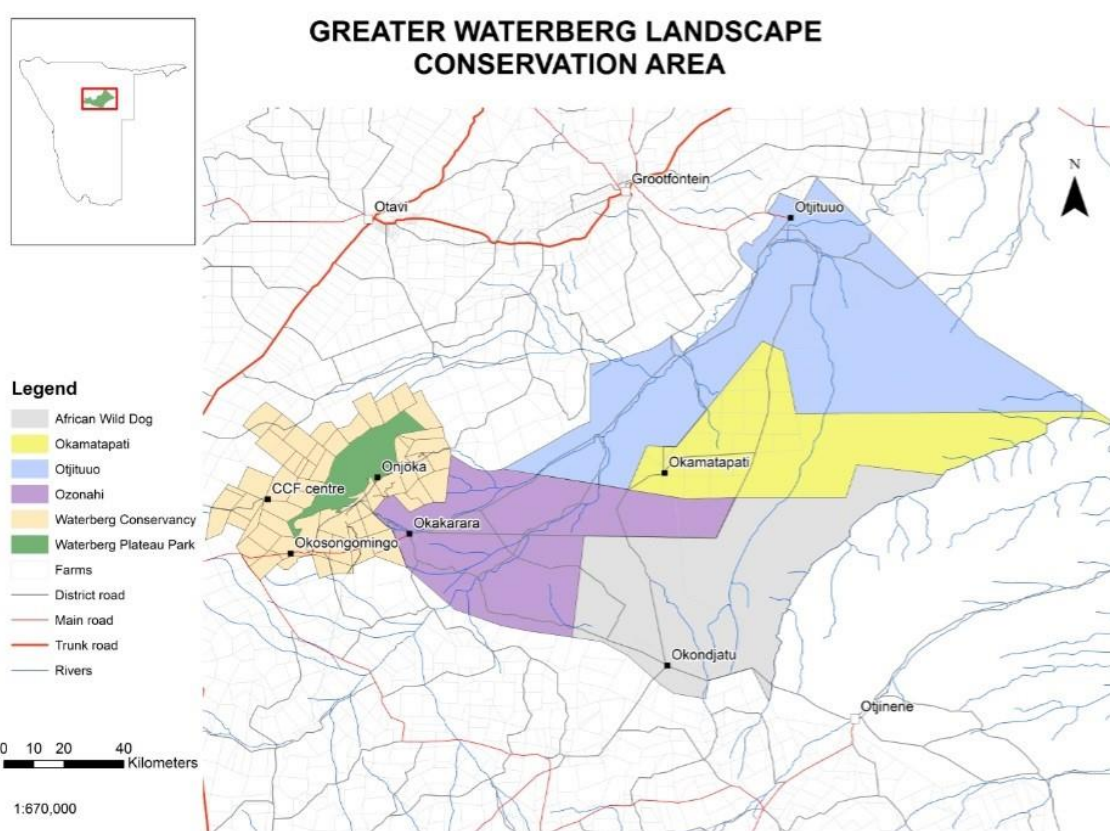


Figura 6: Mapa da reserva da paisagem do grande Waterberg. Fonte: CCF

A área de reserva do distrito de Okakarara tem uma extensão de 18.951km² e consiste em quatro unidades de reserva comunitárias: *African Wild Dog*, *Okamatapati*, *Otjituuo* e *Ozonahi*. Estas unidades de reserva comunitárias foram publicadas pelo Ministério do Meio Ambiente e Turismo da Namíbia (MET) em 2005, integrando o programa de Gestão de recursos

naturais com base na comunidade da Namíbia (MET / NACSO, 2018; Naidoo et al., 2011) (Figura 6).

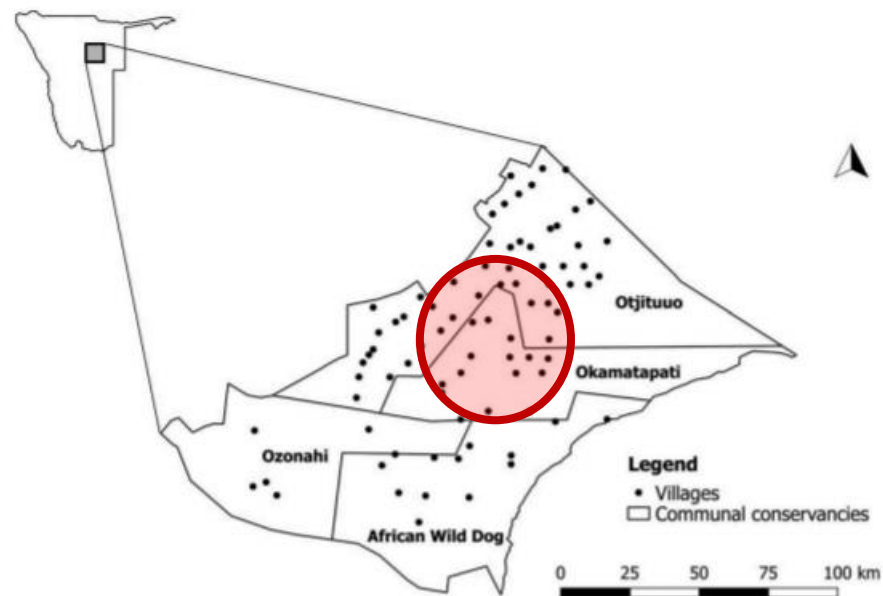


Figura 7: Mapa das vilas da área de reserva comunitária do distrito de Okakarara, com a zona de grande conflito entre humanos e vida selvagem destacada. Fonte: CCF

A área de estudo restringiu-se a uma zona de grande conflito entre humanos e vida selvagem (*high human-wildlife conflict zone*), de 3191.3km², onde estão instaladas 74 explorações (Figura 7), das quais 14 foram visitadas.

Como já foi mencionado anteriormente, culturalmente na produção comunitária de bovinos, os animais estão totalmente dependentes do pastoreio disponível para suprir as suas necessidades nutricionais. Não são fornecidos suplementos adicionais e é praticada muito pouca gestão sanitária.

Na região de estudo são predominantemente usadas raças para produção de carne bovina, as raças puras e cruzamentos mais populares são Brahman, Bonsmara, Simmentaler e Simbra. Os produtores muitas vezes mantêm ovelhas de raça Damara, cabras indígenas e galinhas juntamente com o gado bovino.

2.2 Caracterização da amostra

O estudo de seroprevalência de brucelose bovina foi realizado sobre uma amostra de 186 soros de bovinos, colhidos pela autora do estudo e pela equipa de veterinários da fundação CCF. As amostras foram obtidas ao longo do mês de novembro de 2019 e provenientes de 14 propriedades de uma zona rural do distrito de Okakarara.

Um estudo baseado em inquéritos aos responsáveis de produção foi conduzido simultaneamente ao estudo de seroprevalência de brucelose bovina.

Todos os participantes neste estudo participaram de forma voluntária e foram informados sobre o propósito e métodos em prática, consentindo o uso das informações fornecidas para a realização deste estudo.

Não foram recolhidas informações sobre a identidade dos participantes, a fim de garantir que as informações obtidas nos questionários e no estudo de seroprevalência não pudessem ser rastreadas.

2.3 Colheita das amostras e obtenção do soro

O sangue foi colhido a partir veia jugular dos animais, utilizando-se tubos de vácuo, sem anticoagulante, e agulha. (Figura 8). As amostras de sangue foram armazenadas dentro de arcas com temperatura controlada (aproximadamente 26°C) até à chegada ao laboratório onde se procedeu à obtenção do soro, através de centrifugação a 1370g durante cinco minutos. Após a centrifugação o soro foi transferido para tubos limpos e congelado a temperaturas inferiores a -20°C.



Figura 8: Dr. Moyo no procedimento de colheita de sangue

2.4 Realização dos questionários:

Foram aplicados questionários que consistiam em 21 questões fechadas, de resposta dicotômica e de escolha múltipla. Com estes questionários pretendia-se identificar potenciais fatores de risco de infeção da população com brucelose.

O questionário realizado foi adaptado do trabalho executado por Cloete *et al.* (2019) numa área de reserva comunal na África do Sul, estando dividido em duas partes: a primeira parte destinou-se à identificação de algumas características demográficas da população em estudo e à caracterização das explorações visitadas; a segunda parte inquiriu os entrevistados acerca de questões relacionadas com o seu conhecimento, atitudes e práticas relativamente à brucelose bovina.

Em cada propriedade foi realizado um questionário ao proprietário ou responsável de produção. O questionário foi realizado oralmente em todas as propriedades visitadas, sendo traduzido para inglês, otjiherero e afrikaans, consoante a preferência do entrevistado (Figura 9) - ver Apêndices

Para a análise dos dados obtidos através dos questionários foi usado o software de análise descritiva do MS Excel.



Figura 9: Dr. Sydney na realização de uma entrevista

2.5 Diagnóstico serológico: teste Rosa de Bengala (RBT)

Todos os soros foram testados no RBT de acordo com o procedimento PE-001-PSA/LNR-BR do INIAV, IP. Foi misturado um volume igual de soro e antígeno Rosa Bengala (IDEXX, Hoofddorp, The Netherlands) em placas de vidro escavadas e, após agitação durante 4 minutos, qualquer grau de aglutinação visível foi registado como reação positiva e na ausência de reação como negativa. A prova é validada se o soro de controlo positivo (P1; INIAV, Oeiras, Lisboa) obter um grau de aglutinação +++, o controlo interno (P3; INIAV, Lisboa, Portugal) um grau de ++ e o negativo (NRS; INIAV, Lisboa, Portugal) não obtiver qualquer aglutinação.

Todos os testes de RB foram realizados no laboratório de ciências biomédicas da ONG Cheetah Conservation Fund. Para a análise dos dados obtidos foi utilizado o software MS Excel 365.

3. Resultados

3.1 Questionários

3.1.1 Características demográficas e das explorações

Foram entrevistados durante a realização deste estudo um total de 14 proprietários ou responsáveis de produção, de diferentes explorações na região em estudo, dos quais 93% eram do sexo masculino (Tabela 1). O participante mais novo tinha 21 anos de idade e o mais velho 78, sendo a média de idades 49 (Desvio Padrão [DP] = 17).

Setenta e um por cento (10/14) das explorações praticam um sistema de pastoreio free-range, onde os animais partilham pontos de bebida e comida, se misturam com grupos de animais de diferentes explorações e pastam em áreas não cercadas. Sendo que quatro das explorações visitadas possuíam áreas cercadas designadas ao pasto dos animais, comprometendo o contacto com animais de outras explorações, no entanto é praticada partilha de pontos de água.

Todos os participantes utilizam os animais para produção leiteira e de carne.

Quando questionados acerca do contacto do efetivo com outros animais selvagens e domésticos, a totalidade dos entrevistados respondeu afirmativamente a animais domésticos, e 86% (12 em 14 participantes) respondeu afirmativo a animais selvagens.

As frequências das respostas registadas relativas a características demográficas e características das explorações estão indicadas na Tabela 1.

Tabela 1: Respostas registadas relativamente a características demográficas e das explorações nas áreas de reserva comunais do distrito de Okakarara, 2019		
Variável	Frequência	
	N	%
Género do proprietário N=14		
F	1	7
M	13	93
Idade do proprietário N=14		
20-30	1	7
31-50	7	50
51-70	3	21
>70	3	21
Número de animais por exploração N=14		
<100	4	29
100-200	5	36
200-300	2	14
300-400	1	7
>400	2	14
Tipo de exploração N=14		
Cercada	4	29
Free-range	10	71
Contacto de bovinos com animais domésticos N=14		
Sim	14	100
Não	0	0
° ** Quais N=48		
Cães	14	100
Gatos	5	36
Caprinos	11	79
Ovinos	9	64
Equinos	6	43
Galinhas	3	21
Contacto de bovinos com animais selvagens N=14		
Sim	12	86
Não	2	14
° ** Quais N=33		
Mabeco	11	92
Chacal de lombo negro	7	58
Hiena castanha	7	58
Leopardo	3	25
Chita	2	17
Antílopes	3	25
Legenda: ° questão válida apenas para participantes que responderam “Sim” na questão anterior ** Múltiplas respostas aceites		

3.1.2 Conhecimento, Atitudes e Práticas relativamente á brucelose bovina

Apenas seis dos 14 participantes entrevistados assumiu ter conhecimento acerca da brucelose, previamente à entrevista, sendo comum a todos a fonte de informação, serviços veterinários. A tabela 2 refere-se á frequência das respostas registadas pelos participantes relativamente a práticas e atitudes adotadas perante a brucelose bovina.

Apenas um dos seis participantes que respondeu afirmativamente à questão do conhecimento de brucelose prévio à entrevista, considerava que a brucelose podia ser transmitida a partir da partilha de pontos de água e comida. No entanto nenhum dos participantes tinha conhecimento que a doença podia afetar humanos, quais os sintomas que acarretava e como podia ser adquirida a infeção no Homem.

Setenta e nove por cento dos entrevistados desconhecia se havia histórico de brucelose ou abortos na exploração e apenas nove participantes (64%) afirmaram vacinar o efetivo bovino contra *brucella*.

Quarenta e três por cento (6/14) dos produtores entrevistados realizam abates de animais nas explorações, sem chamar um médico veterinário ou outra entidade responsável.

Cinquenta e sete por cento (8/14) afirmaram não adotar nenhuma medida particular face a animais que abortam, sendo que 79% assume que alimenta os cães com os produtos de aborto.

Relativamente à origem do leite e produtos derivados do leite todos os entrevistados dizem ser de produção própria. Setenta e um por cento (10/14) da população entrevistada consome o leite após um processo de fermentação, 21% (3/14) sem qualquer tratamento ao leite e apenas 7% (1/14) admite ferver o leite antes de consumir.

Todos os inqueridos responderam que o método de reprodução implementado na exploração é a “Monta Natural”.

Tabela 2: Respostas registadas relativamente aos conhecimentos, atitudes e práticas relativamente á brucelose bovina adotados nas explorações nas áreas de reserva comunais do distrito de Okakarara, 2019

Variável	Frequência	
	N	%
Detenção de conhecimento prévio acerca da brucelose N=14		
Sim	6	43
Não	8	57
° Onde adquiriu o conhecimento N=6		
Serviços veterinários	6	100
° Como ocorre a infeção em animais N=6		
Não sabe	5	83
Partilha de pontos de água e comida	1	17
Histórico de aborto na exploração N=14		
Sim	3	21
Não sabe	11	79
Vacina contra brucelose N=14		
Sim	9	64
Não	5	36
Abate de animais na exploração N=14		
Sim	6	43
Não	8	57
Maneio do animal que aborta N=14		
Abate do animal	1	7
Tratamento caseiro/tradicional	5	36
Nada	8	57
Maneio dos produtos de aborto N=14		
Alimentação dos cães	11	79
Enterra	1	7
Queima	1	7
Nada	1	7
Condições do leite consumido N=14		
Cru	3	21
Fermentado	10	71
Fervido	1	7

Legenda:

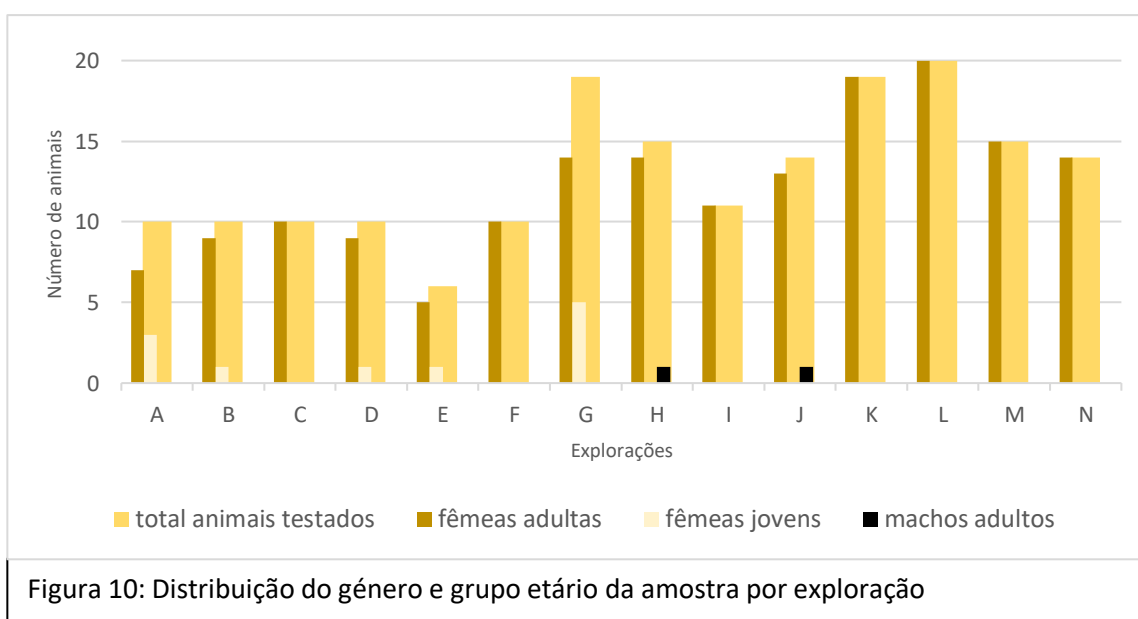
° questão válida apenas para participantes que responderam “Sim” na questão anterior

3.2 Teste de RB

A totalidade das amostras de soro bovino foram testadas de acordo com o procedimento PE-001-PSA/LNR-BR do INIAV, IP como descrito no capítulo 1 (1.7) deste trabalho.

Todos os testes realizados resultaram positivos. A média de animais testados por exploração foi 13.3 (DP=4.29).

Foram testadas amostras de soro pertencentes a 181 fêmeas, 170 adultas e 11 jovens (com menos de três anos). Os dois machos testados tinham mais de três anos (adultos). O gráfico apresentado na figura 10 representa a distribuição do gênero e idade dos 186 animais testados, distribuídos pelas diferentes explorações.



4. Discussão dos resultados

Neste estudo foram identificados vários comportamentos de risco para a ocorrência de brucelose nas explorações visitadas, nomeadamente efetivos pecuários muito numerosos, a produção de várias espécies na mesma exploração, a presença de cães que se alimentam de produtos de abortos, o contacto do efetivo com animais selvagens, o desconhecimento da ocorrência ou ausência de abortos e o consumo de leite não pasteurizado e a não vacinação contra brucelose. Estas práticas de risco podem ser explicadas pelo fraco conhecimento de aspetos específicos e gerais relativos à doença.

Os resultados obtidos neste trabalho, relativos à falta de conhecimento detido pela população acerca da doença, são compatíveis com estudos do género, publicados em diferentes países (Lindahl *et al.*, 2015). No entanto Cloete *et al.* (2019) na África do Sul, Kang'ethe *et al.* (2007) no Quênia, Kansiime *et al.* (2014) no Uganda e Holt *et al.* (2011) no Egito, avaliaram os conhecimentos, atitudes e práticas relativas á brucelose em populações de zonas rurais e obtiveram resultados contrários, onde a população detinha níveis de conhecimentos moderados a elevados relativos à doença. Os autores explicam estes resultados pelo facto de serem zonas endémicas de brucelose. O conhecimento da doença por parte dos produtores foi relacionado a menores riscos de exposição à brucelose. (Matope *et al.*, 2010).

As várias práticas de risco identificadas e reportadas pelos participantes podem influenciar a epidemiologia da brucelose bovina na região. Estas práticas são descritas por diversos autores como fatores de risco para a infeção humana e animal, e estão resumidas na Tabela 3.

Tabela 3: Resumo dos fatores de risco encontrados nas áreas de reserva comunitárias da região de Okakarara

Variável	Descrição dos efeitos		Referências
Número de efetivo	71% dos produtores possuíam efetivo >100 animais	– Maiores taxas de infecção em grupos grandes	Al-Majali <i>et al.</i> (2009); McDermott, Arimi (2002); Muma <i>et al.</i> (2006); Matope <i>et al.</i> (2010)
Fontes de água e comida de uso comum	71% partilha pontos de água e pasto (free-range), sendo que restantes partilham pontos de água com explorações adjacentes	– Maior probabilidade de transmissão para as propriedades que partilham pasto ou água	Muma <i>et al.</i> (2007), Al-Majali <i>et al.</i> (2009), Islam <i>et al.</i> (2013)
Exploração de sistema extensivo	71% em free-range. Os animais pastam durante o dia partilhando o ambiente com animais domésticos e selvagens.	– Maior prevalência associada ao transito de animais mais intenso e possibilidade de contacto com maior número de animais e locais infetados	McDemott, Arimi (2002), Megersa <i>et al.</i> (2011)
Coexistência com outras espécies	Todos os produtores que participaram no estudo, simultaneamente à produção de bovinos, detinham outras produções como de ovinos (64%) e caprinos (74%) 86% dos participantes assume o contacto do seu efetivo com fauna selvagem.	– Maior prevalência de brucelose bovina em propriedades que favorecem a transmissão de <i>B.melitensis</i> ou <i>B.suis</i> para bovinos – Maior taxa de infecção e transmissão de <i>Brucella spp</i> por contacto com animais silvestres	Al-Majali <i>et al.</i> (2009), Godfroid, Kasbohrner (2002), Samartino (2002), Holt <i>et al.</i> (2011), Megersa <i>et al.</i> (2011)
Boas práticas de manejo e sanitárias	57% dos produtores não toma qualquer precaução com o animal que aborta e 36% recorre a tratamentos tradicionais. Os produtos de aborto em 79% das explorações são entregues aos cães para a sua alimentação.	– Boas práticas de manejo e sanitárias em relação a restos placentários e fetos abortados diminuem o risco de infecção	Al-Majali <i>et al.</i> (2009)

A prática de abate de animais reprodutores nas explorações é um fator de risco para a infecção, uma vez que tanto a carcaça como as vísceras e a formação de aerossóis podem contaminar o ambiente e o Homem.

Na questão que abordava o manejo do animal que abortava, embora tivesse sido dada a opção de escolha “chamar o médico veterinário”, nenhum dos participantes a selecionou. Um proprietário assumiu que recorria ao abate do animal e oito proprietários ficam indiferentes, não tomando qualquer medida especial. Cinco proprietários selecionam tratamento tradicional, que consiste na administração através da alimentação de uma mistura de ervas específica.

Os produtos de abortos como fetos e os seus anexos, restos placentários e líquidos vaginais oriundos de animais infetados, são materiais de alto risco de contaminação para outros animais e ambiente. É necessário um manejo adequado destes materiais para proteger da infecção. No entanto as práticas reportadas pelos produtores participantes neste estudo, foram alarmantes. A maioria dos produtores alimenta os cães com os produtos de aborto. Mais uma vez, embora existam evidências científicas que indiquem o grande potencial de cães adotarem comportamento de vetores para a disseminação da brucelose, e eles próprios contraírem a doença; a falta de conhecimentos relativos à temática levam os produtores a agirem em não conformidade com as normas de prevenção e controlo da brucelose.

As práticas de consumo de leite registadas constituem um elevado risco para a disseminação da doença na população humana. Como descrito anteriormente, o principal meio de infecção humana é através do consumo de leite não pasteurizado. A sobrevivência de *brucella* no leite e seus derivados está relacionada com humidade, temperatura e mudanças de pH.

Setenta e um por cento dos produtores entrevistados consomem leite fermentado. O leite fermentado é um ingrediente tradicional e comum do país, sendo usado para a produção de diversas bebidas (como *dikmelk* e *suurmelk*) e iogurte. O processo para a obtenção deste ingrediente passa por deixar o leite a fermentar durante três ou quatro dias a temperatura ambiente (30-37°C). Este processo não é suficiente para a eliminação de *brucellae* do leite, pondo em elevado risco a população.

Como discutido anteriormente a vacinação contra a brucelose é obrigatória na Namíbia. Das explorações estudadas, apenas cinco não vacinava o efetivo.

O RBT é um teste de diagnóstico muito sensível (cerca de 98% sensibilidade). No entanto, devido à sua composição antigénica, pode dar origem a reações serológicas falso-positivas (OIE, 2006), não só devido à reação cruzada com outras bactérias gram-negativas, como a *Escherichia coli* O:116, *E. coli* O:157, *Vibrio cholerae* O:1 ou *Yersinia enterocolitica* como também devido à vacinação com a vacina S19 ou REV1 (OIE, 2006; Nielsen, 2002).

A totalidade de resultados positivos no RBT, não permite tirar conclusões acerca da situação epidemiológica da brucelose na região em estudo.

As reações positivas devem ser investigadas usando testes de diagnóstico confirmatórios ou complementares, assim como uma extensa investigação epidemiológica (OIE, 2006).

5. Conclusões

Na Namíbia não existem estudos que avaliem a eficácia dos programas de vigilância e controlo aplicados pelas autoridades competentes a nível nacional.

Têm sido realizados diversos estudos baseados em inquéritos epidemiológicos e questionários CAP noutros países em desenvolvimento, como a Jordânia, Egito, Tajiquistão, Uganda, Nigéria e Quênia que forneceram informações críticas e relevantes e que auxiliaram a investigação de potenciais fatores de risco, bem como a elaboração de estratégias de intervenção e prevenção da doença. Estes estudos destacaram a necessidade da educação sobre a brucelose para a melhoria da prevenção e gestão da doença, abordando deficiências específicas de cada país (Cloete *et al.*, 2019)

Na área rural do distrito de Okakarara, embora os esforços feitos pelas autoridades competentes, há uma grande falha em termos de informação disponibilizada à população relativamente ao seu efetivo pecuário. Particularmente referente à educação e formação da população relativamente a medidas de controlo de doenças de cariz zoonótico.

Os resultados do teste de RB mostraram-se na sua totalidade positivos. Estes resultados foram considerados inconclusivos, uma vez que não se reuniram provas epidemiológicas suficientes para se sugerir que se tratava de uma infeção ativa na população, sendo o principal motivo a ausência de sinais clínicos quer na população humana como na população animal.

Não obstante do facto de se terem assumidos os resultados como inconclusivos, todas as amostras deveriam ser novamente testadas, recorrendo a métodos de diagnóstico confirmatórios. Isto não foi possível durante a realização deste trabalho devido a determinadas limitações (descritas no ponto 6 deste capítulo) inerentes a processos burocráticos de exportação de amostras da Namíbia para Portugal.

A situação epidemiológica da brucelose na região em estudo carece de informação, e os dados obtidos neste trabalho não permitem retirar uma conclusão indubitável relativamente à seroprevalência da doença.

6. Limitações do estudo

Barreira linguística: Embora tenham sido feitas traduções do questionário do português para o inglês, Otjiherero e Afrikaans, em algumas situações houve muita dificuldade em explicar as questões do questionário;

Falta de experiência no manejo animal: Na seleção dos bovinos para a recolha de amostras sanguíneas, notou-se inexperiência por parte dos trabalhadores das explorações, uma vez que a colocação dos animais na manga apresentou-se ser um desafio.

Condições das explorações: para a colheita das amostras sanguíneas de maneira segura são necessários alguns equipamentos técnicos para a contenção dos animais. Em algumas das explorações visitadas as laterais das mangas eram constituídas por longos troncos de árvores, que para além de não garantirem a segurança da equipa e dos animais, dificultaram a colheita da quantidade necessária de sangue.

Distância do laboratório e condições climáticas: O estudo foi realizado numa zona rural no distrito de Okakarara que se encontra a 250km do laboratório onde foram realizadas as provas serológicas. A temperatura ambiente durante a colheita variou entre 30°C a 45°C, o que conduziu a que o armazenamento das amostras fosse feito dentro de arcas frigoríficas que estavam programadas para os 26°C. As arcas mantiveram-se ligadas à viatura de transporte, durante o máximo de tempo possível durante o dia (Figura 11a).

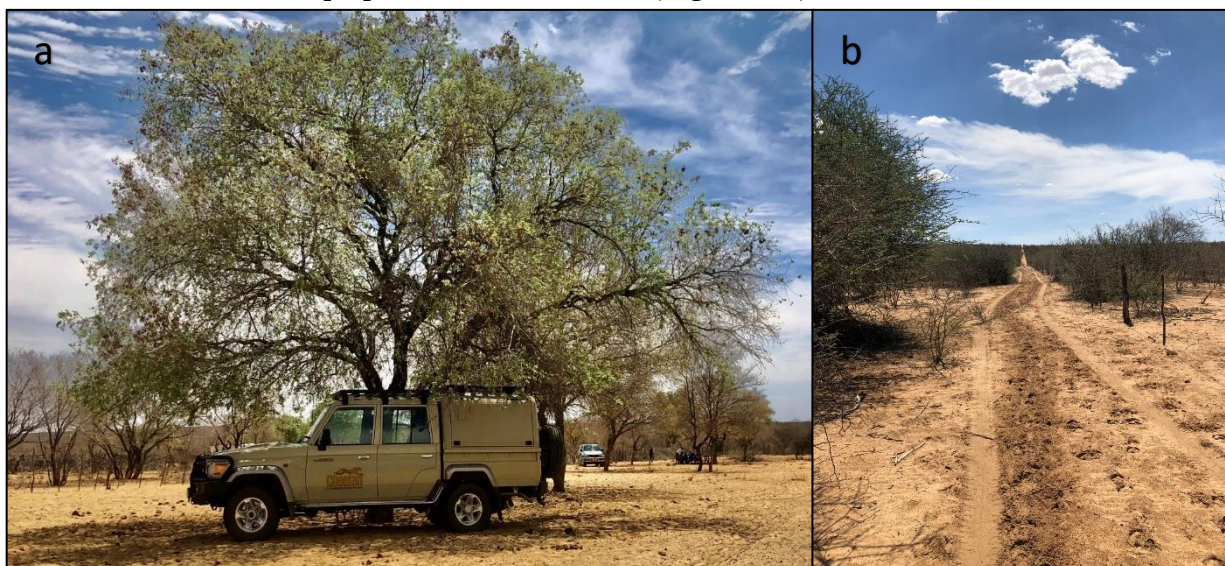


Figura 11: a) Meio de transporte usado durante o estudo; b) condições das estradas na região em estudo

Ausência de histórico de vacinação: durante a realização deste estudo, verificou-se a ausência de histórico de vacinação nas explorações visitadas, impossibilitando a verificação do estatuto sanitário dos animais sujeitos ao estudo.

Impossibilidade de exportar as amostras para realização de mais testes de diagnóstico: O protocolo delineado no início do estudo previa o envio das amostras positivas para o laboratório do INIAV, IP Lisboa, para a execução de testes confirmatórios de diagnóstico. No entanto isto não foi permitido, uma vez que nunca foi emitida uma licença de exportação por parte das entidades competentes namibianas.

COVID-19: Inicialmente foram planeadas 3 visitas à área de estudo, de maneira que se obtivesse uma amostra heterogénea e suficientemente grande para se averiguar uma prevalência da brucelose na região. Devido à pandemia causada pelo covid-19, a Namíbia entrou em *lockdown* no início de 2020, proibindo a deslocação entre regiões, o que tornou impossível as visitas agendadas para a continuação do estudo.

7. Referências:

Ahmed, M. O., Elmeshri, S. E., Abuzweda, A. R., Blauo, M., Abouzeed, Y. M., Ibrahim, A., Salem, H., Alzwam, F., Abid, S., Elfahem, A., & Elrais, A. (2010). Seroprevalence of brucellosis in animals and human populations in the western mountains region in Libya, December 2006-January 2008. *Euro surveillance: bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 15(30), 19625.

Akakpo, A. J., & Bornarel, P. (1987). Epidémiologie des brucelloses animales en Afrique tropicale: enquêtes clinique, sérologique et bactériologique. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz*, 6, 981-4181027.

Al-Majali, A. M., Al-Qudah, K. M., Al-Tarazi, Y. H., & Al-Rawashdeh, O. F. (2008). Risk factors associated with camel brucellosis in Jordan. *Tropical animal health and production*, 40(3), 193–200. <https://doi.org/10.1007/s11250-007-9080-7>

Al-Majali, A. M., Talafha, A. Q., Ababneh, M. M., & Ababneh, M. M. (2009). Seroprevalence and risk factors for bovine brucellosis in Jordan. *Journal of veterinary science*, 10(1), 61–65. <https://doi.org/10.4142/jvs.2009.10.1.61>

Al-Talafhah, A. H., Lafi, S. Q., & Al-Tarazi, Y. (2003). Epidemiology of ovine brucellosis in Awassi sheep in Northern Jordan. *Preventive veterinary medicine*, 60(4), 297–306. [https://doi.org/10.1016/s0167-5877\(03\)00127-2](https://doi.org/10.1016/s0167-5877(03)00127-2)

Alton GG. *Brucella melitensis* (1990) In: Nielsen K, Duncan JR, editors. *Animal Brucellosis*. Florida: CRC Press

Alton, G. G., Jones, L. M., Angus, R. D., & Verger, J. M. (1988). Techniques for the brucellosis laboratory. Institut National de la recherche Agronomique (INRA).

Ashagrie, T., Deneke, Y., & Tolosa, T. (2011). Seroprevalence of caprine brucellosis and associated risk factors in South Omo Zone of Southern Ethiopia. *African Journal of Microbiology Research*, 5(13), 1682-1685.

Baek, B. K., Lim, C. W., Rahman, M. S., Kim, C. H., Oluoch, A., & Kakoma, I. (2003). *Brucella abortus* infection in indigenous Korean dogs. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire*, 67(4), 312–314.

Blasco J. M. (1997). A review of the use of *B. melitensis* Rev 1 vaccine in adult sheep and goats. *Preventive veterinary medicine*, 31(3-4), 275–283. [https://doi.org/10.1016/s0167-5877\(96\)01110-5](https://doi.org/10.1016/s0167-5877(96)01110-5)

Borba, M. R., Stevenson, M. A., Gonçalves, V. S., Neto, J. S., Ferreira, F., Amaku, M., Telles, E. O., Santana, S. S., Ferreira, J. C., Lôbo, J. R., Figueiredo, V. C., & Dias, R. A. (2013). Prevalence and risk-mapping of bovine brucellosis in Maranhão State, Brazil. *Preventive veterinary medicine*, 110(2), 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.11.013>

Bricker, B. J., & Halling, S. M. (1994). Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *Journal of clinical microbiology*, 32(11), 2660–2666. <https://doi.org/10.1128/JCM.32.11.2660-2666.1994>

Cardoso, P. G., Macedo, G. C., Azevedo, V., & Oliveira, S. C. (2006). *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microbial cell factories*, 5, 13. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-13>

Carvalho Neta, A. V., Mol, J. P., Xavier, M. N., Paixão, T. A., Lage, A. P., & Santos, R. L. (2010). Pathogenesis of bovine brucellosis. *Veterinary journal* (London, England: 1997), 184(2), 146–155. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.04.010>

CFSPH-Center for Food Security and Public Health. Brucellosis, 2009. www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis.pdf

Cloekaert, A., Vizcaíno, N., Paquet, J. Y., Bowden, R. A., & Elzer, P. H. (2002). Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present and future. *Veterinary microbiology*, 90(1-4), 229–247. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(02\)00211-0](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(02)00211-0)

Cloete, A., Gerstenberg, C., Mayet, N. & Tempia, S. (2019). Brucellosis knowledge, attitudes and practices of a South African communal cattle keeper group. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 86(1), 1-10. <https://dx.doi.org/10.4102/ojvr.v86i1.1671>

Coelho, A. C., Díez, J. G., & Coelho, A. M. (2015). Risk Factors for *Brucella* spp. in Domestic and Wild Animals. *Updates on Brucellosis*. doi:10.5772/61325

Coelho, AM; Díez, JG; Coelho, AC (2013). Brucelosis en pequeños rumiantes: efecto de la aplicación de un programa especial de vacunación en masa con REV-1. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria, 14(12),1-16 DOI: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=636/63632379002>

Corbel, M. J. Brucellosis in humans and animals. Who (2006). doi:10.2105/AJPH.30.3.299

Corbel, M. J., & Cullen, G. A. (1970). Differentiation of the serological response to *Yersinia enterocolitica* and *Brucella abortus* in cattle. *Epidemiology & Infection*, 68(4), 519-530.

Crawford, R. P., Williams, J. D., Huber, J. D., & Childers, A. B. (1979). Biotypes of *Brucella abortus* and their value in epidemiologic studies of infected cattle herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 175(12), 1274–1277.

Cvetnic, Z., Spicic, S., Curic, S., Jukic, B., Lojkic, M., Albert, D., Thiébaud, M., & Garin-Bastuji, B. (2005). Isolation of *Brucella suis* biovar 3 from horses in Croatia. *The Veterinary record*, 156(18), 584–585. <https://doi.org/10.1136/vr.156.18.584>

Depner, K. (2010). *Brucellosis in domestic ruminants, game and man in Namibia: a serosurvey using different diagnostic methods*. 1993.

Díaz Aparicio E. (2013). Epidemiology of brucellosis in domestic animals caused by *Brucella melitensis*, *Brucella suis* and *Brucella abortus*. *Revue scientifique et technique* (International Office of Epizootics), 32(1), 43–60.

Ducrotoy, M. J., Bertu, W. J., Ocholi, R. A., Gusi, A. M., Bryssinckx, W., Welburn, S., & Moriyón, I. (2014). Brucellosis as an emerging threat in developing economies: lessons from Nigeria. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(7), e3008. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003008>

Els, J. (2004). *Draft Country Report Namibia (Rep.)*. [doi:http://www.fao.org/3/a1250e/annexes/CountryReports/Namibia.pdf](http://www.fao.org/3/a1250e/annexes/CountryReports/Namibia.pdf)

European Food Safety Authority (EFSA). (2009). Porcine brucellosis (*Brucella suis*). *EFSA Journal*, 7(6), 1144.

Ferreira, A., Simões, A. *Controlo laboratorial da brucelose em ruminantes e suídeos*”. *Vida Rural*, Nº28, julho/agosto 2018

Ferreira, A., Simões, A. *Controlo laboratorial da brucelose em ruminantes e suídeos*”. *Vida Rural*, Nº28, julho/agosto 2018

Ficht T. (2010). *Brucella* taxonomy and evolution. *Future microbiology*, 5(6), 859–866. <https://doi.org/10.2217/fmb.10.52>

Foster, G., Osterman, B. S., Godfroid, J., Jacques, I., & Cloeckert, A. (2007). *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(Pt 11), 2688–2693. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65269-0>

- Garcia M.M., Brooks B.W., Ruckerbauer G.M., Rigby C.E. & Forbes L.B. (1988). – Characterization of an atypical biotype of *Brucella abortus*. *Can. J. vet. Res.*, 52 (3), 338–342.
- Godfroid J. (2002). Brucellosis in wildlife. *Revue scientifique et technique* (International Office of Epizootics), 21(2), 277–286. <https://doi.org/10.20506/rst.21.2.1333>
- Godfroid, J. & Käsbohrer, A. (2002). Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty-first century. *Veterinary microbiology*, 90(1-4), 135–145. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(02\)00217-1](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(02)00217-1)
- Godfroid, J., Nielsen, K., & Saegerman, C. (2010). Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. *Croatian medical journal*, 51(4), 296-305
- Godfroid, J., Scholz, H. C., Barbier, T., Nicolas, C., Wattiau, P., Fretin, D., Whatmore, A. M., Cloeckaert, A., Blasco, J. M., Moriyon, I., Saegerman, C., Muma, J. B., Al Dahouk, S., Neubauer, H., & Letesson, J. J. (2011). Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21st century. *Preventive veterinary medicine*, 102(2), 118–131. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.04.007>
- Grace, D., Mutua, F., Ochungo, P., Kruska, R. L., Jones, K., Brierley, L. & Thao, N. B. (2012). Mapping of poverty and likely zoonoses hotspots.
- Hofer, E., Revilla-Fernández, S., Al Dahouk, S., Riehm, J. M., Nöckler, K., Zygmunt, M. S., Cloeckaert, A., Tomaso, H., & Scholz, H. C. (2012). A potential novel *Brucella* species isolated from mandibular lymph nodes of red foxes in Austria. *Veterinary microbiology*, 155(1), 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.08.009>
- Holt, H. R., Eltholth, M. M., Hegazy, Y. M., El-Tras, W. F., Tayel, A. A., & Guitian, J. (2011). *Brucella* spp. infection in large ruminants in an endemic area of Egypt: cross-sectional study investigating seroprevalence, risk factors and livestock owner's knowledge, attitudes and practices (KAPs). *BMC public health*, 11, 341. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-11-341>
- Islam, M. A., Khatun, M. M., Werre, S. R., Sriranganathan, N., & Boyle, S. M. (2013). A review of *Brucella* seroprevalence among humans and animals in Bangladesh with special emphasis on epidemiology, risk factors and control opportunities. *Veterinary microbiology*, 166(3-4), 317–326. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.06.014>
- Jackson, R., Pite, L., Kennard, R., Ward, D., Stack, J., Domi, X., Rami, A., & Dedushaj, I. (2004). Survey of the seroprevalence of brucellosis in ruminants in Kosovo. *The Veterinary record*, 154, 747-751. doi: 10.1136/vr.154.24.747
- Kang'ethe, E. K., Ekuttan, C. E., Kimani, V. N., & Kiragu, M. W. (2007). Investigations into the prevalence of bovine brucellosis and the risk factors that predispose

humans to infection among urban dairy and non-dairy farming households in Dagoretti Division, Nairobi, Kenya. *East African medical journal*, 84(11 Suppl), S96–S100. <https://doi.org/10.4314/eamj.v84i11.9583>

Kataria, N., Kataria, A. K., Maan, R., & Gahlot, A. K. (2010). Evaluation of oxidative stress in brucella infected cows. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 6(2).

Lindahl E, Sattorov N, Boqvist S, Magnusson U (2015) A Study of Knowledge, Attitudes and Practices Relating to Brucellosis among Small-Scale Dairy Farmers in an Urban and Peri-Urban Area of Tajikistan. *PLOS ONE* 10(2): e0117318. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117318>

Madzingira, O., & McCrindle, C. M. E. (2014). Prevalence of Brucella antibodies in sheep and springbok (*Antidorcas marsupialis*) reared together in the Karas region, Namibia. *Bulletin of Animal Health and Production in Africa*, 62(1), 77-84.

Madzingira, O., & McCrindle, C. M. E. (2015). Retrospective analysis of the prevalence of Brucella antibodies in sheep in the Karas Region of Namibia. *Tropical animal health and production*, 47(6), 1117-1120.

Madzingira, O., & McCrindle, C. M. E. (2016). Risk factors for the transmission of brucellosis on mixed sheep and springbok (*Antidorcas marsupialis*) farms in the Kharas region.

Madzingira, O., & Sezuni, P. M. (2017). Serological prevalence and public health significance of brucellosis on a dairy farm in Namibia from 2011 to 2014. *BMC research notes*, 10(1), 620.

Magwedere, K., Bishi, A., Tjipura-Zaire, G., Eberle, G., Hemberger, Y., Hoffman, L. C., & Dziva, F. (2011). Brucellae through the food chain: the role of sheep, goats and springbok (*Antidorcas marsupialis*) as sources of human infections in Namibia. *Journal of the South African Veterinary Association*, 82(4), 205–212. <https://doi.org/10.4102/jsava.v82i4.75>

Mandal, S. S., Duncombe, L., Ganesh, N. V., Sarkar, S., Howells, L., Hogarth, P. J., Bundle, D. R., McGiven, J. (2017). Novel Solutions for Vaccines and Diagnostics To Combat Brucellosis. *ACS central science*, 3(3), 224–231. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.7b00019>

Mangen, M. J., Otte, J., Pfeiffer, D., & Chilonda, P. (2002). Bovine brucellosis in sub-Saharan Africa: estimation of sero-prevalence and impact on meat and milk offtake potential. *FAO Livestock policy discussion paper*, (8).

Matope, G., Bhebhe, E., Muma, J. B., Lund, A., & Skjerve, E. (2010). Herd-level factors for Brucella seropositivity in cattle reared in smallholder dairy farms of Zimbabwe.

Preventive veterinary medicine, 94(3-4), 213–221.
<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2010.01.003>

Matope, G., Bhebhe, E., Muma, J. B., Oloya, J., Madekurozwa, R. L., Lund, A., & Skjerve, E. (2011). Seroprevalence of brucellosis and its associated risk factors in cattle from smallholder dairy farms in Zimbabwe. *Tropical animal health and production*, 43(5), 975–982.
<https://doi.org/10.1007/s11250-011-9794-4>

McDermott, J. J., & Arimi, S. M. (2002). Brucellosis in sub-Saharan Africa: epidemiology, control and impact. *Veterinary microbiology*, 90(1-4), 111–134.
[https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(02\)00249-3](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(02)00249-3)

McDermott, J., Grace, D., & Zinsstag, J. (2013). Economics of brucellosis impact and control in low-income countries. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 32(1), 249–261. <https://doi.org/10.20506/rst.32.1.2197>

Megersa, B., Biffa, D., Abunna, F., Regassa, A., Godfroid, J., & Skjerve, E. (2011). Seroprevalence of brucellosis and its contribution to abortion in cattle, camel, and goat kept under pastoral management in Borana, Ethiopia. *Tropical animal health and production*, 43(3), 651–656. <https://doi.org/10.1007/s11250-010-9748-2>

Meyer, K. F., & Shaw, E. B. (1920). A Comparison of the Morphologic, Cultural and Biochemical Characteristics of *B. Abortus* and *B. Melitensis*: Studies on the Genus *Brucella* Nov. Gen. I. <http://doi.org/10.1093/infdis/27.3.173>

Moreno, E., Cloeckart, A., & Moriyón, I. (2002). *Brucella* evolution and taxonomy. *Veterinary microbiology*, 90(1-4), 209–227. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(02\)00210-9](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(02)00210-9)

Moriyón, I., & López-Goñi, I. (1998). Structure and properties of the outer membranes of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 1(1), 19–26.

Muma, J. B., Samui, K. L., Oloya, J., Munyeme, M., & Skjerve, E. (2007). Risk factors for brucellosis in indigenous cattle reared in livestock-wildlife interface areas of Zambia. *Preventive veterinary medicine*, 80(4), 306–317.
<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2007.03.003>

Muma, J. B., Samui, K. L., Siamudaala, V. M., Oloya, J., Matop, G., Omer, M. K., Munyeme, M., Mubita, C., & Skjerve, E. (2006). Prevalence of antibodies to *Brucella* spp. and individual risk factors of infection in traditional cattle, goats and sheep reared in livestock-

wildlife interface areas of Zambia. *Tropical animal health and production*, 38(3), 195–206. <https://doi.org/10.1007/s11250-006-4320-9>

Muñoz, P., Boadella, M., Arnal, M., Miguel, M.J., Revilla, M., Martínez, D., Vicente, J., Acevedo, P., Oleaga, A., Ruiz-Fons, F., Marín, C., Prieto, J.M., Fuente, J.D., Barral, M., Barberán, M., Luco, D.F., Blasco, J., & Gortázar, C. (2010). Spatial distribution and risk factors of Brucellosis in Iberian wild ungulates. *BMC Infectious Diseases*, 10, 46 - 46.

Musallam, I. I., Abo-Shehada, M., Omar, M., Guitian, J. (2015). Cross-sectional study of brucellosis in Jordan: Prevalence, risk factors and spatial distribution in small ruminants and cattle. *Preventive veterinary medicine*, 118(4), 387–396. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.12.020>

Neglected Zoonotic Diseases. http://www.who.int/neglected_diseases/zoonoses/infections_more/en

Nielsen K. (2002). Diagnosis of brucellosis by serology. *Veterinary microbiology*, 90(1-4), 447–459. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(02\)00229-8](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(02)00229-8)

Obonyo, M., & Gufu, W.B. (2015). Knowledge, Attitude and Practices towards Brucellosis among Pastoral Community in Kenya, 2013. *International journal of innovative research and development*, 4.

Osterman, B., & Moriyon, I. (2006). International Committee on Systematics of Prokaryotes; Subcommittee on the taxonomy of *Brucella*: minutes of the meeting, 17 September 2003, Pamplona, Spain. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(5), 1173-1175. 10.1099/ijs.0.64349-0

Pessegueiro, P., Barata, C., & Correia, J. (2003). Brucelose—uma revisão sistematizada. *Medicina Interna*, 10(2), 91-100.

Petersen, E., Rajashekara, G., Sanakkayala, N., Eskra, L., Harms, J., & Splitter, G. (2013). Erythritol triggers expression of virulence traits in *Brucella melitensis*. *Microbes and infection*, 15(6-7), 440–449. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2013.02.002>

Philippon, A., Renoux, G., & Plommet, M. (1970). Brucellose bovine expérimentale. 3. Excrétion vaginale de *Brucella abortus* avant et après la mise bas [Experimental bovine brucellosis. 3. The vaginal excretion of *Brucella abortus* before and after parturition]. *Annales de recherches vétérinaires. Annals of veterinary research*, 1(2), 215–224.

Poester, F. P., Samartino, L. E., & Santos, R. L. (2013). Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in livestock. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 32(1), 105–115. <https://doi.org/10.20506/rst.32.1.2193>

Rahman, M. S., Faruk, M. O., Her, M., Kim, J. Y., Kang, S. I., & Jung, S. C. (2011). Prevalence of brucellosis in ruminants in Bangladesh. *Veterinarni Medicina*, 56(8), 379–385

Reviriego, F. J., Moreno, M. A., & Domínguez, L. (2000). Risk factors for brucellosis seroprevalence of sheep and goat flocks in Spain. *Preventive veterinary medicine*, 44(3-4), 167–173. [https://doi.org/10.1016/s0167-5877\(00\)00108-2](https://doi.org/10.1016/s0167-5877(00)00108-2)

Samartino L. (2003). Conceptos generales sobre brucelosis bovina. Jornada de actualización sobre brucelosis bovina, Rocha, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Castelar, Argentina. Available at: www.mgap.gub.uy/DGSG/Capacitación/JornadasBrucelosis/

Samartino, L. E., & Enright, F. M. (1993). Pathogenesis of abortion of bovine brucellosis. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 16(2), 95–101. [https://doi.org/10.1016/0147-9571\(93\)90001-1](https://doi.org/10.1016/0147-9571(93)90001-1)

Sammartino, L. E., Gil, A. and Elzer, P. (2006) Capacity building for surveillance and control of bovine and Caprine brucellosis. In: *FAO Animal Production and Health 51 Proceedings - AO/WHO/OIE Expert and Technical Consultation*. Rome. 10: 7-55.

Sanogo, M., Abatih, E., Thys, E., Fretin, D., Berkvens, D., & Saegerman, C. (2012). Risk factors associated with brucellosis seropositivity among cattle in the central savannah-forest area of Ivory Coast. *Preventive Veterinary Medicine*, 107(1-2), 51-56. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.05.010>

Scholz, H. C., Hubalek, Z., Sedláček, I., Vergnaud, G., Tomaso, H., Al Dahouk, S., Melzer, F., Kämpfer, P., Neubauer, H., Cloeckaert, A., Maquart, M., Zygmunt, M. S., Whatmore, A. M., Falsen, E., Bahn, P., Göllner, C., Pfeffer, M., Huber, B., Busse, H. J., & Nöckler, K. (2008). *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58(Pt 2), 375–382. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65356-0>

Scholz, H. C., Nöckler, K., Göllner, C., Bahn, P., Vergnaud, G., Tomaso, H., Al Dahouk, S., Kämpfer, P., Cloeckaert, A., Maquart, M., Zygmunt, M. S., Whatmore, A. M., Pfeffer, M., Huber, B., Busse, H. J., & De, B. K. (2010). *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(Pt 4), 801–808. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.011148-0>

Scholz, H. C., Revilla-Fernández, S., Dahouk, S. A., Hammerl, J. A., Zygmunt, M. S., Cloeckaert, A., Koylass, M., Whatmore, A. M., Blom, J., Vergnaud, G., Witte, A., Aistleitner, K., & Hofer, E. (2016). *Brucella vulpis* sp. nov., isolated from mandibular lymph nodes of red

foxes (*Vulpes vulpes*). International journal of systematic and evolutionary microbiology, 66(5), 2090–2098. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000998>

Seleem, M. N., Boyle, S. M., & Sriranganathan, N. (2010). Brucellosis: a re-emerging zoonosis. Veterinary microbiology, 140(3-4), 392–398. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.06.021>

Silva, I., Dangolla, A., & Kulachelvy, K. (2000). Seroepidemiology of *Brucella abortus* infection in bovids in Sri Lanka. Preventive veterinary medicine, 46(1), 51–59. [https://doi.org/10.1016/s0167-5877\(00\)00136-7](https://doi.org/10.1016/s0167-5877(00)00136-7)

Solorio-Rivera, J. L., Segura-Correa, J. C., & Sánchez-Gil, L. G. (2007). Seroprevalence of and risk factors for brucellosis of goats in herds of Michoacan, Mexico. Preventive veterinary medicine, 82(3-4), 282–290. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2007.05.024>

Talukder, B, Samad, Abdus, Rahman, A K M Anisur. (2012). Comparative evaluation of commercial serodiagnostic tests for the seroprevalence study of brucellosis in stray dogs in Bangladesh. Bangladesh Journal of Veterinary Medicine. 9. <https://doi.org/10.3329/bjvm.v9i1.11217>

Thimm, B., & Wundt, W. (1976). The epidemiological situation of brucellosis in Africa. Developments in biological standardization, 31, 201–217.

Vassallo D. J. (1992). The corps disease: brucellosis and its historical association with the Royal Army Medical Corps. Journal of the Royal Army Medical Corps, 138(3), 140–150. <https://doi.org/10.1136/jramc-138-03-09>

Weaver, L., & Petersen, T. (2008). NAMIBIA COMMUNAL AREA CONSERVANCIES. Best Practices in Sustainable Hunting, 48-52. Retrieved from <http://www.fao.org/tempref/docrep/fao/010/aj114e/aj114e10.pdf>

Whatmore, A. M., Davison, N., Cloeckaert, A., Al Dahouk, S., Zygmunt, M. S., Brew, S. D., Perrett, L. L., Koylass, M. S., Vergnaud, G., Quance, C., Scholz, H. C., Dick, E. J., Hubbard, G., & Schlabritz-Loutsevitch, N. E. (2014). *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.). International journal of systematic and evolutionary microbiology, 64(Pt 12), 4120–4128. <https://doi.org/10.1099/ijss.0.065482-0>

World Organisation for Animal Health OIE (2010). Bovine brucellosis, Chapter 2.4.3. [Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2009]. In Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. OIE, Paris. Available at: www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.03_bovine_brucell.pdf

World Organisation for Animal Health OIE (2012). Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals: mammals, birds and bees. Biological Standards Commission, World Organization for Animal Health, Paris, France.

World Organisation for Animal Health OIE (2016). Brucellosis (*Brucella abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*) (infection with *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*). In Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals

8. Apêndices

Questionário em Português

Características demográficas e da exploração	
1. Sexo do proprietário/criador	M F
2. Idade	_____
3. Tipo de exploração	Leite Carne Ambos
4. Tipo de exploração	Cercada Free-range Transumância
5. Nº bovinos na propriedade/exploração	_____
6. Presença de animais de outras espécies na propriedade/exploração	Sim Não Quais: _____
7. Existem ou transitam animais selvagens?	Sim Não Quais: _____
Conhecimento acerca da brucelose	
8. Onde aprendeu acerca da brucelose	Não sabe Serviços veterinários Família/amigos Radio/tv Reuniões da comunidade
9. Como é que ocorre infeção entre animais	Não sabe Partilha de comida e bebida Material de aborto
10. Como é que as pessoas se infetam	Não sabe Comer carne de animais infetados Beber leite de animais infetados
11. Sintomas em animais	Não sei Abortos Vitelos fracos Infertilidade
12. Sintomas em pessoas	Não sei Febre Dor articulações Dor de cabeça
13. História de brucelose bovina na sua exploração ou do vizinho?	Sim Não

Práticas de manejo animal	
14. Vacina o efetivo contra brucelose	Sim Não
15. Método para reprodução	Inseminação artificial Monta natural
16. Faz o abate de animais na propriedade	Sim Não
17. Maneio de animal que abortou	Não sabe Chama veterinário Trata com remédios caseiros Nada
18. Maneio de produtos de aborto (feto, placenta, fluidos)	Enterra Dá aos cães Queima Chama o veterinário Nada
Práticas de consumo de produtos de origem animal	
19. Condições do leite que consomem	Fervido Fermentado Cru
20. Origem do leite que consomem	Produção própria Loja Vizinhos
21. Origem de derivados de leite	Produção própria Loja Vizinhos

Questionário em inglês

Demographic and farm characteristics	
1. Gender of farmer	M F
2. Age	_____
3. Farm type	Milk Meat Both
4. Farm type	Fenced Free-range Transhumance
5. Number of cattle on the farm	_____
6. Presence of animals of other species on the farm	Yes No
	Which: _____
7. Presence of wild animals	Yes No Which: _____
Knowledge about brucellosis	
8. Where did you learn about brucellosis	Don't know Veterinary services Family and friends Radio/Tv Community meetings
9. How does animal infection occur?	Don't know Food and drink sharing Abortion material
10. How do people get infected?	Don't know Eating meat from infected animals Drink milk from infected animals
11. Symptoms in animals	Don't know Abortions Weak calves Infertility
12. Symptoms in people	Don't know Fever Joint pain Head ache
13. History of bovine brucellosis on your farm or your neighbor's?	Yes No Don't know

Animal husbandry practises	
14. Do you vaccinate the cattle against brucellosis?	Yes No
15. Method for reproduction	Artificial insemination Natural mounts
16. Do you slaughter animals on your farm?	Yes No
17. Management of the animal that aborts	Don't know Call the veterinarian Treat the home remedies Do nothing
18. Management of abortion products, such as fetus, placenta and fluids	Burial Give the dogs Burn Call the veterinarian Do nothing
Practices of dairy consumption	
19. Conditions of consumed milk	Boiled Femented Crude
20. Origin of the milk you consume	Own production Store Neighbors
21. Origin of other dairy products	Own production Store Neighbors

Questionário em Afrikaans

Demografiese en plaas eienskappe	
1. Geslag van boer	M V
2. Ouderdom	_____
3. Plaas tipe	Melk Vleis Beide
4. Plaas tipe	Omhein Vrylopend Nomadies
5. Aantal beeste op die plaas	_____
6. Diere van ander spesies op die plaas	Ja Nee Watter: _____
7. Wilde diere op die plaas	Ja Nee Watter: _____
Kennis oor Brucellose	
8. Waar het u van brucellose geleer?	Weet nie Veearts Familie en vriende Radio/Tv Gemeenskapsvergaderings
9. Hoe vind dierinfeksie plaas?	Weet nie Saam voed en drink Aborsiemateriaal
10. Hoe word mense geïnfekteer?	Weet nie Eet vleis van geïnfekteerde diere Drink melk van geïnfekteerde diere
11. Simptome in diere	Weet nie Aborsies Swak kalwers Onvrugbaar
12. Simptome in mense	Weet nie Koors Gewrigspyn Hoofpyn
13. Geskiedenis van bees brucellose op u plaas of buurman s'n?	Ja Nee Weet nie

Veeteeltpraktyke	
14. <i>Inent u die beeste teen brucellose?</i>	Ja Nee
15. <i>Metode van reproduksie</i>	Kunsmatig Natuurlik
16. <i>Slag u diere op die plaas?</i>	Ja Nee
17. <i>Bestuur van diere wat aborteer</i>	Weet nie Bel die veearts Behandel self Doen niks
18. <i>Bestuur van aborsieprodukte, soos fetus, plasenta en vloeistowwe</i>	Begrawe Gee vir die honde Brand Bel die veearts Doen niks
Gerbruik van suiwelverbruik	
19. <i>Toestande van verbruikte melk</i>	Gekook Gefermenteer Beide
20. <i>Oorsprong van verbruikte melk</i>	Produseer self Stoor Bure
21. <i>Oorsprong van ander suiwelprodukte</i>	Eie produksie Stoor Bure

Questionário em Otjiherero

Demografiese en plaas eienskappe	
1. Omututa omurumendu po omukaendu	M V
2. Ozombura	_____
3. Onge farama	Omaihi Onyama Ovihevari
4. Onge farama	Ondarata Nokuhena ondarata Jovandu uriri
5. Otjivarero tjozongombe ko farama	_____
6. Uno vinamuinyo viarue ko farama	Li Kako Onge: _____
7. Uno vinamuinyo viomokuti	Li Kako Onger: _____
Kennis oor Brucellose	
8. Uerihongerapi ohunga no brucellosis?	Hinakutjiua Onganga vovipuka Kovahoko nomapanga Karatiyo/otv Ozombongarero joututa
9. Ovinamuinyo vimunau omutjise mbu?	Hinakutjiua Movikuraa no kunua omeva mokuzepa
10. Ovandu vemunavi omoutjise mbo?	Hinakutjinua Mokuraa onyama ndjinomutjise mbo Mokunua umaihi votjipuka ndjinomutjise mbo
11. Omutjise uraizira vi movinamuinyo	Hinakutjiua Mokuzepa Outana mbuuavera Oukandje
12. Omutjise uraizira vi movandu	Hinakutjiua Otjindjumba Otjiuru Omatupa
13. Uarora okukara numutjise mbi kevavaranganda	Li Kako Hinakutjiua

Veeteeltpraktyke	
14. <i>Mujenda ozongombe komutjisebui</i>	Li kako
15. <i>Omuano uokukuatiza</i>	Nozomahina Ozo ozeni
16. <i>Muzepa ovinamuinyo</i>	Li Kako
17. <i>Mungurae nomauzeunga</i>	Hinokutjiua Totona ongoze konganga vovipuka Tupanga nomiti ponganda Kutjina
18. <i>Mungurae nomauzeunga</i>	Tupaka Tujondja kuzombua Tunyoza Tutoha kunganga vovipuka katjina
Gerbruik van suiwelverbruik	
19. <i>Mungurae no maihi</i>	Tuzumiza Femented Crude
20. <i>Muizapi omaihi</i>	Tukanda Turanda Ovararanganda
21. <i>Muizapi ovina viomaihi</i>	Tukanda Turanda Ovararanganda

Termo de consentimento para participação no estudo



faculdade
de medicina veterinária



CONSENT FORM

Title of Project: Determination of Brucellosis prevalence in livestock in the Eastern Communal Conservancies, Namibia

Name of Researcher: Maria Costa, Veterinary student from ULHT, Portugal

This is a veterinary research study, and your involvement is voluntary. You are free to withdraw any unprocessed data previously supplied.

If you consent, the researcher will collect blood samples from your animals (livestock) and test it for brucellosis.

All tests will be performed at CCF facilities, and the results will be confidential.

The information gathered in the questionnaires will be anonymous and only used for research purposes.

If you are interested in finding out the test results from your animals, please submit your contact details and the researcher will contact you when they're ready.

I agree to take part in the above study.

☐

Date

Signature