

JOANA ALEXANDRA CARREIRA PEDROSO

**SURTO DE BRUCELOSE EM EXPLORAÇÃO DE
BOVINOS NO ALTO ALENTEJO**

Orientador: Ângela Dâmaso

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Faculdade de Medicina Veterinária**

**Lisboa
Setembro de 2020**

JOANA ALEXANDRA CARREIRA PEDROSO

**SURTO DE BRUCELOSE EM EXPLORAÇÃO DE BOVINOS
NO ALTO ALENTEJO**

Dissertação apresentada 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.

Presidente: Prof^a. Doutora Laurentina Pedroso

Arguente: Prof. Doutor João Cannas da Silva

Orientador: Prof^a. Doutora Ângela Dâmaso

- Despacho de nomeação de júri nº 211/2020 de 12 de Agosto de 2020

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

**Lisboa
Setembro de 2020**

Epígrafe

Nunca aqueles males poderão ser eficazmente combatidos sem o apoio de uma boa legislação de polícia sanitária veterinária.

“«Diário do governo», 1ª série, nº100, de 14 de maio de 1953”

Dedicatória

Dedico esta dissertação de mestrado à minha mãe, Elsa Pedroso, por inculcar, em mim e na minha educação, o gosto pela medicina, o espírito crítico e a dedicação, que a esta área estão vinculados.

Agradecimentos

À Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, e à Diretora Prof. Dr.^a Laurentina Pedroso, por nos proporcionar este curso e, pela preocupação diária de evolução tanto em aspetos de ensino e corpo docente assim como organizacionais, materiais, entre outros.

A todos os meus professores pelos ensinamentos que me passaram diariamente.

À minha orientadora, Professora Ângela Dâmaso, pela ajuda e preocupação, durante esta última etapa que compôs o meu curso e, mesmo em situação de pandemia, esteve sempre presente.

À equipa do Centro de Saúde Animal (CSA), pelo estágio proporcionado, por me transmitirem os seus valores, o seu '*modus operandi*' e também pela forma como me receberam durante todo o estágio, por me fazerem sair da minha zona de conforto, pela exigência na minha evolução quer a nível profissional, quer a nível pessoal e também pela dedicação e paciência para me ensinarem todos os dias, nomeadamente, Dr. Pedro Alegria, Dr.^a Marisa Alegria, Dr.^a Ana Albardeiro, Dr. Frederico Miguéns, Enf.^a Raquel Vieira.

A todas as instituições e médicos veterinários que, ao longo destes anos, me receberam em estágios para aprender com eles, incluindo ao Dr. Diogo Paralta por me inculir o gosto por esta profissão e por me mostrar o estudo, esforço, dedicação e sacrifício, a que obriga.

À Dr.^a Ana Cristina Ferreira e Dr.^a Fernanda Ramos do Instituto nacional de investigação agrária e veterinária (INIAV) pela ajuda prestada.

Quero agradecer aos meus pais, Elsa e Henrique Pedroso, que ao longo deste curso foram incansáveis, e por me proporcionarem tudo aquilo que foi necessário para tal, todo o apoio, toda a disponibilidade e paciência.

Ao meu namorado, João Paulo Tita, que viveu de perto todas as emoções deste curso, um agradecimento especial por toda a paciência, por toda a força e perseverança que me deu e por me ajudar a nunca desistir.

A toda a restante família os quais, irmã, sobrinha e avós, por estarem perto de mim e me apoiarem sempre nas minhas escolhas de vida.

E por fim um agradecimento a todas as restantes pessoas que não mencionei mas que direta ou indiretamente participaram na minha formação, o meu eterno agradecimento.

Resumo

A brucelose é uma doença importante do ponto de vista da sanidade animal. Uma vez que se caracteriza por uma zoonose esta pode tornar-se num tema importante na saúde pública, sendo assim, uma doença de declaração obrigatória (DDO).

Diversos fatores podem influenciar a prevalência da doença, assim como, a presença de fauna selvagem na propriedade, a deteção da doença nas propriedades circundantes, eficácia da vacina, processo de eliminação de animais positivos, deteção de abortos, manejo geral da manada, testes laboratoriais utilizados, entre outros.

O estudo incide numa exploração extensiva de bovinos de carne no Alto Alentejo, onde foram estudadas variáveis, como a idade, sexo e época do ano em que se verificam mais animais seropositivos em relação à Brucelose.

Foram recolhidas amostras sanguíneas de todos os animais com mais de seis meses, periodicamente, as quais, foram analisadas com os testes Rosa de Bengala (RBT) e teste de fixação do complemento (CFT) no respetivo laboratório de referência.

Os resultados laboratoriais foram recolhidos e, posteriormente, foi feito um estudo estatístico quanto às variáveis acima referidas. Os resultados mostraram que a idade média de infeção, nesta exploração é de cerca de 6 anos, a doença é mais incidente no sexo feminino e a época do ano em que se verificou maior número de animais positivos foi no mês de julho de 2019 provavelmente derivado do início da época de partos.

O surto de Brucelose afetou a exploração de vários modos, tais como, a perda de grande número de animais desde o início do surto, por eliminação de todos os animais positivos, o estado sanitário desta exploração foi alterado, impossibilitando a venda de animais, causando assim grandes perdas económicas e também o atraso reprodutivo da exploração.

Embora, não se tenha erradicado a brucelose desta exploração, após a vacinação de todo o efetivo, os casos positivos têm vindo a decrescer. Não obstante, deve ser feita uma vigilância reprodutiva mais ativa para conseguir um rápido isolamento dos animais positivos e assim, a eliminação de possíveis reservatórios de doença com o objetivo de evitar a reinfeção.

Palavras chave: brucelose, *Brucella abortus*, bovinos, sanidade animal, zoonose

Abstract

Brucellosis is an important disease in matters of animal health. Since it is characterized as a zoonosis, it can become an important problem for public health, being mandatory to report all cases to the health authorities.

Many factors can influence its prevalence as so, the presence of wildlife, the detection of the disease in surrounding properties, vaccination efficiency, elimination of seropositive animals, detection of abortion, management of cattle and used laboratorial tests, and many others.

This study will focus in a livestock farm of beef cattle in extensive regimen of production, located in Alto Alentejo, where three main subjects were addressed, which were age, sex and time of the year that the infection with brucellosis occurred.

Many blood samples were collected, periodically, in all animals older than six month. They all have been analyzed with Rose Bengal teste (RBT) and Complement Fixation Test (CFT) in the respective reference laboratory.

The laboratory results were collected and posteriorly it has been done a statistic study about the three main subjects described before.

The results showed that the average age cows are infected is about six years old, this disease is more frequent in females and it is also more frequent during the month of July that coincide whit the beginning of parturition season.

This outbreak affected this farm in many ways, such as, the great amount of animal losses since the appearing of brucellosis, elimination of many seropositive animals, also due to alteration of the farm sanitary status, making it impossible to sell animals, causing great economic losses as well as a delay in reproduction results.

Although brucellosis hasn't been eradicated, after vaccination, de positive cases have been decreasing. Despite that, in the future, the farmer should do a closer reproductive management to increase abortion detection and to isolate positive animals efficiently and eliminate possible reservoirs of the disease in order to contain de infection and decrease re-infection.

Key-words: Brucellosis, Brucella abortus, beef cattle, Animal health, zoonosis.

Abreviaturas e Símbolos

a.C. – Antes De Cristo

AMOS – abreviatura para *B. abortus*, *B. mellitensis*, *B. ovis*, *B. suis* pela junção da primeira letra de todas as sub-espécies.

BBAT – do inglês Buffered Brucella Agglutination Tests

BPAT – do inglês buffered plate agglutination test

BST – do inglês Brucelin Skin Test

CFT – do inglês Complement Fixation Test

CITA- meio de cultura seletivo para isolamento de *Brucella*

CO₂ – Dióxido De Carbono

CSA – Centro De Saúde Animal

DDO- Doença de declaração obrigatória

DGAV – Direção geral de Alimentação e Veterinária

DIV – Divisão de intervenção Veterinária

DNA – do inglês Deoxyribonucleic Acid – ADN: Ácido Desoxirribonucleico

DR – conjugação de Doxiciclina e rifampicina

DS – conjugação de Doxiciclina e streptomina

DSVR - Direções de Serviço Veterinário Regionais

ELISA – do inglês Enzyme-Linked Immune-Sorbent Assay

EUA – Estados Unidos Da América

Fingerprinting – palavra inglesa para descrever a deteção de microssatélites vários num genoma, que o torna individual.

FM – do inglês Ferrell's method

Foci – do latim, focos

FPA - do inglês Fluorescence Polarisation Assay

ICNF - Instituto da conservação da Natureza e das Florestas

IFN- γ – Interferão gama

INIAV - Instituto nacional de investigação agrária e veterinária

KDa – kilodalton

LFA – do inglês Lateral Flow Assay.

Loci – plural de “locus” significa sítio ou local.

LPS- Lipopolissacáridos

MLSA - do inglês Multiple Locus Sequence Analysis
MLSA – do inglês Multi Locus Sequence Analises
MLVA – do inglês Multiple Locus Variable Analysis
MLVA – do inglês Multiple Locus Variable
mP- milipolarizações
MRT – do inglês Milk Ring Test
mTM – do inglês Modified Thayer-Martin's
MVE- Médico Veterinário Executor
MVOPP - Médico Veterinário coordenador da Organização de Produtores Pecuários
OBF – do inglês Officially Brucellosis Free. OLB – oficialmente livre de brucelose
OIE – sigla de World Organization For Animal Health, significa organização mundial da saúde animal
OPP – Organizações De Produtores Pecuários
PCR – do inglês Polymerase Chain Reaction – reação em cadeia da polimerase.
PIS - Plano Individual de Saneamento
PNSA - Programa Nacional de Saúde Animal
RBT – do inglês Rose bengal Test
RDFP – Reação Sorológica Falso Positivo
RER – Reticulo Endoplasmático Rugoso
RSFN- Reação Serológica Falso Negativo.
S-LPS – do inglês Smooth Lipopolysaccharide
SAT – do inglês Serum Agglutination Test significa teste de aglutinação sorológico
SC- via de administração subcutânea
SIRCA - Sistema De Recolha De Cadáveres De Animais
SNIRA - Sistema Nacional de Informação e Registo Animal
SNP – do inglês Single Nucleotide Polymorphism que significa polimorfismos de um único nucleótido
Spillover – significa extravasamento
Spp. – abreviatura do inglês Species, significa: várias espécies
UE – União Europeia
UE – unidade epidemiológica
µl – microlitro

Índice Geral

Epígrafe	3
Dedicatória	4
Agradecimentos	5
Resumo	6
Abstract	7
Abreviaturas e Símbolos	8
Índice Geral	10
Índice de Figuras	12
Índice de Gráficos	13
Índice de Tabelas	14
Estágio e casuística	15
1. Introdução	18
2. Revisão bibliográfica	20
2.1. Prevalência da Brucelose	20
2.2. Brucelose em animais selvagens e caça	22
2.3. Brucella abortus	25
2.3.1. Patogenia e sinais clínicos e patologia da infeção	26
2.3.2. Diagnóstico	32
2.3.2.1. Diagnóstico direto	33
I. Coloração	33
II. Cultura	34
2.3.2.2. Diagnóstico indireto	35
I. Milk Ring Test (MRT)	37
II. Testes de antígenos de Brucella tamponados (BBAT)	37
III. Teste rosa de bengala (RBT do inglês “Rose Bengal Test”)	38
IV. Buffered Plate Agglutination Test (BPAT)	38
V. Serum Agglutination Test (SAT)	38
VI. Complement Fixation Test (CFT) – teste de fixação do complemento (TFC)	39
VII. Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (i-ELISA) ou Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (c-ELISA)	39
VIII. Fluorescence Polarization Assay (FPA)	40
IX. Lateral Flow Assay (LFA)	40
X. Interferon-Gamma (IFN- γ)	40
XI. Brucelin Skin Test (BST) – teste de brucelina	41
2.4. Vacina	42
2.4.1. Vacina S19	43
2.4.2. Vacina RB51	45
2.4.3. Vacina S45/20	46
2.4.4. Vacina SR82	47
2.5. Prognóstico	47
2.6. Impacto da doença	49

2.7.	Estratégias de erradicação da doença em Portugal	50
2.8.	Classificação sanitária dos efetivos bovinos quanto à Brucelose	51
2.9.	Aparecimento de Brucelose numa exploração – Procedimento	52
3.	<i>Materiais e Métodos</i>	55
3.1.	Enquadramento da exploração	55
3.2.	Descrição do surto	55
3.2.1.	Deteção do primeiro caso de Brucelose	55
3.2.2.	Recolha de amostras de sangue e testagem	56
3.2.3.	Recolha de dados da exploração	57
3.3.	Análise de dados	58
4.	<i>Resultados</i>	59
4.1.	Intervenções médico-veterinárias no manejo do surto	59
4.2.	Impacto do surto no tamanho do efetivo	59
4.3.	Número de amostras para testagem de Brucelose	61
4.4.	Idade dos animais no efetivo e relação com número de amostras	61
4.5.	Prevalência de Brucelose no efetivo bovino	62
4.6.	Relação entre Idade e Diagnóstico de Brucelose no efetivo bovino	63
4.7.	Relação entre Sexo e Diagnóstico de Brucelose no efetivo bovino	64
4.8.	Relação entre época do ano da testagem e Diagnóstico de Brucelose no efetivo bovino	64
5.	<i>Discussão</i>	66
6.	<i>Conclusão</i>	69
7.	<i>Bibliografia</i>	70
8.	<i>Anexos</i>	I
8.1.	Anexo I - Modelo de Inquérito epidemiológico para a Brucelose Bovina	I
8.2.	Anexo II - Plano individual de Saneamento	VII
8.3.	Anexo III - Manual de apoio às estratégias de controlo da Brucelose bovina.	XIII
8.4.	Anexo IV - Certificado da Limpeza e desinfeção de explorações após abate sanitário	XIV
8.5.	Anexo V - Relatório técnico da DGAV sobre a brucelose bovina em Portugal.	XV
8.6.	Anexo VI - Procedimento de Referencia para colheita de amostras de Material Biológico para diagnóstico da Brucelose	XVI

Índice de Figuras

Figura 1 - Status de brucelose bovina da União Europeia, no ano 2006. Adaptado de (UE - European Union 2017).....	21
Figura 2- Vaca infetada com <i>B. abortus</i> . Útero apresenta vários locais com exsudado fibrinoso na superfície dos carúnculos uterinos. Superfície de corte de um placentoma, com exsudado fibroso necrótico e hemorragia multifocal (placentite necrosante). Adaptado de (Neta et al. 2010)	28
Figura 3 – Corte histológico de placentoma de vaca infetada com <i>B. abortus</i> , com criptas carunculares preenchidas com detritos, infiltrado inflamatório intenso, e inúmeras colónias bacterianas (seta) – placentite necrótica aguda. Hematoxilina eosina 50x. Adaptado de Neta et al. 2010).	28
Figura 4 - Corte histológico de glândula mamária de vaca experimentalmente infetada com <i>B. abortus</i> , com infiltração intersticial focal de linfócitos, macrófagos e neutrófilos num lúmen acinar. Hematoxilina eosina 50x. Barra =100µm. Adaptado de Neta et al. 2010).	29
Figura 5 – imagem da esquerda: Corte histológico de pulmão de feto abortado devido a <i>B. abortus</i> , com pleura visceral severamente espessada (seta), acumulação de fibrina e infiltrado inflamatório difuso (pleurite fibrinosa); hematoxilina eosina 50x. Imagem da direita: Corte histológico de pulmão de bezerro frágil à nascença devido a <i>B. abortus</i> , com espessamento das paredes alveolares e infiltrado inflamatório no espaço intersticial (pneumonia intersticial); Hematoxilina eosina 50x. Adaptado de (Neta et al. 2010).....	30
Figura 6 - Tipos de teste de diagnóstico de <i>Brucella abortus</i> . (adaptado de Godfroid, 2010)	33
Figura 7- Cronologia do aparecimento dos casos positivos na exploração em estudo.	61

Índice de Gráficos

Gráfico 1: Casuística geral do estagio da autora na clinica veterinária Centro de Saúde animal.....	15
Gráfico 2: Casuística de clinica de espécies pecuárias no Centro de saúde animal durante o estágio.	16
Gráfico 3- Casuística por especialidades durante o período de estágio de Setembro a Março na clínica Centro de Saúde animal.	17
Gráfico 4 - Comparação dos testes com a sua performance na deteção de <i>Brucella spp.</i> nos bovinos (Gall e Nielsen 2004)	42
Gráfico 6 - Número de animais, com mais de 6 meses, no efetivo, testados ao longo deste estudo.....	60
Gráfico 7 – Comparação do número de amostras de sangue em função da idade (meses) dos bovinos.	62
Gráfico 8 – Percentagem de resultados positivos e negativos à testagem para Brucelose num efetivo de 295 animais, num total de 2239 testes realizados num surto de Brucelose bovina.....	62
Gráfico 9- (esquerda) Representação da média de idade do efetivo em relação ao seu diagnóstico de Brucelose.	63
Gráfico 11 - Distribuição do diagnóstico de Brucelose em função do sexo dos bovinos	64
Gráfico 12 - Diagnóstico de Brucelose em função do momento de colheita de dados.....	65

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Espécies de <i>Brucella</i> e biovars, hospedeiros preferenciais e patogenicidade para os humanos. Adaptado de (Godfroid, Nielsen, e Saegerman 2010; Saavedra, Ballem, et al. 2019)	19
Tabela 2- Características de <i>B. abortus</i> que a tornam agente de bioterrorismo.(Pepper, Choi, e Gerba 2009).....	19
Tabela 3- Países europeu considerados oficialmente livres de Brucelose no ano de 2017. Adaptado de (UE - European Union 2017)	21
Tabela 5 - Animais selvagens presentes nas respetivas bioregiões. Adaptado de (Muñoz et al. 2010)	23
Tabela 6 - Sensibilidade e especificidade dos testes de diagnóstico indiretos em bovinos (Godfroid et al. 2010)	36
Tabela 7 - Lista de testes de diagnóstico prescritos pelo "OIE Terrestrial Animal Health" para o movimento de animais e produtos derivados de animais, e testes alternativos para o movimento de animais, que podem ser acordados pelas duas partes intervenientes. (OIE 2008; Saavedra, Fernandes, e Queiroga 2019).....	37
Tabela 8 - Vantagens e desvantagens das vacinas contra a Brucelose Bovina.	47
Tabela 9 - Classificação Sanitária dos efetivos. Os estatutos B2.1, B3S e B4S são atribuídos pelo PISA para informação mais precisa do estado sanitário do efetivo. (Adaptado de Fonseca, Fonseca, and Pinheiro 2008).....	51
Tabela 10 - Distribuição do número de colheitas de amostras de sangue por Testagem	57
Tabela 11 - Número de colheitas de sangue amostradas entre março 2018 a fevereiro de 2020, num efetivo bovino de cerca de 200 animais afetado num surto de Brucelose, num total de 295 animais testados	61
Tabela 12 - Frequência da idade (meses) dos bovinos num efetivo de 295 animais afetado com um surto de Brucelose entre março de 2018 e fevereiro de 2020	61
Tabela 13 –(direita) Comparação de idade (meses) em função do diagnóstico de Brucelose.	63
Tabela 14 - Associação entre o sexo e o Diagnóstico de Brucelose do efetivo bovino	64
Tabela 15 - Associação entre o diagnóstico de Brucelose e a respetiva testagem do efetivo e o seu resultado	65

Estágio e casuística

O meu estágio tomou lugar no Centro de Saúde Animal, na cidade de Portalegre, que é uma clínica veterinária, que labora há cerca de 13 anos, em vários concelhos do Alto Alentejo, nomeadamente, Crato, Alter do chão, Nisa, Castelo de Vide, Marvão. Esta instituição caracteriza-se por uma empresa familiar, a proprietária, Dr.^a Marisa Alegria e Diretor clínico, Dr. Pedro Alegria, que trabalham em conjunto com a restante equipa técnica que é constituída por dois médicos veterinários e uma enfermeira veterinária. Esta clínica presta vários serviços, tais como, serviços de saneamento em explorações pecuárias, serviço de acompanhamento reprodutivo de explorações pecuárias, serviço de urgências a espécies pecuárias, serviço de clínica de pequenos animais, serviço de urgência de pequenos animais e ainda venda de alimentação de pequenos animais. De modo a facilitar a gestão de equipas, divide-se o trabalho das diferentes áreas de laboração entre a manhã e a tarde, clínica ambulatória de animais de pecuária e clínica de pequenos animais, respetivamente. Assim, durante o período de estágio, que se compreendeu entre setembro de 2019 e fevereiro de 2020, tive oportunidade de trabalhar nestas duas áreas, sendo que, por questões de casuística incidiu mais sobre os pequenos animais.

Casuística geral da instituição durante o período de estágio



Gráfico 1: Casuística geral do estágio da autora na clínica veterinária Centro de Saúde animal.

Quanto à casuística na parte de animais de produção, os serviços são realizados um pouco por todo o distrito de Portalegre e posso afirmar que a maior parte, serão serviços de sanidade animal, vacinação e desparasitação de efetivos bovinos, ovinos, caprinos e alguns suínos. Do serviço de sanidade, faz parte, a recolha de sangue para deteção de brucelose e intradermotuberculinização para deteção de tuberculose. No entanto, tive oportunidade de assistir a situações de urgência do foro reprodutivo como, por exemplo partos, retenção de membranas fetais, prolapsos vaginais e

uterinos, mas também situações de foro bacteriológico e parasitológico, como manadas infectadas com brucelose, besnoitiose e babesiose.

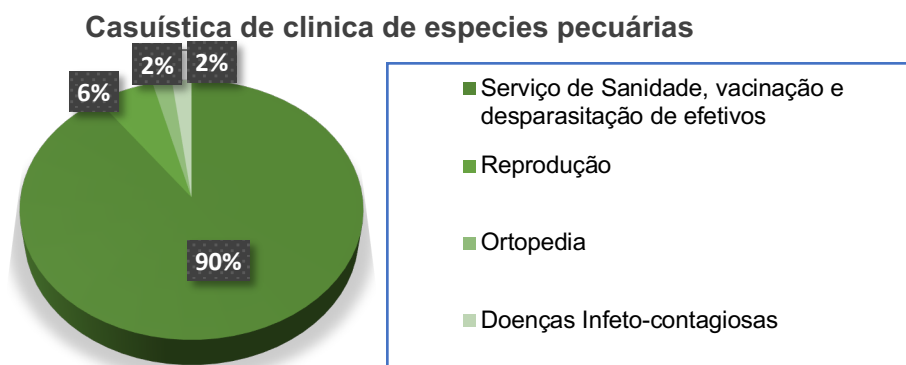


Gráfico 2: Casuística de clínica de espécies pecuárias no Centro de saúde animal durante o estágio.

Apesar do meu gosto pelo trabalho no campo e da sua extrema importância em matérias da sanidade animal e consequentemente da saúde pública, durante o meu estágio o objetivo foi predominantemente aprender tudo aquilo que pudesse fazer parte do dia-a-dia da clínica de campo.

Quanto à parte da clínica de pequenos animais, a casuística foi muito variada, abrangendo a maioria das doenças de todos os sistemas orgânicos. A atividade mais comum foi a vacinação, desparasitação e colocação de microchip em felídeos e canídeos. A componente de cirurgia tem também um peso importante nesta instituição tanto em felinos como em canídeos e, esporadicamente mustelídeos, realizando assim ovariohisterectomias eletivas e derivadas de piómetras, orquiectomias eletivas, nodulectomias, cistolitotomia, laparotomia exploratória para remoção de corpos estranhos, remoção da glândula da membrana nictitante, remoção do globo ocular, resolução de hérnias umbilicais (herniorrafia). Nas consultas de especialidade tratamos de vários assuntos, nomeadamente, ortopedia (principalmente para diagnóstico e controlo de displasia da anca), medicina interna, otorrinolaringologia, urologia, oncologia, neurologia, virologia, parasitologia, dermatologia, estomatologia, reprodução.

Nesta componente, tive oportunidade de desenvolver todas as minhas competências, desde a vacinação à cirurgia, a qual, sempre foi uma área que me fascinou. Com este interesse crescente, dediquei maior parte do final do meu estágio.

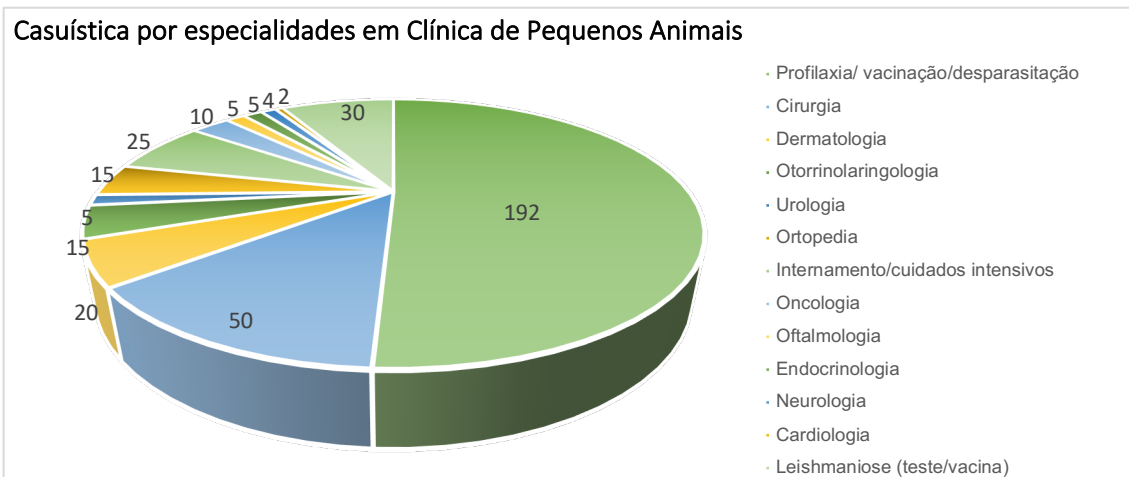


Gráfico 3- Casuística por especialidades durante o período de estágio de Setembro a Março na clínica Centro de Saúde animal.

1. Introdução

A brucelose, é caracterizada por uma doença zoonótica, ou seja, transmitida dos animais para os humanos, de distribuição mundial, responsável pela maior morbilidade humana mundial, o que atribui a esta doença, uma preocupação acrescida, por constituir um assunto importante em matérias de saúde pública. (Franc et al. 2018).

Provocada por uma bactéria do género *Brucella*, que sobrevive e se multiplica dentro das células fagocíticas do hospedeiro, podendo ser sequestrada pelos monócitos e macrófagos do sistema mononuclear fagocítico, tais como, linfonodo, fígado, baço e medula óssea. Esta bactéria pertence à família *Brucellaceae*, ordem *Rhizobiales* da classe das alfa-protobactérias e são proximamente relacionadas com géneros filogenéticos, tais como *Agrobacterium*, *Phyllobacterium*, *Rhizobium* e *Ochrobactrum*. Membros da classe Protobacteria, incluem famílias de organismos que estabelecem relações íntimas com plantas ou células animais, assim como, possuem a capacidade de crescimento intracelular, como agente patogénico ou seres simbiotes. (Saavedra, Ballem, et al. 2019).

Existem no mundo várias estirpes da mesma, de acordo com a espécie infetada, nomeadamente, *B. abortus*, *B. ovis*, *B. mellitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. canis* (Nathan e Scobell 2012).

O género *Brucella* está classificado em 12 espécies conhecidas, as quais, estão representadas na seguinte tabela.

Nos humanos, a infeção pode ser causada por cinco espécies de *Brucella* spp., *B. mellitensis*, é a estirpe mais invasiva e patogénica para esta espécie. A infeção é adquirida pelas vias oral, respiratória e conjuntival, uma vez que esta bactéria tem a capacidade de aerossolização, o Centro para o controle e doenças dos EUA (Estados Unidos da América) chega a considerar as espécies de *B. mellitensis*, *B. abortus* e *B. suis* como potenciais armas biológicas ('bio-weapons'). O consumo de queijo de cabra fresco e de leite fresco não pasteurizado, é também uma grande fonte de infeção que, por vezes, pode até, ter um carácter sazonal coincidente com o desmame de borregos e cabritos (Seleem et al., 2009; Facciola et al., 2018).

Existem alguns grupos de risco, tais como, produtores de animais pecuários, cirurgiões veterinários e empregados na indústria cárnica, que revelam um risco maior devido à atividade profissional que desempenham, isto porque se encontram permanentemente em contacto com animais infetados. Assim, a redução de reservatórios animais, reduz consequentemente a incidência da infeção humana (Seleem et al., 2009; B. Lopes et al., 2010; Franc et al., 2018).

Tabela 1 - Espécies de *Brucella* e biovars, hospedeiros preferenciais e patogenicidade para os humanos. Adaptado de (Godfroid, Nielsen, e Saegerman 2010; Saavedra, Ballem, et al. 2019)

Espécies	Biovars	Hospedeiro preferencial	Patogenicidade em humanos
<i>B. melitensis</i>	1-3	Ovinos e caprinos	Alta
<i>B. abortus</i>	1-6,9	bovinos	Alta
<i>B. suis</i>	1,3	Porcos	Alta
	2	Javali e lebre	Baixa
	4	Veado e caribu	Alta
	5	Roedores	Não existe
<i>B. neomatoma</i>	-	Rato do deserto	Moderada
<i>B. ovis</i>	-	Ovinos	Não existe
<i>B. canis</i>	-	Canídeos	moderada
<i>B. pinnipedialis</i>	-	Foca	Desconhecido
<i>B. ceti</i>	-	Cetáceos	Desconhecido
<i>B. microti</i>	-	Solo, ratazana e raposa	Desconhecido
<i>B. inopinata</i>	-	Humanos	-
<i>B. papionis</i>	-	Babuínos	-
<i>B. vulpis</i>	-	Raposa Vermelha	-

Tabela 2- Características de *B. abortus* que a tornam agente de bioterrorismo. (Pepper, Choi, e Gerba 2009)

Doença (agente)	Dose infectável 50	Perigo na água	Perigo de aerossol
<i>Brucella abortus</i>	10-100 cel	Provável	Não estudado

A brucelose, é prontamente transmissível aos humanos, causando uma doença febril, de caráter ondulante, que pode evoluir para uma forma mais crónica e desenvolver serias complicações a nível do sistema músculo esquelético, cardiovascular e sistema nervoso central (Saavedra, Ballem, et al. 2019).

Após a infeção por esta bactéria Gram-negativa são manifestações clínicas características, os problemas reprodutivos, tais como aborto e falha reprodutiva.

Nos animais, o sinal clínico mais comum é o aborto, a bactéria transmite-se principalmente, por contacto direto com abortos, produtos de aborto, como as matérias fetais e líquido amniótico, mas também através do contacto entre membranas mucosas durante a reprodução e também pela alimentação animal. (Godfroid 2002; Pappas e Papadimitriou 2007).

2. Revisão bibliográfica

2.1. Prevalência da Brucelose

As zoonoses são doenças transmissíveis dos animais para os humanos, através do contacto de comida, água e ambiente e representam um verdadeiro problema de saúde pública. Atualmente, a brucelose é a doença zoonótica bacteriana mais comum no mundo. Particularmente em países em desenvolvimento como África, países mediterrânicos e países da Ásia central.

A brucelose existe há muitos séculos e a sua distribuição geográfica muda constantemente, com o aparecimento de novos ‘foci’ (focos de doença) emergentes ou re-emergentes. A brucelose humana, tem sofrido mudanças nos últimos anos, devido a mudanças sanitárias, socioeconómicas e de foro político, mas também com o aumento da globalização que caracteriza os tempos que correm. (Seleem et al. 2009)

A brucelose é uma doença que pode ser datada deste a era egípcia, por volta do ano 1600 a. C, onde esqueletos encontrados dessa mesma era apresentaram marcas de sacroileíte e outras lesões osteoarticulares compatíveis com os sinais clínicos e patogenia da brucelose. (Pappas e Papadimitriou 2007)

Brucella mellitensis (*Micrococcus mellitensis* na altura) em 1887 foi isolada por Davis Bruce do baço de um soldado britânico que morreu de uma patologia febril, à qual deram o nome de Febre de Malta, patologia comum entre as pessoas que circularam neste local durante a guerra. Esta febre permaneceu um mistério até Themistocles Zammit, acidentalmente, demonstrar a natureza zoonótica desta bactéria através do isolamento de *B. mellitensis* de caprinos saudáveis, sabendo então que estas não seriam a origem da *Brucella*, uma vez que não ficavam doentes após inoculação com *Brucella*, eram apenas portadores desta bactéria. (Wyatt 2005)

Os países onde a brucelose foi erradicada têm este estatuto devido à ausência de qualquer caso durante o período mínimo de cinco anos, assim classificam-se como “Officially Brucellosis Free” (OBF) que significa Oficialmente Livre de Brucelose (OLB).

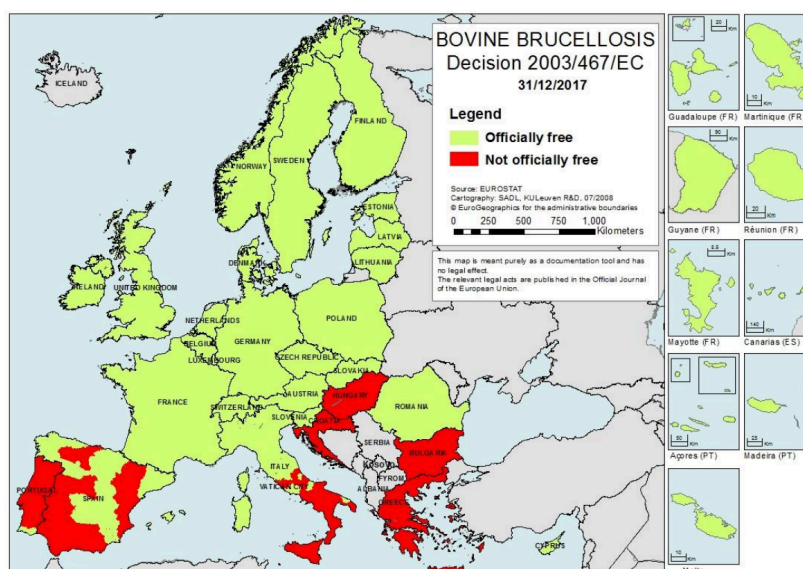


Figura 1 - Status de brucelose bovina da União Europeia, no ano 2017. Adaptado de (UE - European Union 2017)

Na Europa, existem vários países OLB, entre os quais: como descrito na tabela seguinte (tabela 3). Grécia, Itália, Hungria, Bulgária, Portugal e Espanha são países da Europa que continuam com a presença desta doença (Godfroid e Käsbohrer 2002; Pappas et al. 2006).

Tabela 3- Países europeu considerados oficialmente livres de Brucelose no ano de 2017. Adaptado de (UE - European Union 2017)

Países Oficialmente Livres de Brucelose	
Áustria	Lituânia
Bélgica	Luxemburgo
Chipre	Malta
Republica Checa	Holanda
Dinamarca	Noruega
Estónia	Polónia
Finlândia	Roménia
França	Eslováquia
Grécia	Eslovénia
Irlanda	Suécia
Letónia	Suíça

Em Portugal, a brucelose foi reportada pela primeira vez nos Açores em 1947, e o programa de erradicação da mesma começou em 1950, sendo reforçado em 1994 pelo programa de cofinanciamento Europeu para erradicação da brucelose. No ano 2000 algumas ilhas como Corvo, Flores, Graciosa e Pico foram classificados como OLB.

Neste documento encontra-se em anexo o relatório da DGAV (Direção Geral de Alimentação e Veterinária) relativo à Brucelose Bovina no ano 2017.

Inicialmente, vacinaram-se os efetivos com a vacina S19, sendo mais tarde substituída pela S45/20. Quando a prevalência da doença atingiu valores inferiores a 1%, a vacinação dos efetivos cessou, o que levou ao imediato aumento da população afetada, iniciando-se assim a vacinação com RB5, pois não seria detetada nos testes diagnósticos convencionais para esta doença. Com a erradicação da doença em algumas ilhas, Portugal tem taxas de incidência de cerca de 49,9% (Martins et al. 2009).

2.2. Brucelose em animais selvagens e caça

A brucelose é uma importante doença zoonótica que pode infetar várias espécies de mamíferos, tanto humanos como animais. Segundo alguns autores, o maior condutor de transmissão, será o comportamento e interação entre a fauna selvagem e os animais pecuários e humanos (FAO e WHO 1986).

Os agentes causadores de brucelose em animais selvagens são os mesmos que provocam brucelose em espécies pecuárias, embora *B. abortus* e *B. suis* apareçam mais frequentemente na fauna silvestre.

Vários agentes infecciosos, especialmente aqueles que causam doenças emergentes, infetam mais do que um hospedeiro. Controlar os reservatórios de doenças com vários hospedeiros possíveis tem, muitas vezes, um papel deveras importante no controlo de doenças. Contudo, a definição de reservatórios continua muito abrangente e pouco definida. Um reservatório define-se, com base numa população específica, como uma ou mais populações ou ambientes ligados epidemiologicamente, no qual o patógeno pode permanecer durante um período de tempo com capacidade de infetar a população-alvo. A existência de um reservatório é confirmada quando a infeção de uma população específica não consegue ser controlada, mesmo quando a população-alvo e a população não-alvo são eliminados (Haydon et al. 2002).

A longa disputa entre os produtores e as autoridades, de um lado, e os conservadores da vida selvagem, por outro, é baseada nas diferentes atitudes em relação ao controlo de doenças que são ou podem ser associadas com a vida selvagem. A criação de novas interfaces entre o gado e a fauna selvagem devido à atividade humana é o fator mais importante na transmissão da doença (Bengis, Kock, e Fischer 2002).

Apesar das respetivas preferências de hospedeiro, *Brucella* spp., *B. abortus* e *B. suis* já foram isoladas de muitas outras espécies, como é o caso do bisonte (*Bison bison*), o veado (*Cervus elaphus*), o javali (*Sus scrofa*), raposa vermelha (*Vulpes vulpes*), da lebre comum (*Lepus europaeus*), búfalo africano (*Syncerus caffer*), rena

(*Rangifer tarandus tarandus*) e o caribu (*Rangifer tarandus groenlandicus*). Por esta razão, a vida selvagem deve ser considerada como um potencial reservatório da brucelose (Godfroid 2002; Rhyan 2014). Contudo, esporadicamente foram reportados casos na Europa de cabras montesas (*Rupicapra rupicapra*) e muflões (*Capra ibex*) nos alpes (Garin-Bastuji *et al.*, 1990; Ferroglio *et al.*, 1998).

Outro aspeto importante relacionado com a brucelose é a forma como se distingue uma infeção por ‘*spillover*’ proveniente do gado, ou uma infeção sustentável na fauna selvagem. Entende-se por ‘*spillover*’ ou transbordamento, um fenómeno crítico nos eventos de emergência, quando a “oportunidade ecológica” é responsável pela ampliação de espectro de hospedeiros de um determinado agente infeccioso. (Confalonieiri 2010)

Se a infeção na fauna selvagem for sustentável, a preocupação dos produtores será, evitar a re-introdução da infeção na manada, particularmente em regiões que são OLB devido aos custos da testagem de pré-movimentação (Gardner, Hietala, e Boyce 1996).

Deve dar-se ênfase a que a introdução de indivíduos infetados para uma população saudável não é só por si suficiente para causar transmissão efetiva da *B. spp.* considerando um hospedeiro selvagem. A probabilidade da brucelose se estabelecer e ser sustentável numa espécie selvagem pode ser menor do que a probabilidade de infeção, e perto de zero em alguns casos. Isto deve-se ao facto da sustentabilidade da doença depender da combinação de três fatores, entre os quais: suscetibilidade (ou resistência) do hospedeiro, dose infetante, contactos (repetidos) com animais infetados e fatores ambientais e de manejo (Gardner et al. 1996).

Na América do Norte, a maior probabilidade de transmissão do agente infeccioso entre os animais selvagens e o gado dá-se em explorações de bovinos em regime extensivo para produção de carne, onde a fauna selvagem e os bovinos partilham comida, água e fontes de minerais (Van Campen e Rhyan 2010).

Tabela 4 - Animais selvagens presentes nas respetivas bioregiões. Adaptado de (Muñoz et al. 2010)

Bioregião	Meio ambiente	Animais selvagens
1- Atlântico	Clima atlântico com alta precipitação. Pastos e florestas decíduas. Habitats de montanha. Quase sem cercas de Habitats da vida selvagem.	Javali e corça abundantes. Localmente veado vermelho abundante. Camurça em alta altitudes (Mts da Cantábria)
2- Norte Plateau	Clima mediterrâneo continental. Seco, verões quentes, invernos secos e frios. Aberto,	Ungulados em expansão e localmente abundantes. Camurça limitada a grandes altitudes no Pirineus. Localmente íbex e gamo

	paisagens de cereais com pinho ou carvalho florestas, limitadas ao norte por montanhas. Pequena esgrima	
3- Sul central	Continental Thermo Mediterrâneo clima. Pastagens e culturas com vegetação intercalada, às vezes formando estruturas semelhantes a savanas. Baixo montanhas de altitude com matagal. Esgrima frequente	Javali e veado-vermelho, muitas vezes em alta densidade; alimentação e rega. Localmente gamos abundantes e íbex ibérico, e introduziu bovinos selvagens
4- Interior montanhas	Mediterrâneo continental grave clima. Montanha de pedra calcária e habitats de planalto com culturas de cereais, pastagens e florestas de pinheiros e carvalhos. Pequena esgrima	Javali, corça e íbex amplamente distribuído, mas geralmente a moderado abundância. Cervo vermelho localmente abundante.
5- Sul e costa leste	Clima Mediterraneo litoral; árido na porção central. Poucos bem habitats de vida selvagem preservada (montanhas). Pequena esgrima	Javali abundante nas regiões norte e extremidades do sul. Outros ungulados localmente abundante

Brucella spp. não se multiplica fora do seu hospedeiro mamífero mas, pode permanecer viável no ambiente, por determinado período de tempo, por exemplo, *B. microtti* pode permanecer viável durante vários anos. No geral, a viabilidade da *Brucella* fora do seu hospedeiro é melhorada com baixas temperaturas e elevada percentagem de humidade (sobrevivência até 185 dias) coincidente com a altura do inverno no nosso país, e é limitada por altas temperaturas, baixa humidade e exposição à luz solar (poucas horas). No caso de fetos abortados, estrume e água, a *B. abortus* pode sobreviver de 150 a 240 dias (Godfroid et al. 2013).

Desde os primeiros esforços para a erradicação da brucelose na União Europeia (EU) e nos Estados Unidos da América (EUA) mais focado na brucelose bovina, o ênfase nestes países foi posto na hipótese de *B. abortus* ter um reservatório natural na fauna selvagem. Quando a brucelose era prevalente nos bovinos, foram feitas numerosas pesquisas para identificar resultados ocasionais de ungulados selvagens seropositivos, nomeadamente cervídeos sobre determinadas condições de liberdade, a infeção foi considerada auto-limitante ou a consequência de uma infeção ‘*spillover*’ (Van Campen & Rhyan, 2010; Rhyan, 2014).

Na Europa, o isolamento de *B. abortus* em javalis, até à data ainda não foi reportado. Uma pesquisa na Península Ibérica realçou que os ruminantes não são considerados reservatórios significantes de brucelose no gado (Muñoz et al. 2010).

O biovar da *Brucella abortus*, apenas foi isolado de um veado, provavelmente, fonte de um 'spillover' de bovinos infetados. Estes resultados sugerem, que na Europa, os ruminantes selvagens sejam, ocasionalmente, vítimas de brucelose transmitida por espécies pecuárias, ao invés de verdadeiros reservatórios da doença. Os dados epidemiológicos existentes comprovam que sem a introdução da doença pelas espécies pecuárias, os ruminantes selvagens não são capazes de sustentar a infeção por *B. abortus* (Muñoz et al. 2010).

A sequência de eventos, seguida da introdução da infeção por *Brucella*, na vida selvagem, é particularmente semelhante às infeções descritas nos animais domésticos.

Contudo, a prevalência da brucelose em algumas espécies selvagens é bastante baixa e, portanto, para além dos fatores clássicos considerados importantes na transmissão - tais como: suscetibilidade do hospedeiro, configuração, sobrevivência no hospedeiro, etc. - o comportamento individual e as interações entre a fauna selvagem e o gado, podem ser, atualmente, a principal fonte de transmissão.

Por instância, o comportamento adotado por alguns ruminantes selvagens, no momento de parto, caracterizado por um afastamento da mãe e do recém-nascido da manada, reduzindo grandemente a transmissão da doença para a restante manada, o que, numa situação de infeção pode provocar um final à situação. Por outro lado, situações com importantes efeitos antrópicos (por exemplo, alimentação propositada dos animais selvagens durante o inverno ou a mistura de animais selvagens com o gado em locais de alimentação), o risco de infeção aumenta dramaticamente, devido a densidades animais elevadas e risco de exposição a abortos junto dos comedouros, podendo também, levar à contaminação do alimento (Van Campen e Rhyan 2010).

2.3. *Brucella abortus*

Infeção por *Brucella* em bovinos é normalmente causada por biovars de *Brucella abortus*. Em alguns países nomeadamente na Europa, África e Oeste Asiático, onde os bovinos são mantidos em contacto com ovelhas e cabras de forma próxima, sendo que a sua infeção pode ser devida a *B. melitensis*. Ocasionalmente, a *Brucella suis*, pode também causar uma infeção crónica da glândula mamária dos bovinos, mas não está provado que possa causar aborto ou disseminar-se pelos animais. (OIE - World Organization for Animal Health 2018).

2.3.1. Patogenia e sinais clínicos e patologia da infecção

A brucelose bovina está relacionada com aborto no terceiro trimestre de gestação, produz vitelos recém-nascidos fracos e também pode causar infertilidade em vacas e touros (Xavier et al. 2009).

A *Brucella abortus* foi inicialmente localizada em exsudados dos espaços intervilosidades da placenta de uma vaca prenha com risco de aborto eminente (Poester, Samartino, e Santos 2013).

Devido ao seu potencial zoonótico, a brucelose deve ser distinguida de outras doenças que causam aborto em bovinos, tais como, Leptospirose, Clamidiose e Campilobacteriose. Os sinais da infecção em bovinos, dependem de entre vários fatores, da idade estado reprodutivo e imunitário, resistência natural, via de infecção, virulência e estirpe infetante (Adams 2002; Neta et al. 2010).

Após a infecção por *Brucella spp.*, ocorre um episódio de aborto, não implicando o sucesso das seguintes gestações e partos. Os vitelos que adquirem a infecção por via vertical ou horizontal, ou por ingestão de leite contaminado podem permanecer serologicamente negativos e não revelar sinais de doença. Contudo, as novilhas com infecção assintomática latente podem abortar ou parir vitelos infetados, o que é muitas vezes a razão para todo o efetivo permanecer infetado (Jones et al. 1980). Outros sinais clínicos de infecção em fêmeas bovinas incluem redução na produção de leite, aumento do número de células somáticas no leite, assim como o comprometimento da eficiência reprodutiva (Meador e Deyoe 1989a).

A transmissão venérea da doença tem um papel relevante em explorações de grandes dimensões onde a inseminação artificial das fêmeas é o método de reprodução de eleição, embora constitua uma importante fonte de infecção, no caso de utilização, acidental, de sémen contaminado (Wilesmith, 1978; Paul Nicoletti, 2020).

Já os touros infetados, podem desenvolver sinais sistémicos de infecção, incluindo febre, anorexia, depressão, embora a sua infecção seja usualmente discreta ou inaparente. A lesão mais significativa em touros é orquite que está normalmente associada com vesiculite seminal e epididimite. Como resultado de orquite crónica e fibrose do parênquima testicular, os touros afetados podem sofrer infertilidade permanente (Rhyan et al. 1997).

Os fetos abortados, assim como as membranas fetais e secreções uterinas eliminadas após o aborto ou o parto, são segundo alguns autores as mais importantes fontes de infecção (Baum et al. 2010).

Apesar das vias descritas anteriormente, a infecção pode ocorrer através da pele, conjuntiva ocular, pela mucosa respiratória por inalação. A mais comum no gado

é através do trato gastrointestinal, onde a *Brucella* irá replicar-se nos fagócitos intracelulares dos linfonodo regionais. De seguida, há uma invasão dos vasos linfáticos que desencadeia uma bacterémia que leva a uma infeção sistémica, favorecendo assim a colonização do útero grávido, dos órgãos genitais masculinos e da glândula mamária (Anderson, Cheville, e Meador 1986; Ko e Splitter 2003a, 2003b).

A *Brucella abortus*, tem um forte tropismo para o útero durante o último terço de gestação, o qual se deve a altas concentrações de eritrol e hormonas esteróides. O eritrol favorece a sobrevivência bacteriana, uma vez que é metabolizado pela *B. abortus*, como fonte de carbono e energia (Samartino e Enright 1996).

As células trofobásticas fagocíticas localizadas na base das vilosidades coriônicas dos ruminantes são consideradas o primeiro local de invasão dos tecidos placentários, de onde a *B. abortus* se dissemina para os trofoblastos intercotiledonares (Anderson et al. 1986).

A multiplicação da *Brucella abortus* induz infiltração das células inflamatórias, necrose trofoblástica, vasculite e ulceração do alantocórion. Consequentemente, as trocas do metabolismo feto-mãe são comprometidas, resultando em aborto (Anderson et al. 1986).

As alterações encontradas nos úteros grávidos e fetos não são, por si só, suficientes para o diagnóstico de *B. abortus*. Normalmente, as vacas gestantes desenvolvem uma linfadenopatia no local de infeção que progride para uma linfadenite aguda (Neta et al. 2010).

O útero infetado contém quantidades variáveis de exsudado amarelo acastanhado com cheiro fétido, contendo fibrina e detritos fibrinosos. Usualmente as lesões uterinas menos severas podem não resultar em aborto, mas são comumente, associadas a vitelos fracos ao nascimento, resultando numa taxa de mortalidade neonatal elevada (Xavier et al., 2009; Neta et al., 2010).

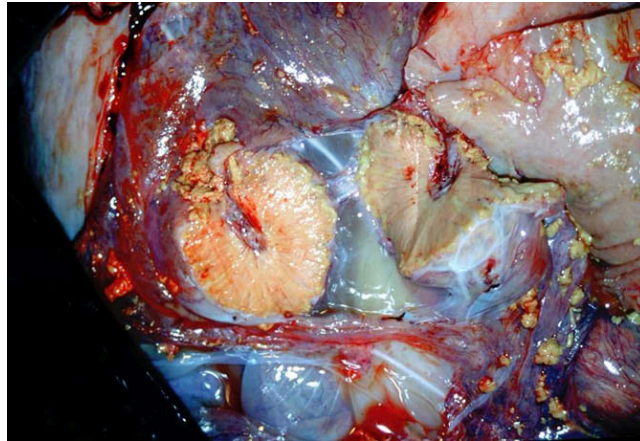


Figura 2- Vaca infectada com *B. abortus*. Útero apresenta vários locais com exsudado fibrinoso na superfície dos carúnculos uterinos. Superfície de corte de um placentoma, com exsudado fibroso necrótico e hemorragia multifocal (placentite necrosante). Adaptado de (Neta et al. 2010)

Alterações microscópicas não são patognomónicas, mas são mais específicas. histologicamente, células trofoblásticas são células-alvo primárias na placenta. Estas tornam-se edemaciadas e são preenchidas com cocobacilos. Normalmente existe um infiltrado inflamatório neutrofílico e histiocítico associado a necrose, edema, deposição de fibrina e alguns casos de vasculite (Xavier et al. 2009).

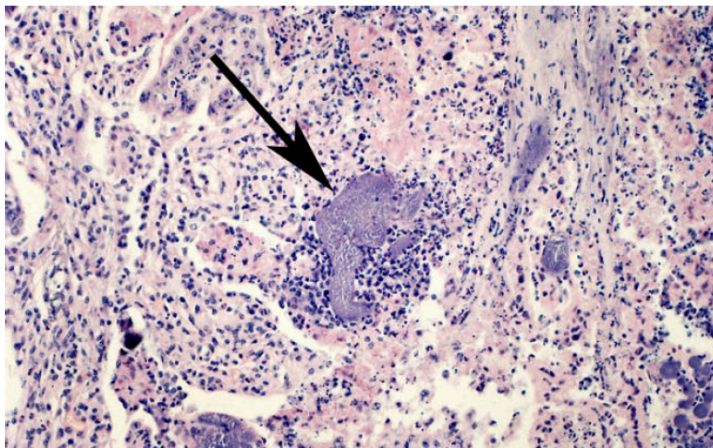


Figura 3 – Corte histológico de placentoma de vaca infectada com *B. abortus*, com criptas carunculares preenchidas com detritos, infiltrado inflamatório intenso, e inúmeras colônias bacterianas (seta) – placentite necrótica aguda. Hematoxilina eosina 50x. Adaptado de Neta et al. 2010).

O endométrio é severamente infiltrado com neutrófilos, linfócitos, células plasmáticas e alguns eosinófilos. A reação inflamatória está associada a erosões multifocais ou ulcerações superficiais do epitélio luminal, detritos necróticos nas criptas carunculares e, superfície endometrial contendo grande número de bacilos extracelulares de *B. abortus* (Figura 3). Semanas após o aborto, o infiltrado inflamatório uterino é restrito a uma distribuição periglandular e perivascular. (Payne, 1959; (Meador & Deyoe, 1989a, 1989b; Xavier et al., 2009)

A glândula mamária é também um órgão-alvo importante na transmissão da infecção, através de leite contaminado. A *B. abortus* é capaz de induzir uma mastite intersticial multifocal, com acumulação intersticial de macrófagos e infiltração intraacinar de neutrófilos, associado a organismos intracelulares predominantemente em números moderados (Figura 4) (Payne, 1959; Meador & Deyoe, 1989b; Xavier *et al.*, 2009).

As mudanças histopatológicas, incluem hiperplasia dos linfonodos que possam estar associados a infiltrados neutrofílicos, os quais podem progredir para linfadenite granulomatosa (Meador e Deyoe 1989a; Xavier *et al.* 2009).

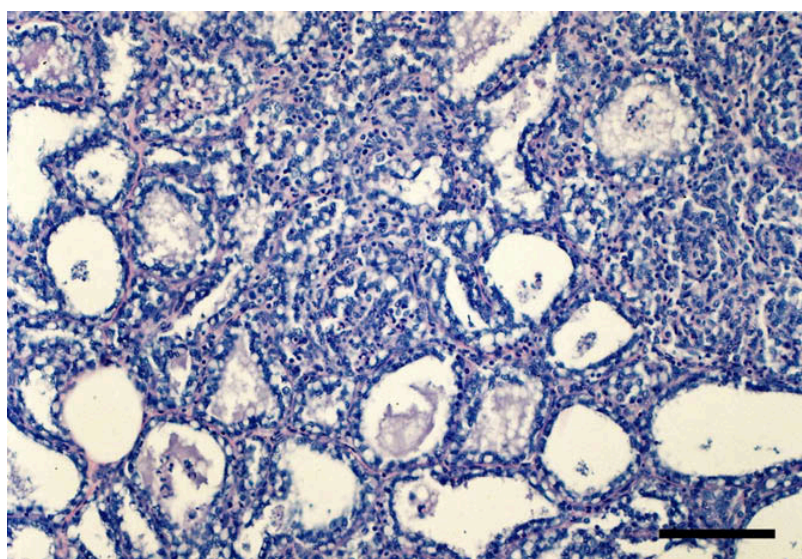


Figura 4 - Corte histológico de glândula mamária de vaca experimentalmente infetada com *B. abortus*, com infiltração intersticial focal de linfócitos, macrófagos e neutrófilos num lúmen acinar. Hematoxilina eosina 50x. Barra =100µm. Adaptado de Neta *et al.* 2010).

No campo, os fetos abortados muitas vezes não estão disponíveis devido ao estado de autólise avançado, contudo, o feto pode entrar em autólise ainda dentro do útero. O achado mais frequentemente em fetos é a pleuropneumonia, onde a pleura se encontra espessada, edematosa, hemorrágica e coberta de fibrina, caracterizando a pleurite fibrinosa. O pulmão pode apresentar áreas de pneumonia, de consistência firme e com o septo interlobular espessado. Pode ainda ocorrer peritonite e pericardite (Gorham *et al.*, 1986; Xavier *et al.*, 2009; B. Lopes *et al.*, 2010).

Histologicamente, a pleurite fibrinosa pode estar associada a pneumonia bronco-intersticial, caracterizada por acumulação de macrófagos e neutrófilos, quantidades variáveis de fibrina, hemorragias e presença de bactérias associadas com as lesões (Figura 5). Em alguns casos, são observados no parênquima pulmonar processos de vasculite necrosante (Meador & Deyoe, 1989a; Smartino & Enright, 1993; Pérez *et al.*, 1998; Xavier *et al.*, 2009).

Os fetos abortados podem apresentar um aumento dos linfonodos ilíacos, bronquiais e hepáticos, aumento das glândulas adrenais e hipotrofia do timo, que pode estar associado com hemorragias petequiais (Smartino e Enright 1993)

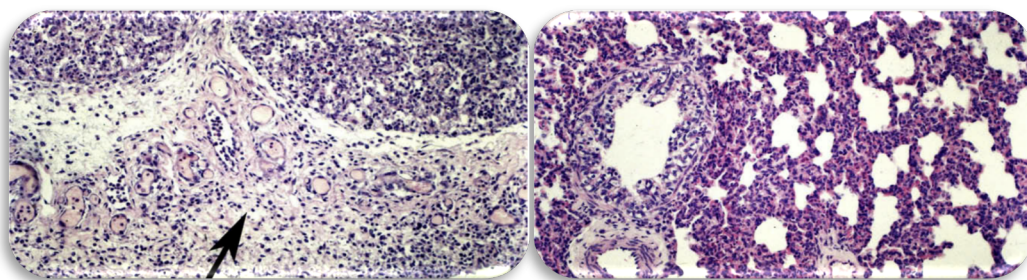


Figura 5 – imagem da esquerda: Corte histológico de pulmão de feto abortado devido a *B. abortus*, com pleura visceral severamente espessada (seta), acumulação de fibrina e infiltrado inflamatório difuso (pleurite fibrinosa); hematoxilina eosina 50x. Imagem da direita: Corte histológico de pulmão de bezerro frágil à nascença devido a *B. abortus*, com espessamento das paredes alveolares e infiltrado inflamatório no espaço intersticial (pneumonia intersticial); Hematoxilina eosina 50x. Adaptado de (Neta et al. 2010)

Esta bactéria gram-negativa incide na sua patogenia em duas etapas importantes, entre as quais: porta de entrada no organismo e a sua capacidade de permanência dentro da célula do hospedeiro:

A porta de entrada desta bactéria no organismo, dá-se através da invasão de células fagocíticas ou não da mucosa intestinal, mais propriamente, pelas células M. Os fagócitos intra-epiteliais podem também favorecer migração transepitelial e transportar a *B. abortus* para a submucosa e lâmina própria (Ackermann, Cheville, e Deyoe 1988).

Após a entrada na célula, a sobrevivência de *B. abortus* depende, maioritariamente, da sua capacidade de sobreviver ao ambiente intrafagossomal.

- Porta de entrada:

- O fator chave na patogénese de *B. abortus* é a capacidade de invadir células fagocíticas e não fagocíticas. A *B. abortus* é capaz de invadir a mucosa intestinal, preferencialmente pelas células M. Os fagócitos intra-epiteliais podem também favorecer migração transepitelial e transportar a *B. abortus* para a submucosa e lâmina própria (Ackermann et al. 1988).

- A bactéria opsonizada, fagocitada pelos macrófagos ativados, é normalmente destruída dentro do fagolisossoma, antes de chegar aos locais de replicação intracelular (Gorvel e Moreno 2002).

- Apesar da *B. abortus* ser capaz de invadir as linhas de células epiteliais e as células trofoblásticas bovinas, é muito menos invasiva que outras patogéneos bacterianos intracelulares facultativos como a *Salmonella enterica* (Santos e Bäumlér 2004).

- Permanência dentro da célula

- Depende da sua capacidade de resistir ao ambiente intrafagossomal e a sua capacidade de inibir a fusão de fagossoma e lisossoma (Pizarro-Cerdá et al. 1998; Porte, Liautard, e Köhler 1999; Wang et al. 2001).

- Estes processos são desencadeados pela internalização de *B. abortus* que, redireciona o tráfego intracelular, alterando o processo de maturação normal do fagossoma e, bloqueando a fusão dos lisossomas com os fagossomas que contêm a *B. abortus* (Gorvel e Moreno 2002).

- O tráfego intracelular de *B. abortus* e a sua capacidade de sobreviver no meio intracelular não é identificada em todos os tipos de células, como por exemplo, os neutrófilos (Jiang & Baldwin, 1993; Gorvel & Moreno, 2002;).

- As GTPases também são ativadas durante a fase de tráfego intracelular de *B. abortus*, mas estas são diferentes daquelas ativadas durante o processo de invasão. Contudo, a invasão e o tráfego intracelular parecem ser independentes (Pizarro-Cerdá et al., 1998; Guzmán-Verri et al., 2001; Gorvel & Moreno, 2002;).

- A acidificação dos vacúolos que possuem *B. abortus* durante as primeiras fases de infecção são também importantes para a posterior sobrevivência dentro da célula. Este ambiente acidificado induz mudanças no perfil da expressão génica da bactéria, favorecendo a sua sobrevivência intracelular (Porte et al. 1999)

- Análises à ultra-estrutura de células infetadas com *B. abortus* identificaram o retículo endoplasmático rugoso (RER) como o local de replicação preferencial (Anderson et al., 1986; Meador & Deyoe, 1989b; Dettloux et al., 1990;).

- *Brucella abortus* limita a sua replicação aos compartimentos primários e o RER é o único compartimento que contém ambiente ótimo para a replicação bacteriana. A replicação intracelular de *B. abortus*, nas células trofoblásticas é fortemente influenciada pelo tempo de gestação, com taxas de replicação elevadas nos trofoblastos, durante o final da gestação. Enquanto todas as células libertam hormonas esteróides nos trofoblastos, *B. abortus*, induz a síntese de esteróides e modifica o metabolismo dos precursores da prostaglandina, favorecendo, assim, o crescimento bacteriano (Anderson et al. 1986; Samartino, Truax, e Enright 1994)

- Adicionalmente, as mudanças hormonais têm lugar em placentas infetadas, com níveis de prostaglandinas (PGF₂ α) aumentados, uma diminuição na progesterona e um aumento no estrogénio e cortisol. Estas mudanças mimetizam vagamente o que acontece após o parto e é muito provável que contribuam para o aborto (Gorvel e Moreno 2002) .

- A *B. abortus*, não possui mecanismos de virulência clássicos, como as exotoxinas, citosinas, cápsulas, fimbrias, flagelos, plasmídeos, fagos lisogénicos,

variação antigénica, lipopolissacáridos endotóxicos (LPS) nem indutores da apoptose da célula hospedeira, pois *B. abortus* depende de fatores de virulência que permitem a invasão e a sobrevivência dentro da célula. (Detilleux et al. 1990; Pizarro-Cerdá et al. 1998)

2.3.2. Diagnóstico

Em termos de diagnóstico, não existe um teste que identifique a *Brucella* inequivocamente. Com isto, para a identificação definitiva são necessários meios bacteriológicos e moleculares (Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis, 1986; Alton et al., 1988).

Os sinais de brucelose não são patognomónicos nos bovinos nem na fauna selvagem, e o diagnóstico definitivo depende de testes laboratoriais. O diagnóstico laboratorial inclui os testes diretos e indiretos que podem ser aplicados a nível de sangue e leite. A escolha da estratégia de diagnóstico depende da prevalência epidemiológica da brucelose em animais suscetíveis (bovinos e fauna selvagem) numa região ou país. O isolamento de *Brucella spp.* (ou deteção específica de DNA - Ácido desoxirribonucleico - por PCR) permite uma determinada quantidade de diagnósticos. (Le Flèche et al. 2006).

Contudo, quando um biovar específico é esmagadoramente mais isolado num país ou região, a tipificação clássica não é de todo a mais adequada, neste contexto, novos métodos de 'fingerprinting', tais como *Multiple Locus Variable* [número de repetições 'tandem'] (MLVA) e *Multi Locus Sequence Analyses* (MLSA) estão a ser mais aceites e a ser usados como método de rotina para tipificação e 'fingerprinting' dos isolados para situações epidemiológicas (Le Flèche et al. 2006) .

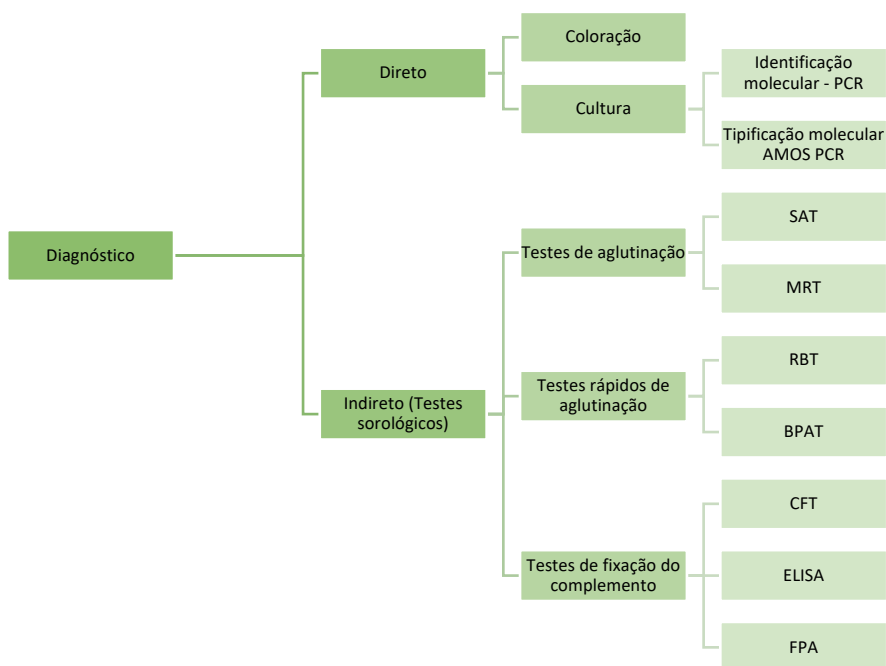


Figura 6 - Tipos de teste de diagnóstico de *Brucella abortus*. (adaptado de Godfroid, 2010)

Para o diagnóstico de brucelose, os testes que identificam o agente são métodos de diagnóstico direto, e testes que permitem a deteção de anticorpos de *Brucella spp.* designam-se de métodos indiretos, como representa a figura acima.

2.3.2.1. Diagnóstico direto

A coloração de esfregaços de material patológico ainda é utilizada e fornece informação importante em relação ao material proveniente do aborto. Novas técnicas de PCR que permitem a identificação e a tipificação da *Brucella spp.* têm sido desenvolvidas e têm sido implementadas em diagnósticos laboratoriais especializados. (Guzmán-Verri *et al.*, 2001; Bricker & Ewalt, 2005; Le Flèche *et al.*, 2006).

1. Coloração

Brucella spp. é um coccobacillus, mede cerca de 0,6 a 1,5 µm de comprimento e 0,5 a 0,7 µm de largura. Morfologicamente, a *Brucella spp.* está geralmente presente como bactéria individual, mas pode, ocasionalmente, ser observada em aglomerados de duas ou mais bactérias. A coloração com método de Ziehl–Neelsen modificado, ou Stamp, aparece da cor vermelha. Apesar desta coloração também ter o mesmo efeito noutras bactérias, como *Chlamydophila abortus* (antiga *Chlamydia psittaci*) e a *Coxiella burnetti*. Por esta razão, o seu uso, deve ser complementado por outros testes de diagnóstico mais específicos (Alton e Carter 1980; OIE - World Organizations for Anima health 2018).

II. Cultura

O isolamento de *B. abortus* de um determinado animal só se realiza para ter a certeza da presença da mesma. A escolha das amostras depende dos sinais clínicos observados. No caso da brucelose, uma amostra adequada inclui secreções vaginais, colostro, leite, ou fetos abortados (estômago, baço e pulmão), membranas fetais, esperma e fluido recolhido de artrites ou higroma. Em caso de exame *post mortem*, usado muitas vezes em ambiente de matadouro, o material preferido são dos órgãos genitais, baço e linfonodo orofaríngeos, ilíacos, escapulares, crurais, supramamários/testiculares (Godfroid et al. 2010).

A cultura das amostras (depois de devidamente homogeneizadas), é feita diretamente para os meios de cultura: Ferrell's (FM) e Thayer-Martin's modificado (mTM). (Godfroid et al. 2010).

Existe um novo meio de cultura seletivo, chamado CITA que é capaz de isolar todas as espécies de *Brucella spp.* de amostras provenientes diretamente do campo. Assim, uso simultâneo dos meios de cultura FM e CITA melhora a performance do diagnóstico de cultura (De Miguel et al. 2011).

Após quatro dias de incubação a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, com ar suplementado com CO_2 (dióxido de carbono) a uma saturação de 5-10% (v/v), as colónias de *Brucella* começam a aparecer em forma redonda, de diâmetro de 1-2 mm, com margens suaves e de coloração cor de mel pálida, translúcidas quando observadas de num meio transparente convexo e, aparecem branco pálido quando observadas pela face inferior do meio de cultura. Estas colónias, podem evoluir para outras formas conforme o tempo que estiverem incubadas. As colónias podem ser visíveis três ou quatro dias após a cultura, mas só podem ser consideradas negativas após sete dias de incubação sem qualquer vestígio de crescimento. A identificação presuntiva de *Brucella spp.* é conduzida através de análise morfológica da colónia, da coloração gram, e dos testes de catálase, oxidase e urease (Alton and Carter 1980; Baum et al. 2010; OIE, 2018).

Identificação molecular e métodos de tipagem

O diagnóstico bacteriológico, baseia-se no isolamento e classificação da bactéria, que permite identificar a doença, de um modo inequívoco, sendo por isso considerado o "*gold standard*". Os métodos bacteriológicos possuem uma elevada especificidade e capacidade de diferenciação entre espécies e biovars. O tipo de amostras colhidas, o método de colheita e o acondicionamento adequado para o envio ao laboratório são fundamentais para aumentar a sensibilidade do isolamento (Bricker e Ewalt 2005; Le Flèche et al. 2006).

Identificação molecular

Alguns métodos de identificação molecular baseados em PCR têm sido desenvolvidos. Os que apresentam maior fiabilidade são baseados na deteção de sequências específicas de *Brucella* spp. tais como os genes 16S e 23S. (Bengis *et al.* 2002; Baddour & Alkhalifa, 2008).

Estas técnicas têm sido usadas em amostras humanas, mas têm vindo a ser aplicadas na Medicina Veterinária. Contudo, a baixa sensibilidade, o elevado custo e a falta de standardização têm limitado a aplicação para problemas específicos, tais como estudos na fauna selvagem. Como regra geral, estas técnicas mostram sensibilidade de diagnóstico significativamente mais baixa do que a cultura, mas dependendo das amostras e da espécie animal considerada, a sua especificidade é próxima de 100% (Bricker 2002).

Tipificação molecular

Representa a identificação definitiva de colónias de *Brucella* spp. e é feita usando diferentes testes microbiológicos clássicos. Os mais importantes são a dependência de soro e CO₂ para o crescimento, a produção de ácido sulfídrico (H₂S), o crescimento na presença de algumas colorações, a aglutinação segundo o antissoro específico e a lise de fagos específicos. Para conduzir estes testes eficientemente, é recomendado enviar as colónias isoladas para um laboratório de referência para a tipificação definitiva (Godfroid et al. 2013).

O AMOS (abreviatura das espécies de *Brucella*: *B. abortus*, *B. mellitensis*, *B. ovis*, *B. suis*) PCR tem sido usado para tipificar *Brucella* spp. (Bricker et al. 2003)

Este teste permite a discriminação entre as espécies de *Brucella* spp., a vacina e as estirpes de tipo selvagem, mas não permite a diferenciação entre os biovars de uma determinada espécie de *Brucella* spp. Contudo, nem todos os biovars de *B. abortus* (biovar 3,5,6,7,9) e *B. suis* (biovar 2,3,4,5), são epidemiologicamente importantes. (López-Goñi et al. 2011).

2.3.2.2. Diagnóstico indireto

Os testes de diagnóstico indireto derivam de pesquisa de brucelose nos bovinos. Existe uma grande variedade de características dos diferentes testes que podem ser transportados para ovinos e caprinos, exceto o teste realizado no leite bovino, o Milk Ring Test (MRT) que, não é aceite nas restantes espécies porque gera demasiados falsos positivos (OIE 2008).

Os métodos de diagnóstico indireto, ou métodos imunológicos, detetam a resposta imune em relação aos antígenos de *Brucella* e não a presença da bactéria em si. São realizados com muita frequência devido à sua simplicidade de execução e interpretação. A detecção destes anticorpos específicos de *Brucella*, no leite ou amostras de soro, podem ser feitos inúmeros testes, entre os quais: Rose bengal Test (RBT), milk ring test (MRT), buffered *Brucella* agglutination tests (BBAT), buffered plate agglutination test (BPAT), complement fixation test (CFT), enzyme-linked immune-sorbent assay (ELISA) e fluorescence polarisation assay (FPA). A maior parte dos testes não possui a perfeita sensibilidade e especificidade combinada, por isso é normal a associação de mais testes para melhorar a credibilidade da detecção (Garin-Bastuji et al. 2006).

Testes indiretos são usados mundialmente para rastreio em manadas e rebanhos. São também utilizados para detecção individual de *Brucella spp.* em pequenos ruminantes, bovinos, camelídeos, que fazem parte dos protocolos e políticas de erradicação e vigilância da doença, assim como para o seu estudo. A Organização mundial de saúde animal (OIE) realça que não existe um único teste serológico apropriado para situações epidemiológicas, uma vez que todos têm limitações, especialmente quando é para testar animais ou humanos individualmente (OIE - World Organization for Animal Health 2018).

Tabela 5 - Sensibilidade e especificidade dos testes de diagnóstico indiretos em bovinos (Godfroid et al. 2010)

Teste		Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
Teste serológico	SAT(SAW)MAT	81,5	98.9
	CFT	90-91.8	99.7-99.9
	BBAT	87	97.8
	I-ELISA	97.2	97.1-99,8
	C-ELISA	95.2	99.7
	FPA	96.6	99.1
Teste ao leite	MRT	88.5	77.4
	FPA	76.9	100
	I-ELISA	98.6	99.0
Testes celulares	Teste de Brucelina	78,93	99.8

Devem ter-se em consideração todos os fatores que têm impacto na relevância do teste, entre os quais o método, resultados, a sua interpretação e aplicação para um diagnóstico específico. Em unidades epidemiológicas, onde a vacinação com a *Brucella*

atenuada, e dependendo do método de vacinação (dose e via de administração) usada, reações serológicas positivas podem ser esperadas de entre os animais vacinados devido às reações cruzadas com a estirpe infetante. Ademais, em testes de brucelose, um número de bactérias, em particular *Yersinia enterocolitica* O:9, pode induzir respostas de anticorpos que causam reações serológicas como falsos positivos (RSFP), impedindo um diagnóstico serológico preciso. Estas RSFP podem ocorrer em animais com variadas taxas de acordo com o tempo e a região. (OIE - World Organization for Animal Health 2018).

Noutras espécies, por exemplo em búfalos (*Bubalus bubalis*), bisonte Americano e Europeu (*Bison bison*, *Bison bonasus*), iaque (*Bos grunniens*), alce (*Cervus elaphus*), camelos (*Camelus bactrianus* e *C. dromedarius*), e em camélídeos da América do Sul a infeção com *Brucella* sp. segue um percurso semelhante ao dos bovinos. O mesmo procedimento serológico pode ser usado nestes animais, mas cada teste deve ser validado para a espécie correspondente (Godfroid 2002).

Tabela 6 - Lista de testes de diagnóstico prescritos pelo "OIE Terrestrial Animal Health" para o movimento de animais e produtos derivados de animais, e testes alternativos para o movimento de animais, que podem ser acordados pelas duas partes intervenientes. (OIE 2008; Saavedra, Fernandes, e Queiroga 2019).

Nome da doença	Testes prescritos	Testes alternativos
Brucelose bovina (<i>B. abortus</i> ou <i>B. mellitensis</i>)	BBAT, CFT, ELISA, FPA, SAT	BBAT+NH, MRT, IFN- γ

I. Milk Ring Test (MRT)

Este teste consiste na mistura do antígeno de *Brucella* com leite fresco. Na presença de anticorpos de *Brucella* formam-se complexos antígeno-anticorpo formando um anel roxo na superfície. Na ausência de complexos antígeno-anticorpo, a camada superficial do leite permanece inalterada. Este teste não é considerado um teste sensível, mas a falta de sensibilidade compensam o facto do teste poder ser repetido mensalmente, devido ao seu custo muito baixo. Este teste só é possível realizar em leite de bovinos (Saavedra, Ballem, et al. 2019).

II. Testes de antígenos de *Brucella* tamponados (BBAT)

Este teste de aglutinação simples utiliza o antígeno corado. Estes incluem o teste Rosa de Bengala (RBT) e o Buffered Plate Agglutination Test (BPAT). Os testes de aglutinação são usados para testes serológicos para efeitos de rastreio, uma vez que

fornece diagnósticos preliminares específicos de confiança e são economicamente razoáveis (Mohan, Saxena, e Malhotra 2016).

III. Teste rosa de bengala (RBT do inglês “Rose Bengal Test”)

O Teste Rosa de Bengala é um método de diagnóstico simples para a brucelose e é o mais usado para diagnóstico serológico. O RBT é feito com uma suspensão de *B. abortus* a pH de 3,6 -3,7.

O RBT consiste num simples teste de coagulação, em que as gotas de antígeno corado com rosa de bengala, e o soro são misturados numa placa, com pequenas superfícies convexas, que é levemente agitada, onde qualquer sinal de coagulação/aglutinação, significa uma reação positiva. (Alton 1988).

O RBT é um teste simples, rápido, barato e eficiente para rastreio, usado para diagnóstico individual de animais e manadas, assim como em humanos. Este teste foi considerado eficiente no diagnóstico de brucelose aguda em humanos e ainda é usado em casos crónicos. Normalmente, os resultados estão disponíveis em poucos minutos (Khan et al. 2017; Teng et al. 2017).

Contudo, apesar de rápidos e excelentes para o rastreio, este teste não é seguro para animais que já estão vacinados, pois pode originar falsos positivos devido à sua alta sensibilidade. É de acordo comum que o RBT tem pouca especificidade em animais e em humanos que já foram imunizados com a vacina S19. De facto, na maior parte dos países, o teste rosa de bengala é o mais utilizado como teste de rastreio, seguido do CFT para o diagnóstico da brucelose (Khan et al. 2017; Smirnova et al. 2013).

IV. Buffered Plate Agglutination Test (BPAT)

O BPAT é também um teste de aglutinação onde o antígeno de *B. abortus* corado é utilizado. São necessárias duas soluções cortantes, verde brilhante e violeta cristal, que são juntos em volumes iguais para preparar uma suspensão com a cor azul esverdeada. Este antígeno é misturado numa placa com o soro, e qualquer aglutinação significa uma reação positiva (OIE - World Organization for Animal Health 2018).

V. Serum Agglutination Test (SAT)

O SAT tem sido usado com sucesso, há muitos anos, em programas de vigilância e controlo da brucelose bovina. A reação é lenta, uma vez que requer incubação durante a noite a 37°C. SAT, demonstra pouca sensibilidade e especificidade em relação aos outros testes, apesar da sua realização ser muito económica. Este teste

é apropriado apenas para bovinos (Wright e Smith 1897; OIE - World Organization for Animal Health 2018).

VI. Complement Fixation Test (CFT) – teste de fixação do complemento (TFC)

O CFT deteta anticorpos anti-*Brucella* que são capazes de ativar o complemento. O Sistema de complemento consiste numa série de proteínas, as quais, quando desencadeadas por um complexo antígeno-anticorpo, reagem de forma sequencial de forma a provocar a lise da célula (Saavedra, Ballem, et al. 2019).

Este teste é mundialmente utilizado, mas a sua realização é complexa e requer boas condições laboratoriais e equipas devidamente formadas para titular e manter os reagentes com a precisão necessária.

Existem inúmeras variações deste teste em uso mas o mais conveniente é em formato de microtitulação. O CFT é normalmente muito específico mas menos sensível do que o RBT e o teste de ELISA e a ausência de atividade anti-complementar deve ser testada para cada soro. Além de que, como a maior parte dos testes serológicos, o CFT pode mostrar resultados positivos após a vacinação para *B. abortus*, com a vacina S19, e não é suficientemente específico, na presença de reações sorológicas falsos negativos (RSFN). Portanto, os resultados de CFT podem ser investigados usando estratégias confirmatórias ou complementares (OIE - World Organization for Animal Health 2018).

VII. Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (i-ELISA) ou Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (c-ELISA)

Testes serológicos como ELISA são capazes de rapidamente identificar IgM e IgG individualmente, permitindo uma melhor correlação com a situação clínica (Naik et al. 2017). O Teste de ELISA é recomendado para testes de rastreio de bovinos, assim como de humanos devido à sua especificidade e sensibilidade comparado com o teste RBT (Khan et al. 2017).

O i-ELISA foi desenvolvido originalmente para permitir a avaliação de anticorpos no soro do leite de bovinos. A sua maior qualidade é a sua elevada sensibilidade mas são também muito vulneráveis a reações não específicas. Contudo, a especificidade deste teste pode ser baixa (McGiven et al., 2003; Saegerman et al., 2004; Praud et al., 2012)

A c-ELISA oferece vantagens significativas através da avaliação indireta, uma vez que amostras de várias espécies podem ser testadas sem a necessidade de conjugados de enzimas específicos da espécie testada. Para além disso, c-ELISA

reduz, mas não elimina, as reações causadas por anticorpos produzidos em resposta à vacinação. (OIE - World Organizations for Anima health 2018).

VIII. Fluorescence Polarization Assay (FPA)

É uma técnica simples de medição da interação antígeno/anticorpo e pode ser feita em ambiente laboratorial ou no campo. Este método é baseado num princípio físico: quão rápido a molécula gira num meio líquido correlacionando este dado com a sua massa. Moléculas de menor dimensão giram mais rápido e despolarizam uma luz polarizada, enquanto moléculas maiores giram mais lentamente e consequentemente despolarizam menos, mostrando uma luz mais forte.

O FPA mede o grau de despolarização em mili-polarizações (mP). Durante o teste, as amostras de soro são incubadas com um antígeno específico de *B. abortus*, marcado com uma substância que contém fluoresceína. Na presença de anticorpos contra a *Brucella spp.*, são formados complexos fluorescentes (Banai, Itin, e Bardenstein 2018; Godfroid et al. 2010).

Neste teste, existe capacidade de reduzir mas nunca de eliminar completamente as reações devido à produção residual de anticorpo produzido em resposta à vacinação (Nielsen *et al.*, 1996; Gall *et al.*, 2002).

IX. Lateral Flow Assay (LFA)

Este teste é uma versão simplificada de ELISA, que consiste numa tira de deteção de nitrocelulose que contém lipopolissacáridos (LPS) de *Brucella*, assim como, provas de deteção específicas de *Brucella spp.*, flanqueadas por um lado por uma camada de reagente, que consiste numa solução de conjugado imune dourada, e por outro lado uma camada de absorvente. O fluxo do teste é realizado pela adição de 5 µl de soro diretamente na camada de reagente, adiciona-se mais líquido de teste e, o resultado pode ser lido 10 a 15 minutos depois por inspeção visual da coloração do mesmo. O LFA, é baseado na ligação de anticorpos específicos presentes na espécie clínica do LPS e, na coloração do anticorpo de ligação para conferir ao anticorpo conjugado uma coloração dourada (Smits et al. 2003).

X. Interferon-Gamma (IFN-γ)

O teste do interferão gama envolve estimulação dos linfócitos em todo o sangue com antígenos adequados, tais como a Brucelina. Este é um teste relativamente sofisticado que é feito através da mistura de sangue heparinizado com brucelina,

seguido de incubação, o resultado da produção de IFN- γ é detetada através de ELISA (Ducrotoy et al. 2016; OIE - World Organizations for Anima health 2018).

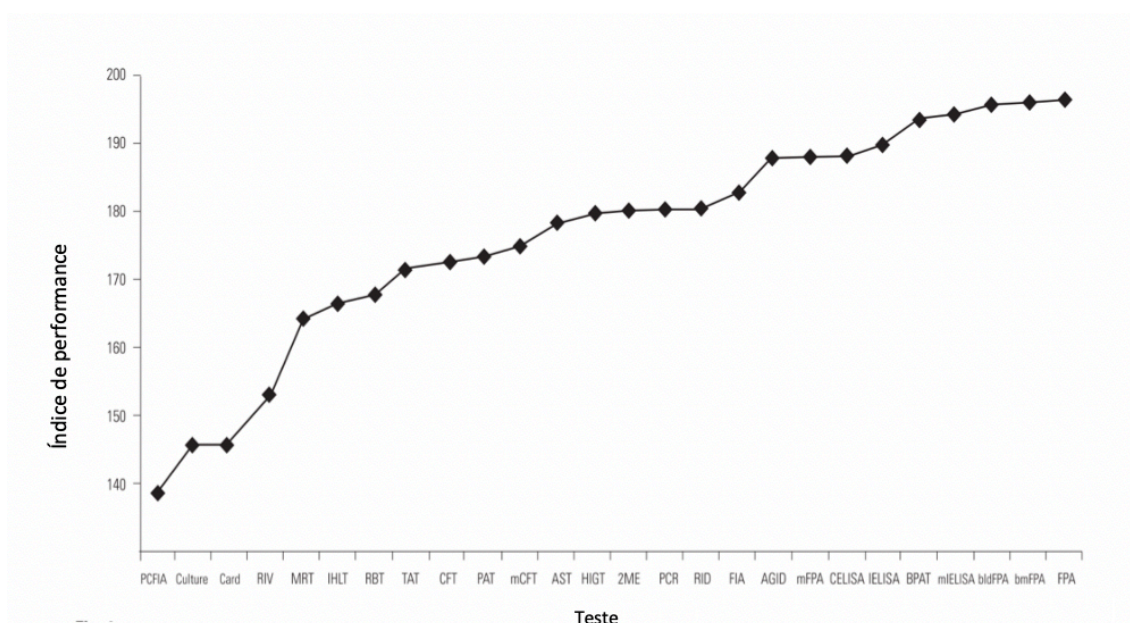
XI. Brucelin Skin Test (BST) – teste de brucelina

O teste de Brucelina caracteriza-se por ser um teste imunológico alternativo, que pode ser usado para testar e rastrear manadas não vacinadas, garantindo que é usada uma preparação de antígeno standard purificada (livre de S-LPS) é utilizada. Este antígeno é uma mistura de mais de 20 proteínas provenientes de *Brucella spp.* (Ducrotoy et al. 2016).

O BST possui uma elevada especificidade, tanto que bovinos não vacinados e seronegativos são reatores positivos ao teste de brucelina devem ser considerados animais infetados (Pouillot et al. 1997).

Este teste tem uma alta sensibilidade para o diagnóstico de *B. mellitensis* em pequenos ruminantes, na ausência de vacinação, é considerado um dos testes mais específicos. (OIE - World Organizations for Anima health 2018).

Animais imunizados com a vacina S19 ou RB51 podem dar resultados positivos durante vários anos. Contudo, o BST é provavelmente o teste indireto mais específico para diagnóstico de Brucelose (em animais não vacinados). O diagnóstico final não deve ser feito unicamente com base em respostas intradérmicas dadas por alguns animais na manada e deve ser suportado com um teste de diagnóstico complementar (De Massis et al. 2005; OIE - World Organizations for Anima health 2018).



2.4. Vacina

Ao longo dos tempos, muitas vacinas foram criadas com o objetivo da imunização dos animais para erradicação da doença, e assim, para salvaguardar este problema de saúde humana, apenas algumas vacinas de *Brucella spp.* foram aprovadas para uso generalizado no campo, todas elas baseadas estirpes vivas atenuadas. (OIE - World Organizations for Anima health 2018)

Vacinas vivas, são superiores às vacinas mortas ou acelulares, uma vez que sobrevivem no hospedeiro por um período de tempo suficiente para induzir uma resposta imunitária pela contínua demanda do sistema imunitário do hospedeiro. Foi estimado que uma boa vacina deve sobreviver $7,9 \pm 1,2$ semanas antes de se eliminar do organismo através da resposta do sistema imunitário.

Por outro lado, estirpes de vacinas virulentas, sobrevivem mais tempo no hospedeiro, descartando o seu uso como vacinas adequadas. A capacidade da estirpe vacinal é estabelecida pela indução de uma resposta imunitária celular por parte do hospedeiro, em comparação com um animal de controlo não vacinado. (Oliveira & Splitter, 1995; Grilló *et al.*, 2012;).

Em contrapartida, a resposta humoral tem um papel, maioritariamente como função secundária, no transporte da imunidade protetora durante a disseminação precoce do patógeno no sangue (Vitry *et al.* 2014).

Infelizmente, os anticorpos eleitos pela vacina prejudicam a vigilância dos métodos de monitorização, devido à falta de métodos efetivos que podem distinguir entre a vacina e a estirpe sorológica de campo. Laboratórios de referência, podem desempenhar um papel determinante na qualidade das vacinas, estabelecendo um stock standard e, confirmando a qualidade dos lotes vacinais precedendo ao seu uso, neste caso, a vacinação (Banai 2002).

Para humanos, estas vacinas, S19, RB51 e Rev.1, têm alguma virulência pelo que, deve ser incluído na legenda um aviso de perigo. Caso haja exposição acidental ou inoculação deve ser consultado um médico.

Contudo, devido a algumas limitações em relação a estas vacinas, têm sido feitos grandes esforços para o desenvolvimento de novas vacinas, mais seguras e mais eficazes, que também possam ser usadas noutros animais suscetíveis à mesma doença (Dorneles, Sriranganathan, e Lage 2015).

As características para uma boa vacina para combater a brucelose devem incluir os seguintes fatores (G. Schurig *et al.*, 1995; Ko & Splitter, 2003b):

- a) Ser uma vacina viva, capaz de providenciar uma resposta forte das células Th1 do sistema imunitário;
- b) Ser capaz de não desencadear anticorpos que interfiram com os testes sorológicos para diagnóstico da doença, não obstante do teste utilizado, dose e via de administração, idade ou sexo dos animais;
- c) Estar atenuada ou não causar doença ou infecção persistente em animais imunizados ou ser patogénica para humanos.
- d) Ser capaz de induzir uma proteção contra infecção sistémica ou uterina, de longa duração, para além de prevenir o aborto mesmo em animais gestantes inoculados com uma única dose;
- e) Não provocar seroconversão, ou seja, não alterar o estado sorológico do doente na revacinação.
- f) Ser estável e não reverter a virulência *in vivo* ou *in vitro*;
- g) Ser económica, fácil de produzir e administrar.

(Ko e Splitter 2003b; Schurig et al. 1995)

2.4.1. Vacina S19

A vacina S19 é uma vacina viva atenuada e a primeira vacina para *B. abortus* a ser usada extensivamente para o controlo da brucelose bovina (Dorneles, Oliveria, e Lage 2017).

As suas características gerais são a sua estabilidade e baixa patogenicidade, imunogenicidade relativamente alta e antigenicidade moderada (Dorneles et al. 2015).

A vacina S19 é uma vacina viva atenuada do biovar 1 de *B. abortus* que induz uma resposta de anticorpos, a qual não é distinguida da resposta dos anticorpos induzidos pela infecção com as estirpes de campo. (Graves, 1943; Manthei, 1959; F. M. Jones & Hooper, 1976; Koh & Morley, 1981; Klaus Nielsen, 1990).

A vacinação normalmente é feita em bezerras entre os três e os oito meses de idade. Contudo, os grupos etários aos quais, a vacina é administrada, não parece induzir imunidades díspares. A restrição etária da vacinação, devido à interferência no diagnóstico da brucelose tem sido considerada uma das desvantagens desta vacina, sendo ao longo do tempo substituída pela vacina RB51, que não apresenta esse problema. (Meyer & Nelson, 1969; Cordes & Carter, 1979; E. M. S. Dorneles *et al.*, 2015;).

Em animais jovens, pode ser administrada a dose normal, ou uma dose reduzida para minimizar os títulos residuais de anticorpos assim como para prevenir infecção persistente provocada pela vacina (P Nicoletti, 1990; Breitmeyer *et al.*, 1992; Steven C. Olsen & Stoffregen, 2005).

A vacina S19, foi testada como uma estratégia de vacinação, para utilização em populações infetadas, com o objetivo de reduzir o aborto e consequentemente a transmissão da brucelose, contudo, foi descontinuada na Europa devido à vacinação de fêmeas gestantes, onde, por vezes, causaria aborto, mas principalmente, devido à persistência de anticorpos vacinais (Corner e Alton 1981; Nicoletti 1990).

De um modo geral, depois da vacinação dos vitelos, S19 não persiste no trato reprodutivo de fêmeas adultas e não causa aborto nesses animais. Não obstante, mesmo com uma frequência marcadamente baixa, alguns bovinos permanecem infetados cronicamente, podendo abortar e excretar a estirpe vacinal pelo leite. (Meyer & Nelson, 1969; Corner & Alton, 1981).

Após a vacinação do efetivo bovino, com uma, duas ou três doses, antecedentes à idade reprodutiva, McDiarmid recuperou a estirpe vacinal de S19 de 10% das amostras testadas e 1,5% casos de aborto. Em machos a vacinação com S19 em idade jovem, resulta em títulos de anticorpos persistentes, infecção testicular e, consequentemente, infertilidade (McDiarmid 1958).

Além disso, a vacinação de animais infetados, com a vacina S19 não cura ou não altera o curso normal da doença. Por outro lado, a duração da imunidade induzida por S19 em bovinos vacinados em idade jovem, foi provado que fosse deveras longo, abrangendo praticamente toda a vida produtiva do animal (McDiarmid 1958).

A imunidade nos bovinos vacinados, entre os seis e os oito meses, não diminui da primeira à quinta gestação. Contudo, as experiências de revacinação com S19 e com vacinas com *B. abortus* morto, não demonstraram qualquer benefício comparadas com a imunização com S19, apenas em idade jovem, embora, aparentemente, segundo a observação de McDiarmid, existe algum benefício na revacinação com S19 (McDiarmid, 1958; Manthei, 1968; F. M. Jones & Hooper, 1976;).

Em condições de campo, 82 a 95% dos bovinos vacinados mostram proteção completa contra as estirpes virulentas, contudo, foi também demonstrado que a eficácia da vacina decresce proporcionalmente com o aumento da exposição bacteriana. (Manthei, 1968; F. M. Jones & Hooper, 1976; Yu *et al.*, 2007).

Sendo a vacina S19 patogénica para o ser humano, a sua utilização requer formação para os indivíduos que a manipulam e implica todo o tipo de material de proteção individual tais como luvas, casacos de manga comprida, óculos de proteção e máscaras N95 (Dorneles et al. 2015).

2.4.2. Vacina RB51

A estirpe RB51, de *B. abortus* é uma estirpe resistente à rifampicina, que demonstra falta de expressão na cadeia “o-side” (OPS). A estirpe da vacina RB51 foi desenvolvida em 1982 pelo grupo do professor Gerhardt Schurig's, e é derivada do biovar 1 da estirpe 2308 de *B. abortus*.

As características gerais desta vacina são a sua estabilidade e não reverter o fenótipo virulento para os animais imunizados. A proteção contra o aborto, induzida pela vacinação com RB51 em bovinos, já foi altamente demonstrada em condições experimentais e, foi também demonstrada a sua eficácia em situações de campo, em manadas com prevalência alta e baixa (G. G. Schurig *et al.*, 1991; N F Cheville *et al.*, 1993; M. G. Stevens *et al.*, 1994; Lord *et al.*, 1998; S. C. Olsen, 2000; Steven C. Olsen & Stoffregen, 2005; Miranda *et al.*, 2013).

A literatura mostra que os bezerros vacinados com RB51 aos três, cinco e sete meses de idade ficam protegidos contra a infeção com *B. abortus* e aborto. Isto também acontece com as novilhas que são vacinadas aos dez e vinte e quatro meses. Ainda assim, tem sido sugerido que em condições experimentais, a vacinação com a vacina S19 seja ligeiramente, apesar de não significativo, mais eficaz que a vacina RB51 (Cheville et al. 1993, 1996; Olsen e Stoffregen 2005; Poester et al. 2006).

Depois da vacinação com RB51, é normal que a reação do linfonodo cervical, a qual desaparece seis a dez semanas depois. A vacina RB51 é considerada mais atenuada que a S19, baseada em resultados de eliminação e examinação histológica dos tecidos infetados dos animais vacinados (Cheville et al. 1996; Olsen e Stoffregen 2005).

Embora a vacina RB51 ter baixas características abortivas, não é completamente segura para administrar na vaca gestante, principalmente quando administradas doses altas (G. G. Schurig *et al.*, 1991; Norman F. Cheville *et al.*, 1996).

Contudo, alguns resultados indicam que vacas, bezerros e machos não vacinados ou anteriormente vacinados com S19, podem ser vacinados com RB51 com a dose integral, mesmo durante a gestação (Edmonds *et al.*, 1999; L. E. Samartino *et al.*, 2000; Fernando P. Poester *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2009).

Esta vacina, assim como a S19, pode provocar infeção em humanos principalmente nos indivíduos imunodeprimidos. A vacina RB51 é resistente à rifampicina, um dos antibióticos de escolha para o tratamento da brucelose humana, e o facto da presença da vacina não ser detetada em testes serológicos, são os pontos a ter atenção durante o diagnóstico e tratamento de humanos. Portanto, as medidas de

segurança usadas com a vacina S19 devem ser replicadas para esta vacina S. C. Olsen *et al.*, 1999; Ashford *et al.*, 2004).

Como a vacina RB51 não induz a produção de anti-anticorpos em animais imunizados, contorna assim os problemas observados após a vacinação com S19. Consequentemente, os bovinos vacinados podem facilmente ser diferenciados dos animais naturalmente infetados. (G. G. Schurig *et al.*, 1991; S C Olsen, 2000; L. E. Samartino *et al.*, 2000) .

A vacinação com RB51 não induz a produção de anticorpos detetáveis nos testes sorológicos, mesmo no caso dos bezerros vacinados várias vezes com a dose integral de vacina (S. C. Olsen *et al.*, 1999; S. C. Olsen, 2000; L. E. Samartino *et al.*, 2000).

Os anticorpos específicos para RB51, podem ser detetados através do teste de ELISA, até aproximadamente doze semanas pós vacinação, com diferentes títulos. Os animais vacinados com S19 apresentam maior título de anticorpos anti-RB51 do que os vacinados com RB51, isto deve-se provavelmente à persistência de S19, o que pode resultar, na reação cruzada, dos anticorpos entre níveis de anticorpos contra os antígenos de RB51 (Mark G. Stevens *et al.*, 1995; S. C. Olsen *et al.*, 1997; Nielsen *et al.*, 2004) .

A revacinação com RB51 tem sido recomendada seis meses a um ano após a primeira vacinação (Luna-Martínez e Mejía-Terán 2002).

Apesar da revacinação com RB51 ser considerada uma ferramenta para aumentar a imunidade de uma manada, nem todos os animais estão completamente protegidos após a primeira imunização (Dorneles et al. 2015).

2.4.3. Vacina S45/20

Esta vacina está preparada com a estipe 45/20 do biovar 1 de *B. abortus* combinada com um óleo adjuvante. A 45/20 é uma *B. abortus* rugosa, derivada de uma S45/0 lisa, após 20 inoculações por porquinhos da Índia.

Esta *bacterina* foi muito usada na UE para controlo da *B. abortus*, para substituição da S19, com o objetivo de eliminar os problemas relacionados com a indução de anticorpos que fossem reconhecidos nos testes de diagnóstico de rotina. Contudo, os dados existentes em relação à eficácia e à resposta imunológica são contraditórios, e muitas vezes mostram vantagens em relação à utilização da vacinação com S19 (P Nicoletti, 1990; E. M. S. Dorneles *et al.*, 2015).

O seu uso obteve alguns recuos tais como o uso do óleo adjuvante que implicava a repetição da vacinação e reversão da cadeia lisa quando usada como vacina viva, e anticorpos detetados nos testes de rotina, para deteção e diagnóstico de *B.*

abortus. Esta vacina também apresentou várias vezes reação no local de inoculação que levou ao seu desuso em alguns animais (P Nicoletti, 1990; E. M. S. Dorneles *et al.*, 2015) .

2.4.4. Vacina SR82

Esta estirpe SR82 é o biovar 6 de *B. abortus* e é uma vacina viva atenuada usada desde 1974 na URSS (União de Repúblicas Sociais Soviéticas) para o controlo da brucelose bovina. Esta vacina aglutina com os anti-soros lisos e rugosos, mas não induz resposta positiva nos testes de aglutinação (Salmakov *et al.*, 2010; Ivanov *et al.*, 2011) .

O nível de proteção fornecido pela SR82 é muito semelhante ao nível de proteção dado por S19, após desafiado com *B. abortus* virulento tem mostrado ser eficaz em condições de campo. Hoje em dia, esta vacina ainda é muito usada na Federação Russa, Azerbaijão e outros países dessa região (Ivanov *et al.* 2011).

Tabela 7 - Vantagens e desvantagens das vacinas contra a Brucelose Bovina.

	Vantagens	Desvantagens
S19	- Viva e atenuada - Essencial para a erradicação da brucelose nas ultimas décadas. - Estabilidade - Baixa patogenicidade - Alta imunogenicidade - Antigenicidade moderada - Jovens animais bem imunizados permanecem sem sintomas praticamente toda a vida produtiva.	- Anticorpos da vacina são os mesmos de <i>Brucella</i> spp., logo interfere com os testes de diagnóstico de rotina. - Animais podem permanecer infectados cronicamente. - Pode induzir aborto - Excreção de estirpe vacinal no leite - Pode causar infertilidade nos touros - Pode provocar infeção em humanos (principalmente imunodeprimidos)
RB51	- Estabilidade da vacina in vitro e in vivo - Fenótipo não virulento - Proteção contra aborto. - Não induz a produção de anticorpos detetáveis nos testes sorológicos.	- reação do linfonodo cervical - Não é 100% segura em vacas gestantes - Pode provocar infeção em humanos (principalmente imunodeprimidos) - resistente à rifampicina (tratamento da brucelose humana) - Falha na imunização apenas com uma administração.
S45/20	-Não induz a produção de anticorpos reconhecidos nos testes de diagnóstico de rotina	- Uso de óleo adjuvante - Reação vacinal
SR82	-Vacina atenuada -Não induz aglutinação nos testes de diagnóstico de rotina	-Proibição da sua utilização em alguns países.

2.5. Prognóstico

Devido à localização intracelular da *Brucella* spp. e à sua capacidade de se adaptar às condições ambientais encontradas no seu nicho replicativo, por exemplo,

nos macrófagos, a falha no tratamento e as taxas de recidiva são altas e dependem do conjunto de medicamentos utilizados e do desempenho do paciente.

O tratamento ótimo para a brucelose humana é uma combinação de dois antibióticos, (Pappas e Papadimitriou 2007; Seleem et al. 2009). A combinação de doxiciclina com estreptomicina é atualmente a melhor opção terapêutica com menos efeitos secundários e menos recidivas especialmente em casos subagudos e formas localizadas de Brucelose. Contudo esta combinação, é menos prática, pois tem de ser administrada por via parenteral durante três semanas.

O “Expert Committee On Brucellosis” mudou as suas recomendações para brucelose aguda em humanos adultos para Rifampicina (600-900 mg/dia P OS) e doxiciclina (200 mg/dia P OS) durante seis semanas. (Alp *et al.*, 2006; Ariza *et al.*, 1992; Solera *et al.*, 1995; Falagas & Bliziotis, 2006; Le Flèche *et al.*, 2006; Seleem *et al.*, 2009;).

É paradoxal que a brucelose possa ser considerada como uma zoonose re-emergente, afetando muitos animais e pessoas em todo o mundo. O paradoxo apoia-se no facto do custo real das medidas de controlo, porém, existe ainda falta de fundos ou “*know how*” político, para implementar estas medidas em vários países.

Controlar a brucelose animal em países em desenvolvimento requer um esforço considerável para construir uma infraestrutura que eduque as pessoas acerca dos riscos da brucelose, forneça laboratórios com condições adequadas, e pessoal formado para recolher e testar amostras, manter registos e programas de vigilância ativa. Visto isto é importante realçar que quando a incidência da brucelose está controlada nos reservatórios animais, existe um decréscimo na incidência da doença em humanos (Seleem et al. 2009).

A partir dos esforços bem sucedidos por parte dos países desenvolvidos que são capazes de controlar a brucelose bovina, pode concluir-se que a erradicação da brucelose pode ser conseguida apenas quando todos os esforços estão concentrados em encontrar uma solução. A não ser que haja um excelente apoio político para a indemnização correta do produtor, pela perda de animais infetados, é quase impossível controlar esta importante zoonose. Os produtores de leite e produtos lácteos, os produtores de explorações de carne, os consumidores e os políticos devem trabalhar em conjunto para encontrar uma solução de erradicação prática que seja adequada para o país em causa (Seleem et al. 2009).

2.6. Impacto da doença

O impacto económico da brucelose varia consoante a geografia e o sistema de produção e também da espécie pecuária e dos sistemas de manejo, da capacidade de resposta dos sistemas médico-veterinários.

Nos locais onde a brucelose ainda persiste, as populações selvagens, tornam-se em reservatórios (exemplo do bisonte na América do Norte). Países emergentes e economicamente estáveis tendem a reportar o maior número de casos nas espécies pecuárias.

Em países economicamente mais desfavorecidos, a brucelose é endémica e altamente negligenciada, com altas incidências em animais e humanos e praticamente sem controlo eficaz (Mangen *et al.*, 2002; J. J. McDermott & Arimi, 2002; J. McDermott *et al.*, 2013).

A brucelose tem sido um assunto de grande importância em matérias de saúde pública, uma vez que causa grande impacto às indústrias da agropecuária, e muitos esforços têm sido feitos e devidamente reconhecidos, com o objetivo de controlar e erradicar esta doença dos bovinos. O desenvolvimento de uma vacina eficaz para a brucelose tem sido um desafio para os cientistas desde há muitos anos (Dorneles *et al.* 2015).

A epidemiologia da brucelose humana tem mudado drasticamente ao longo dos últimos anos devido a várias razões sanitárias, políticas e socioeconómicas juntas com o nível de globalização em que vivemos.

A doença ocorre mundialmente, exceto naqueles países onde a Brucelose foi erradicada. Contudo, em muitos países a brucelose é uma doença de declaração obrigatória às autoridades de saúde, embora os números oficiais constituam uma pequena porção da verdadeira incidência da doença. (Pappas *et al.*, 2006b)

A incidência da brucelose humana estima-se que esteja ronde os 0,03 pessoas infetadas por 100.000 habitantes. Embora a estimativa dos custos associados às infeções com brucelose permaneça limitada para alguns países, estatísticas revelam que as perdas económicas devido à brucelose são muito extensas, para além da produção animal (produção de leite, aborto e falhas reprodutivas) mas também na saúde pública (custo do tratamento e diminuição do efeito). Por exemplo, na América Latina, estima-se que as perdas económicas anuais rondem os 600 milhões de dólares. Todavia, os programas de erradicação da doença são dispendiosos mas os dados apontam para que, ainda assim, sejam sete vezes menores.

Nos EUA, o programa de erradicação da brucelose entre os anos de 1934 e 1997 custou mais de 3.5 biliões de dólares, sendo que os custos da diminuição da

produção de leite, e do aborto só em 1952 custaram 400 milhões. (G. Schurig *et al.*, 1995; Acha & Szyfres, 2005; Seleem *et al.*, 2009)

As perdas animais devido a esta doença podem ser de grande importância, primariamente devido ao decréscimo de 20% da produção de leite nas vacas que sofrem aborto. A sequela mais comum, a infertilidade, aumenta o intervalo entre lactações e consequentemente, o intervalo entre partos é prolongado em vários meses. Além disso, estes acontecimentos resultam na perda de bezerros e alteração do programa reprodutivo da exploração. Estes dados têm grande importância principalmente em vacadas de produção de carne, onde os bezerros representam a única fonte de rendimento das mesmas. A alta incidência de infertilidade permanente resulta numa seleção errada das vacas reprodutoras com grande valor, que devido ao aborto associado à brucelose revelam falha reprodutiva, e acontecem algumas mortes devido às graves metrites, seguidas de retenção placentária.

As perdas económicas devido à brucelose bovina incluem perda de bezerros devido ao aborto, redução da quantidade de leite, condenação de vacas com valor para a exploração devido à sua falha na fertilidade, põe em causa todas as movimentações de gado da área afetada, custo das intervenções médicas e custo dos programas de erradicação (Dubie *et al.* 2014).

2.7. Estratégias de erradicação da doença em Portugal

O programa de erradicação da Brucelose em Portugal consiste num processo que envolve várias entidades, que vão da Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) até ao produtor, passando pelas associações regionais, médicos veterinários e produtores.

O programa de erradicação de Brucelose Português está presente nos seguintes documentos oficiais, que seguem em anexo:

- Portaria nº205/2000 de 5 de Abril - A avaliação do sistema em vigor relativo à recolha, transporte e abate sanitário evidenciou a necessidade de se proceder à sua reformulação, tendo em vista adaptá-lo à realidade da situação sanitária atual, com resultados mais eficazes e que melhor correspondam ao esforço técnico e financeiro que o Estado tem vindo a desenvolver.

- Despacho conjunto nº530/2000 de 16 de Maio – relativo às indemnizações a atribuir aos proprietários de animais sujeitos a abate sanitário.

- Decreto-lei nº244/2000 de 27 de Setembro - O presente diploma estabelece as normas técnicas de execução do Programa de Erradicação da Brucelose, adiante designado por PEB, bem como os procedimentos relativos à classificação sanitária de efetivos e áreas e à consequente epidemiovigilância da doença.

- Decreto-lei nº142/2006 de 27 de Julho – onde É criado o Sistema Nacional de Informação e Registo Animal (SNIRA), que estabelece as regras para a identificação, registo e circulação dos animais das espécies bovina, ovina, caprina e suína, bem como dos equídeos e estabelece ainda o regime jurídico dos centros de agrupamento, comerciantes e transportadores e as normas de funcionamento do Sistema De Recolha De Cadáveres De Animais mortos na exploração (SIRCA).

- Portaria nº178/2007 de 9 de Fevereiro - A presente portaria regulamenta o exercício das competências ou atribuições das diferentes entidades que participam na execução das intervenções sanitárias do Programa Nacional de Saúde Animal (PNSA) bem como a modalidade de apoios do Estado às ações executadas pelas organizações de produtores pecuários (OPP) e ainda o pagamento pelos criadores das ações executadas pelos serviços oficiais.

- Decisão da Comissão 2002/598/CE de 15 de Julho – que submete o programa de erradicação e controlo de Brucelose nas ilhas dos Açores.

- Manual de Apoio às estratégias de Controlo da Brucelose Bovina no âmbito do plano de erradicação da Brucelose Bovina da Direção Geral de Veterinária (agora DGAV) em Novembro de 2008.

2.8. Classificação sanitária dos efetivos bovinos quanto à Brucelose

As Direções de Serviço Veterinário Regionais (DSVR) são responsáveis pelas classificações sanitárias de todos os efetivos no Programa Informático de Saúde Animal (PISA). Este procedimento é feito após cada atividade sanitária no efetivo, de testes de pré-movimentação a serviços de sanidade anuais. Os efetivos podem ser classificados como oficialmente indemnes (B4), indemnes (B3) ou não indemnes (B2) como demonstrará a seguinte tabela.

Tabela 8 - Classificação Sanitária dos efetivos. Os estatutos B2.1, B3S e B4S são atribuídos pelo PISA para informação mais precisa do estado sanitário do efetivo. (Adaptado de Fonseca, Fonseca, and Pinheiro 2008)

Estatuto sanitário dos efetivos	
B2	Não indemne
B2.1	Esta classificação é considerada não indemne e é usada para o calculo da incidência a nível dos relatórios técnicos, devendo ser utilizada sempre que se confirme oficialmente a presença de animais infetados que nos exames laboratoriais post-mortem ou outros, tenham sido isoladas e identificadas bactérias do género <i>Brucella</i> , na exploração em causa.
B3	Indemne
B3S	É utilizada sempre que se suspenda a classificação sanitária a um efetivo indemne.

B4	Oficialmente indemne
B4S	É utilizada sempre que se suspenda a classificação sanitária a um efetivo oficialmente indemne.

2.9. Aparecimento de Brucelose numa exploração – Procedimento

Após o surgimento de animais sorologicamente positivos à Brucelose, existem vários passos para pôr em ação os planos de erradicação da doença. Esses passos encontram-se descritos em Diário da Republica, no Decreto de Lei nº. 244/2000 e descritos simplifadamente para fácil consulta das partes envolvidas, no Manual de apoio às estratégias de controlo da brucelose Bovina.

Estes passos, contemplam, de forma geral, realização de um inquérito epidemiológico, onde a Direção de Serviços Veterinários Regionais (DSVR) é responsável por uma avaliação epidemiológica de todos os resultados positivos, no decurso de provas serológicas em todos os efetivos onde ainda não está descrita nenhuma medida de controlo desde o último resultado positivo ou, ainda não está isolada a bactéria *B. abortus*.

Esta avaliação faz-se através do inquérito epidemiológico (modelo em anexo), que implica a deslocação à exploração, uma entrevista ao proprietário, com questões previamente estudadas, que tem como objetivo a determinação da origem da infeção, a sua eventual disseminação em explorações de contacto ou epidemiologicamente relacionadas, fatores de risco capazes de interferir na evolução da doença. Isto permite estudar a probabilidade de presença do agente no efetivo e consequentemente a sua infeção por *Brucella*. Assim diferencia-se um “efetivo com sorologia positiva sem indícios de infeção” e “efetivo com sorologia com suspeita de infeção” consoante as informações recolhidas.

Posteriormente, a decisão e seleção das medidas de controlo a aplicar nos efetivos, são responsabilidade das DSVRs, mediante de uma proposta escrita devidamente fundamentada e validada pelo Diretor de Serviços Veterinários da Região.

Em termos de estratégia de erradicação da brucelose, perante um caso positivo, existem três opções, segundo a legislação em vigor, o abate total do efetivo, a vacinação do efetivo de risco ou a vacinação de todos os efetivos pertencentes à mesma área de risco. Estas opções são devidamente avaliadas, depois de analisado o inquérito epidemiológico (que segue em anexo neste documento) e as entidades responsáveis pela sanidade animal, e consequentemente, pela saúde publica, como a DGAV.

As medidas de controlo a implementar serão nomeadamente, re-testagem dos animais positivos, abate total do efetivo e a aplicação da vacina RB51 em efetivos, ou

áreas epidemiológicas, através de um Plano Individual de Saneamento (PIS), que tem em conta as necessidades de cada exploração em específico face à infeção com *B. abortus* e estabelece parâmetros de seleção e base legal das medidas em referência.

As mudanças de estatuto sanitário da exploração decorrem paralelamente a este processo.

O abate de animais positivos, enquadra-se numa das medidas para controlo desta doença, sendo executado no decurso da aplicação das medidas de controlo referentes à vacinação com RB51. Todos os bovinos seropositivos (FCP), através do teste de fixação do complemento (TFC), são alvo de colheita de material biológico para exame bacteriológico, com tipificação do agente, exceto, os animais provenientes de uma exploração com *B. abortus* já conhecida, e que esteja em isolamento (com estatuto sanitário B2.1).

Todos os efetivos relacionados com o efetivo infetado, devem ser reconhecidos, e assim, manifestar uma maior valia para os seus produtores que podem avançar com um programa de controlo de um efetivo ainda não infetado e reconhecer menor probabilidade de perdas no seu efetivo através de um aumento na vigilância referente a esta doença.

O PIS é um documento, que se assemelha a um contrato, com duração mínima de cinco anos, entre todas as entidades responsáveis, isto é, DSVR, Médico Veterinário coordenador da Organização de Produtores Pecuários (MVOPP) e o Produtor, o Médico Veterinário Executor (MVE). Neste documento são estabelecidas as medidas a desenvolver no sentido de controlar a infeção brucélica, nos bovinos da Unidade epidemiológica, em questão, prevenir a infeção de outros efetivos, assim como evitar a sua reintrodução após a erradicação.

Está presente neste documento, toda a descrição da exploração ou unidade epidemiológica (UE), a descrição do surto de brucelose, a situação epidemiológica e região onde se encontra no momento de elaboração do PIS. Para além disso, engloba também, a justificação para aplicação da vacina nesta unidade epidemiológica, assim como as condições de aplicação da vacina. Estão ainda especificadas as responsabilidades de cada parte envolvente individualmente, entenda-se, a DSVR, os Médicos Veterinários Coordenadores e Executores da OPP e do Produtor.

Após a elaboração do PIS com todos os intervenientes implicados, inicia-se a sua aplicação no efetivo afetado, começando com atividades como o isolamento dos animais positivos até obtenção de resultados serológicos, eliminação dos animais positivos e vacinação de acordo com o PIS.

Após a saída de qualquer animal positivo, as instalações onde o(s) mesmo(s) permaneceram, têm obrigatoriamente, de ser limpas e desinfetadas, o mesmo deve ser

provado pelo veterinário da exploração através do preenchimento de um impresso que estará em anexo neste documento, o qual 'Controlo da limpeza e desinfeção de explorações após abate sanitário' e, posteriormente, entregue à DSVR.

Com tudo isto, este estudo tem os seguintes objetivos:

- Descrever as intervenções médico-veterinários num surto de brucelose numa exploração de bovinos de carne no Alto Alentejo, desde a sua deteção, até ao seu controlo;
- Estudar a prevalência da doença no efetivo;
- Estudar a relação entre a idade dos animais e o número de amostras realizadas;
- Estudar a relação entre a idade dos animais e o diagnóstico de Brucelose por testagem positiva;
- Estudar a relação entre o sexo dos animais e o diagnóstico de Brucelose por testagem positiva;
- Estudar a relação entre a época do ano e o aparecimento de casos positivos.

3. Materiais e Métodos

Este estudo foi levado a cabo no período de março de 2018 a fevereiro de 2020, no Alto Alentejo, numa vacada de bovinos de carne do Alto Alentejo.

3.1. Enquadramento da exploração

O presente surto de infeção com *B. abortus*, teve origem num efetivo bovino de raça cruzada, situado no Alto Alentejo, numa exploração pecuária, de regime extensivo numa única propriedade, com uma área aproximada de 386,5 hectares, localizada numa zona rodeada de explorações com o mesmo propósito, e várias atividades agrícolas de sementeira. Esta exploração está integrada numa associação de caça devido à abundância de espécies cinegéticas presentes nesta zona.

Quanto aos dados reprodutivos desta exploração, o produtor não tem quaisquer registos, uma vez que nunca se deparou com problemas graves deste foro. O manejo reprodutivo nesta exploração faz-se através de dois grupos distintos, nomeadamente as novilhas e as vacas. Muitas das novilhas só são apresentadas ao macho por volta dos 3 anos, parindo com cerca de 4 anos. Os machos estão com as vacas todo o ano, não havendo qualquer intervenção no manejo reprodutivo desta manada.

O objetivo desta exploração é a venda de animais jovens, tanto machos como fêmeas, para sistemas de engorda ou diretamente para abate, que têm como destino final a venda de carne para consumo animal e humano, dos quais dependem os rendimentos da exploração. Algumas novilhas permanecem na exploração para substituição de fêmeas mais velhas.

Esta propriedade tem como recursos hídricos para abeberamento dos animais, a presença de várias barragens, e também um pequeno curso de água que tem origem em propriedades vizinhas. Existe também nesta mesma propriedade um efetivo ovino de cerca de 35 animais pertencente ao mesmo produtor.

A alimentação dos animais, consiste em pasto natural, em suplementação com alimento seco, tacos, e forragem durante os meses de maior escassez de alimento.

3.2. Descrição do surto

3.2.1. Deteção do primeiro caso de Brucelose

Em Março de 2018, foi realizado o serviço de sanidade anual nesta exploração, onde foram realizadas colheitas de sangue para obtenção de amostras a todo o efetivo bovino a partir dos 6 meses, salvo raras exceções onde foi retirado sangue a animais com idade menor, devido à sua ascendência.

Nesta fase surgiu o primeiro caso positivo ao teste rosa de bengala e ao teste de fixação do complemento, testes utilizados para a deteção desta doença a nível nacional. Posteriormente, este resultado foi retestado e foi confirmado, ficando a exploração sob sequestro.

À data do primeiro caso positivo (T1), o efetivo com mais de 6 meses era constituído por 192 animais e não existia qualquer sinal clínico descrito ou queixa do produtor em relação a uma possível falha reprodutiva ou outros problemas clínicos.

Os resultados foram enviados para o produtor e entidades envolvidas no controlo da brucelose na exploração, e procedeu-se ao isolamento imediato dos animais positivos, para posteriormente se efetuar o seu abate sanitário.

Com o aparecimento de um caso positivo, a exploração tomou a caracterização de “Efetivo com suspeita de brucelose”, que se estabelece sempre que: “Tenham ocorrido abortos ou quaisquer outros sinais clínicos que possam levar à suspeita de infeção por *Brucella*; Inquéritos epidemiológicos sobre casos de brucelose humana ou animal indiquem a possível existência de animais suspeitos; Tenha havido contacto com rebanhos ou animais considerados positivos ou suspeitos ou, os efetivos submetidos a controlo serológico se encontrem a aguardar resultados laboratoriais concludentes.” (Diário da República 2000)

Trinta dias depois, a exploração foi sujeita a novo rastreio, onde se realizou nova colheita de sangue a todos os animais com mais de seis meses, englobando, agora, animais que não teriam sido testados na visita anterior e assim sucessivamente até ao final deste estudo.

3.2.2. Recolha de amostras de sangue e testagem

As amostras de sangue foram colhidas de acordo com os procedimentos oficiais definidos por lei e aplicados pelo Médico-Veterinário oficial.

A Tabela 10 mostra o número de colheitas realizadas, as quais foram posteriormente testadas, e o número de colheitas não realizadas, que correspondem a animais com menos de 6 meses ou animais que saíram da exploração desde a última testagem, por razões de abate sanitário, por venda ou por morte.

Tabela 9 - Distribuição do número de colheitas de amostras de sangue por Testagem

		Colheitas realizadas		Colheitas não realizadas		Total de Animais		
Data		n	%	n	%	n	%	
Testagem	1	24-03-2018	192	65,1	103	34,9	295	100%
	2	17-05-2018	192	65,1	103	34,9	295	100%
	3	18-07-2018	204	69,2	91	30,8	295	100%
	4	20-11-2018	228	69,2	67	30,8	295	100%
	5	17-01-2019	229	77,6	66	22,4	295	100%
	6	01-03-2019	206	69,8	89	30,2	295	100%
	7	09-07-2019	212	71,9	83	28,1	295	100%
	8	19-08-2019	162	54,9	133	45,1	295	100%
	9	27-09-2019	157	53,2	138	46,8	295	100%
	10	11-11-2019	163	55,3	132	44,7	295	100%
	11	23-12-2019	166	56,3	129	43,7	295	100%
	12	11-02-2020	128	43,4	167	56,6	295	100%

As amostras de sangue foram recolhidas para tubo seco, específico para o efeito, com agulha estéril de 18 Gauge, acoplada ao mesmo. De seguida foram refrigeradas até ao seu processamento em laboratório. É de notar que as condições de refrigeração no campo (imediatamente após a recolha) e no transporte, podem não ser sido totalmente de acordo com as recomendações as ideais, o que poderá ter impacto na qualidade da amostra para testagem, de acordo com os termos ditados pelo “Procedimento de referência para colheita de amostras de material biológico para diagnóstico da brucelose” (INIAV)

Os sangues foram enviados para a OPP, onde a DIV e DSVR os encaminham para o laboratório de referência associado à mesma, neste caso, departamento do INIAV responsável pela Brucelose bovina e laboratório de referência da respetiva OPP.

A testagem das amostras é através de testes de Rosa de Bengala e teste de Fixação do complemento (CFT).

3.2.3. Recolha de dados da exploração

A recolha de dados foi feita com acordo de confidencialidade com o produtor, de forma a que não seja possível a identificação desta exploração (daí a existência de documentos rasurados nos anexos apresentados neste documento).

Após a recolha de amostras sanguíneas ao efetivo, todas as ações foram devidamente registadas nas plataformas digitais respetivas.

Dados recolhidos incluíram:

- Data de colheita de sangue
- Número de Identificação Animal
- Idade
- Sexo

Um inquérito epidemiológico foi levado a cabo (Anexo I), onde as seguintes informações foram levantadas:

- Caracterização da exploração e assistência veterinária
- Caracterização sanitária
- Origem e difusão da infeção (a partir de dados dos últimos doze meses) de ou para outras explorações.
- Caracterização da exploração e do sistema produtivo
- Explorações epidemiologicamente ligadas
- Todos os registos de atividades sanitárias, introdução ou movimentação de animais na exploração.

3.3. Análise de dados

A análise dos dados foi realizada através de estatística descritiva e inferencial, utilizando-se o software SPSS-24.0 (Statistical Package for the Social Sciences).

Foi calculada a prevalência de Brucelose com base no número de amostras positivas sobre o número de amostras totais.

Uma análise descritiva da distribuição de animais no efetivo, do número de animais testados positivos, da idade e do sexo dos animais foi levada a cabo com recurso a frequência absoluta, percentagem, média e desvio-padrão.

Foram realizados testes paramétricos para análise das variáveis idade, número de amostras, após realizado o teste da normalidade de Kolmogorov-Smirnov, e confirmação de que as variáveis apresentavam uma distribuição de normalidade.

Para as variáveis não normalmente distribuídas, nomeadamente idade, sexo e época do ano foram utilizados testes não-paramétricos.

A relação entre a idade dos bovinos (meses) o diagnóstico de Brucelose por testagem positiva foi analisada através do teste de Mann-Witney que é o teste não-paramétrico adequado para comparar as funções de distribuição de uma variável ordinal medida em duas amostras independentes (Marôco 2014), como é o caso da idade.

A relação entre o sexo dos bovinos (meses) e o diagnóstico de Brucelose por testagem positiva foi analisada através do teste do Qui-Quadrado (χ^2), o qual é utilizado para testar se duas ou mais populações (ou grupos) independentes diferem relativamente a uma determinada característica.

4. Resultados

4.1. Intervenções médico-veterinárias no maneio do surto

Neste surto, as medidas de controlo incluíram as seguintes:

- a) Isolamento e abate sanitário dos animais positivos, num total de X ao longo dos 23 meses do estudo
- b) Estabelecimento de um plano de vigilância da exploração com retestagem periódica de 30 dias
- c) Elaboração de um plano individual de saneamento
- d) Vacinação do efetivo feminino com mais de quatro meses de idade, a partir do dia X, visto que a medida anterior não estava a surtir os efeitos desejados de controlo do surto. A vacinação foi feita com 2ml da vacina RB51 (correspondente a $10^{-3.4} \times 10^9$ UFC de microrganismos da estirpe RB51) por via subcutânea (SC), na tabua do pescoço, independentemente do estado fisiológico de gestação em que as fêmeas se encontrem
- e) Revacinação para todas as fêmeas que foram vacinadas com idades compreendidas entre os 4 e os 12 meses, 6 a 12 meses após a primovacinação. Para todas as restantes fêmeas, a revacinação depende da evolução da situação epidemiológica da unidade epidemiológica.
- f) Higienização de todos os espaços de isolamento dos animais positivos de acordo com a legislação em vigor, certificado pelo veterinário da exploração. (Anexo IV)
- g) Durante as retestagens, foi possível observar com alguma frequência no efetivo outras manifestações clínicas provavelmente relacionadas com o surto descrito, nomeadamente abscessos podais, animais com baixa condição corporal, diarreia, prolapsos uterinos e dermatofitose nos vitelos, para os quais foi necessária ação médico-veterinária.

4.2. Impacto do surto no tamanho do efetivo

O efetivo era à data do primeiro caso (T1) constituído por 192 animais com mais de 6 meses e o seu tamanho veio a oscilar entre os 128 e 228 animais (Gráfico 6).

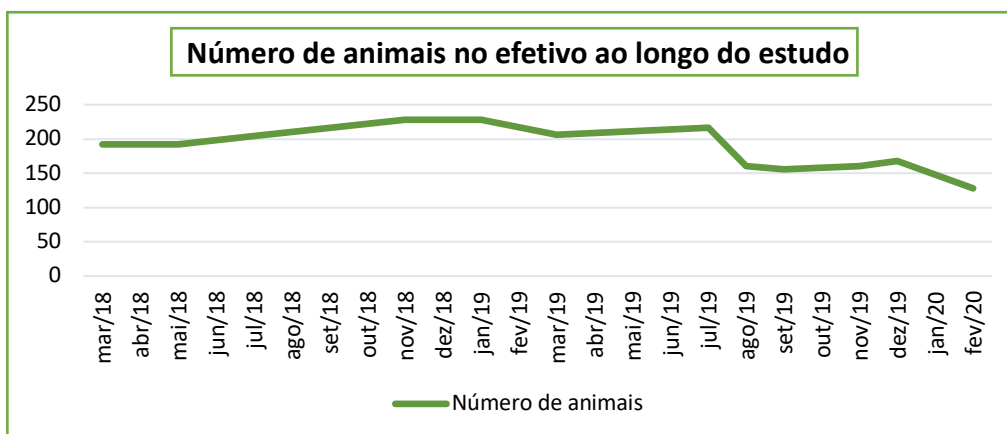


Gráfico 5 - Número de animais, com mais de 6 meses, no efetivo, testados ao longo deste estudo.

Este surto, desde o seu aparecimento até ao momento de término deste estudo (fevereiro 2020), mostrou uma perda de 97 animais resultante de diagnóstico de brucelose positivo.

Aos trinta dias após (T2) a saída do primeiro animal positivo, não se verificou qualquer animal positivo à testagem.

A nova retestagem (T3) foi definida para ter lugar após 60 dias, da qual resultou um novo caso positivo, que o laboratório afirmou como “prejudicado” devido a condições não ideais da amostra. Dado isto, não se procedeu ao abate imediato do mesmo animal, sendo o mesmo retestado novamente com todo o efetivo 60 dias depois.

A figura seguinte apresenta o aparecimento de casos positivos ao longo do tempo e das doze testagens efetuadas (T1 a T12).

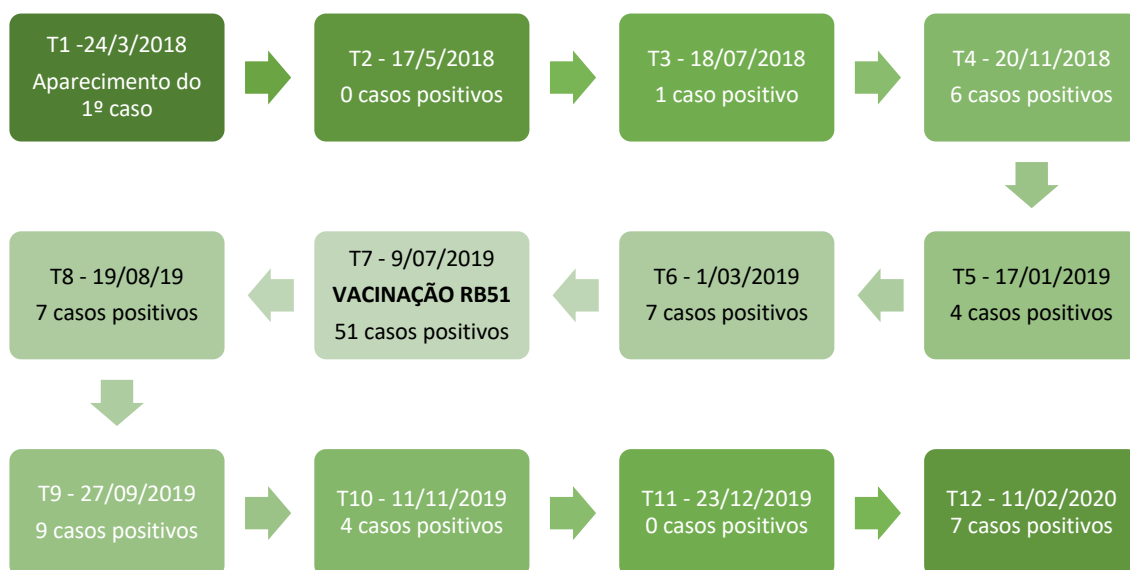


Figura 7- Cronologia do aparecimento dos casos positivos na exploração em estudo.

4.3. Número de amostras para testagem de Brucelose

A tabela 11 apresenta a frequência absoluta e relativa das amostras de sangue efetuadas no efetivo para testagem de Brucelose, como medida de controlo do surto.

Tabela 10 - Número de colheitas de sangue amostradas entre março 2018 a fevereiro de 2020, num efetivo bovino de cerca de 200 animais afetado num surto de Brucelose, num total de 295 animais testados

	Colheitas realizadas		Colheitas não realizadas		Total	
Total	2239	63,2%	1301	36,8%	3540	100%

4.4. Idade dos animais no efetivo e relação com número de amostras

As idades dos 295 animais amostrados (Tabela 11), dos quais resultaram 2239 amostras estavam compreendidas entre 1 mês (<1 ano) e 203 meses (≈17 anos) com uma média de $63,0 \pm 52,5$ meses (5.3 ± 4.4 anos).

Tabela 11 - Frequência da idade (meses) dos bovinos num efetivo de 295 animais afetado com um surto de Brucelose entre março de 2018 e fevereiro de 2020

Idade dos bovinos (meses)	
N	295
Média	64,03
Mediana	44,00
Desvio Padrão	52,49
Mínimo	1
Máximo	203

O Gráfico 7 apresenta a distribuição do número de amostragens feitas em relação à idade dos animais testados. É de realçar que 1186 (53%) das amostras recolhidas foram feitas a animais entre os 6 e 48 meses.

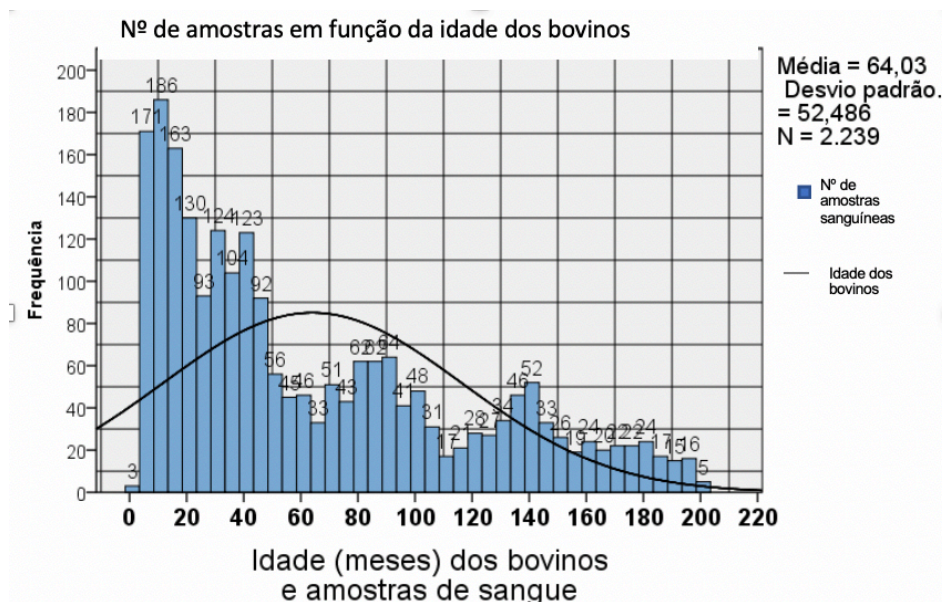


Gráfico 6 – Comparação do número de amostras de sangue em função da idade (meses) dos bovinos.

4.5. Prevalência de Brucelose no efetivo bovino

No que se refere ao diagnóstico da Brucelose (Gráfico 8) do total de 2239 amostras de sangue de bovinos, 97 (4,33%) amostras apresentaram um resultado positivo à testagem para Brucelose e as restantes 2142 (95,67%) amostras testaram negativo. O que revela uma prevalência total de 4% de Brucelose no efetivo.

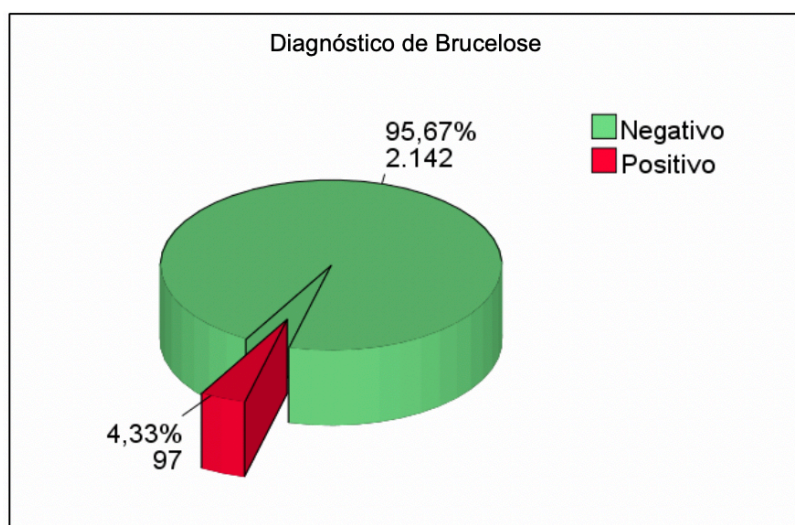


Gráfico 7 – Percentagem de resultados positivos e negativos à testagem para Brucelose num efetivo de 295 animais, num total de 2239 testes realizados num surto de Brucelose bovina.

4.6. Relação entre Idade e Diagnóstico de Brucelose no efetivo bovino

O Gráfico 9 mostra que a média de idade dos bovinos com resultados positivos (74.8 ± 44.0 meses) foi superior comparada com a média de idade de bovinos com resultados negativos (63.5 ± 52.8 meses). Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,001$). É de notar que o animal mais jovem que testou positivo tinha 7 meses de idade e o animal mais velho tinha 171 meses (14 anos) de idade.

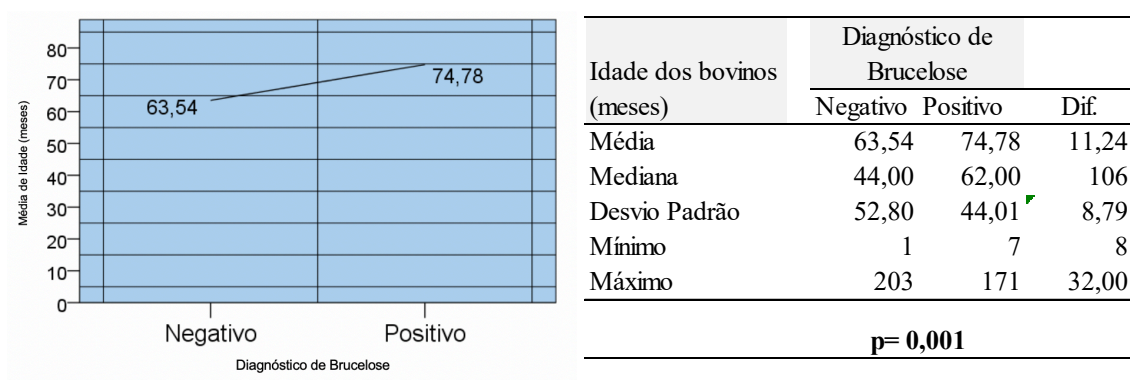


Gráfico 8- (esquerda) Representação da média de idade do efetivo em relação ao seu diagnóstico de Brucelose.

Tabela 12 –(direita) Comparação de idade (meses) em função do diagnóstico de Brucelose.

4.7. Relação entre Sexo e Diagnóstico de Brucelose no efetivo bovino

A Tabela 14 mostra uma relação estatisticamente significativa ($p=0,005$) entre o sexo dos animais no efetivo e o diagnóstico de Brucelose por testagem positiva, sendo que a maioria dos diagnósticos de Brucelose positivos ocorreu nos bovinos do sexo feminino ($n=96$; 99%) em comparação com os bovinos do sexo masculino ($n=1$; 1%).

Tabela 13 - Associação entre o sexo e o Diagnóstico de Brucelose do efetivo bovino

		Diagnóstico		Total	<i>p</i>
		Negativo	Positivo		
Feminino	n	1919	96	2015	
	%	89,6%	99,0%	90,0%	
Masculino	n	223	1	224	
	%	10,4%	1,0%	10,0%	
Total	n	2142	97	2239	0,005
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

O Gráfico 11 mostra que 2015 (90%) das amostras testadas corresponderam a animais do sexo feminino e que 223 (10%) eram de machos.

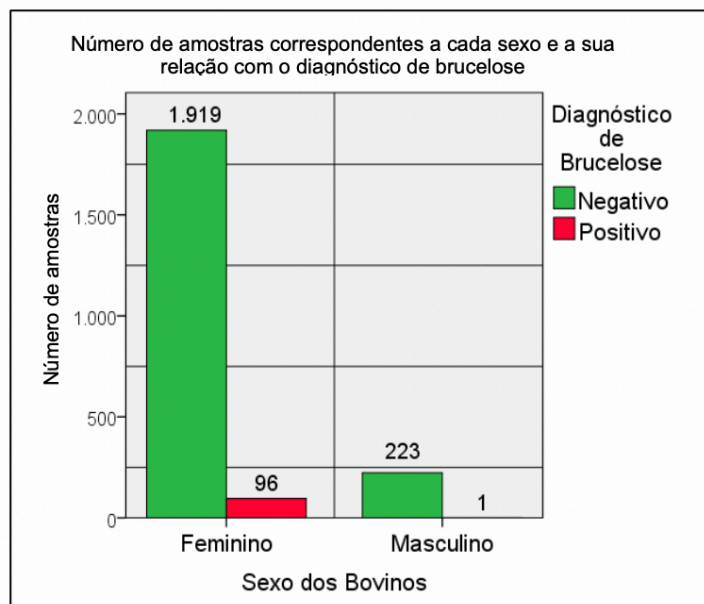


Gráfico 9 - Distribuição do diagnóstico de Brucelose em função do sexo dos bovinos

4.8. Relação entre época do ano da testagem e Diagnóstico de Brucelose no efetivo bovino

A Tabela 15 e o Gráfico 12 apresentam a distribuição e frequência das amostras com resultados positivos à Brucelose ao longo das testagens feitas, em

diferentes épocas do ano. É de notar que a maioria dos diagnósticos positivos ocorreu em julho de 2019 (n=51; 52,6%), seguindo-se setembro de 2019 (n=9; 9,3%). Esta diferença de seropositividade em diferentes épocas do ano revelou-se estatisticamente significativa ($p=0,000$).

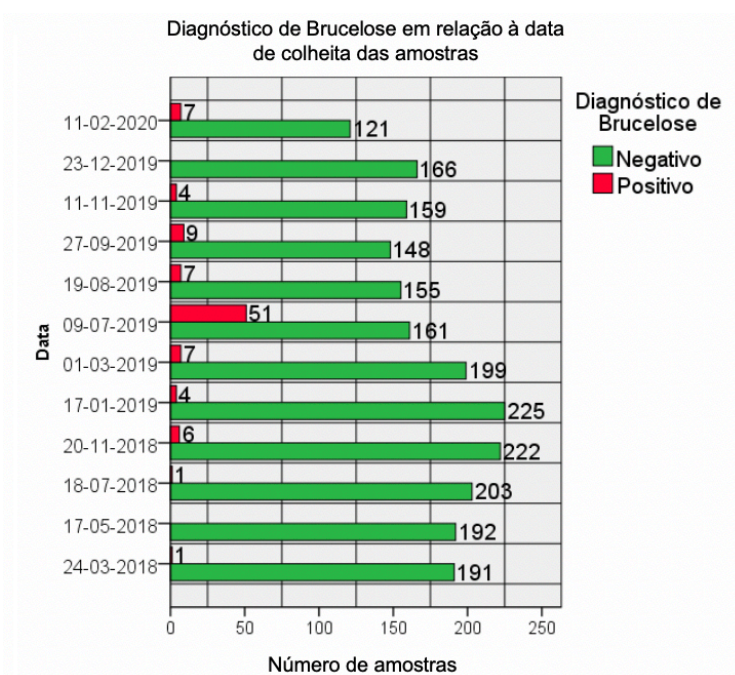
Tabela 14 - Associação entre o diagnóstico de Brucelose e a respetiva testagem do efetivo e o seu resultado

		Diagnóstico de Brucelose						<i>P</i>
		Negativo		Positivo		Total		
		n	%	n	%	n	%	
Testagem	24-03-2018	191	8,9%	1	1,0%	192	8,6%	0,000
	17-05-2018	192	9,0%	0	0,0%	192	8,6%	
	18-07-2018	203	9,5%	1	1,0%	204	9,1%	
	20-11-2018	222	10,4%	6	6,2%	228	10,2%	
	17-01-2019	225	10,5%	4	4,1%	229	10,2%	
	01-03-2019	199	9,3%	7	7,2%	206	9,2%	
	09-07-2019	161	7,5%	51	52,6%	212	9,5%	
	19-08-2019	155	7,2%	7	7,2%	162	7,2%	
	27-09-2019	148	6,9%	9	9,3%	157	7,0%	
	11-11-2019	159	7,4%	4	4,1%	163	7,3%	
	23-12-2019	166	7,7%	0	0,0%	166	7,4%	
	11-02-2020	121	5,6%	7	7,2%	128	5,7%	
	Total	2142	100%	97	100%	2239	100%	

0 céulas (0,0%) esperavam uma contagem menor que 5. A contagem mínima esperada é 5,55.

0 células (0,0%) esperavam uma contagem menor que 5. A contagem mínima esperada é 5,55.

Gráfico 10 - Diagnóstico de Brucelose em função do momento de colheita de dados



5. Discussão

Desde o aparecimento do primeiro caso de brucelose, o produtor, foi obrigado, a agir em concordância com as ordens dadas pela DSVRA. O animal em questão, isolado nas instalações do produtor, foi retestado, para confirmação da sua seropositividade, onde permaneceu até ser recolhido para um centro de abate que o realizou, segundo o decreto de lei nº 244/2000 de 27 de setembro relacionado com as normas técnicas de execução do Programa de Erradicação de Brucelose (PEB), bem como a classificação sanitária dos efetivos e áreas e à consequente epidemiovigilância da doença.

O reaparecimento dos casos, nesta exploração, é, neste momento a maior questão para o produtor, pois, desde o aparecimento de *Brucella* neste efetivo bovino, reduziu drasticamente o retorno económico que o produtor tinha desta exploração, uma vez que se encontrava impossibilitado de vender qualquer animal num período tão alargado. Posto isto, a disponibilidade financeira para investir no seu efetivo também ficou reduzida, e consequentemente o estado geral do efetivo veio a decrescer ao longo do tempo.

Existem vários fatores que podem influenciar o reaparecimento da doença, nesta exploração, tais como, a presença de fauna selvagem, a presença de outros efetivos bovinos nas explorações circundantes, a presença de cursos de água que atravessam a exploração que são provenientes de explorações vizinhas, a dificuldade de deteção de abortos dado o regime extensivo da exploração e a cadeia alimentar de animais silváticos, danos nas infraestruturas que separam os grupos de animais e explorações contíguas, o facto dos animais jovens não serem testados, e permanecerem na exploração, até testarem positivo (6 meses),

De facto, os animais, mesmo com barreiras físicas, muitas vezes misturam-se pelo que, em determinada situação, encontrámos animais errantes, pertencentes a explorações vizinhas, junto da manada que iria ser testada, apesar desse facto não justificar todos os reaparecimentos de brucelose nesta exploração, constituem, no entanto, um problema sanitário.

A ocorrência de problemas observados durante as retestagens deveu-se provavelmente, à diminuição da suplementação alimentar do efetivo que secundariamente, levou a imunodepressão, e consequentemente mais suscetíveis a tais fatores, como por exemplo, parasitas, fungos, problemas podais, oftálmicos, problemas da pele e pelagem. Nos animais jovens, foi possível observar alguns casos de desnutrição e mau estado geral, devido à eliminação das suas progenitoras, devido ao seu estado epidemiológico e também devido à fraca suplementação.

O cálculo da prevalência foi feito através do número de amostras positivas sobre o número total, o que pode não refletir a prevalência real no efetivo, visto que apenas animais com mais de 6 meses (salvo exceções de vitelos filhos de vacas positivas) foram testados. Com isto, a prevalência de 4% pode estar inflacionada. É possível que se se calculasse a prevalência com base no número de animais infetados sobre a população do efetivo, que este valor fosse mais baixo.

O facto de 53% das amostras recolhidas terem sido feitas a animais entre os 6 e os 48 meses (4 anos), dos quais muitos deles são fêmeas que ainda não tinham tido oportunidade de mostrar sintomatologia reprodutiva, por só serem postas à cobertura depois dos 3 anos idade. Este facto pode estar associado à falta de deteção de abortos ou outros problemas reprodutivos, característicos de uma infeção por *Brucella* spp.

Animais testados com um mês dizem respeito a vitelos cujas mães testaram positivo e os quais tiveram igualmente de ser testados, por risco de contágio através do leite e outras secreções.

Os dados deste estudo mostram que animais de idades variáveis apresentaram infeção por *Brucella* spp., o que está de acordo com a literatura científica. Nesta exploração, estes resultados não surpreendem, visto que vitelos permanecem com as mães até cerca dos 12 meses, o que propicia a infeção entre animais mais velhos e mais jovens.

A relação do sexo dos indivíduos com a sua seropositividade, demonstra que a prevalência desta doença é mais incidente nas fêmeas como vários autores já o demonstraram (Mangi, 2015; De Alencar Mota *et al.*, 2016). Este facto é bastante normal porque, a quantidade de fêmeas nesta exploração é muito maior, e também o facto destas terem sido separadas dos machos durante o período de manejo do surto de Brucelose e até ao final do estudo. Embora, seja importante realçar, que uma vez que o método reprodutivo desta exploração é a utilização de um macho para inúmeras fêmeas, poderíamos estar perante a situação de infeção das fêmeas a partir de um macho assintomático, dado que a transmissão venérea está descrita na literatura. (Wilesmith, 1978; P. Nicoletti, 2010). Outro fator importante é a quantidade de fêmeas na exploração e a patogenia desta bactéria, que se caracteriza por ser gram-negativa com grande afinidade para o útero grávido, devido à facilidade da sua sobrevivência e multiplicação neste meio com tanta influência de hormonas (Gyles *et al.* 2008).

Quanto à época do ano em que se revelaram mais casos positivos, esta deu-se no período de verão, nos meses de julho e setembro. Embora esta bactéria tenha maior capacidade de sobrevivência em situações de temperaturas baixas e altas percentagens de humidade (Godfroid *et al.* 2013), isto coincidiria com o período de Inverno, onde estas condições climáticas se fazem verificar no nosso país. Contudo,

este aumento de casos positivos pode ser justificado pelo início da época de parições na exploração, onde poderão ter ocorrido partos de fetos abortados que pela dificuldade da sua deteção, que não foram notificados pelo produtor. Visto que o produtor não realiza controlo reprodutivo, não havia conhecimento de quais e quantas vacas estariam gestantes, e portanto não houve identificação de perdas fetais.

Mesmo após a vacinação de todo o efetivo, a emergência de novos casos, testagem após testagem, não seria espectável, pois esta vacina não pode ser detetada nos testes serológicos pois a cadeia O-side dos anticorpos de *Brucella* (a porção que é detetada nos testes sorológicos) não existe na vacina RB51 (G. G. Schurig *et al.*, 1991; N F Cheville *et al.*, 1993; Mark G. Stevens *et al.*, 1995; Norman F. Cheville *et al.*, 1996; Fernando P. Poester *et al.*, 2006;).

A análise dos fatores de risco a partir do inquérito epidemiológico deste surto não faz parte dos objetivos deste estudo. Contudo, suspeita-se que a infeção tenha tido origem numa exploração contígua, mais especificamente através de animais errantes pertencentes à exploração vizinha.

A presença de animais vizinhos nesta exploração, a presença de animais selvagens que possam estar a servir de reservatório para a *B. abortus* (Godfroid *et al.* 2013), a contaminação dos cursos de água que atravessam a exploração a montante e a presença de abortos não detetados. Estes são fatores de risco de reaparecimento da doença, mas nem todos são possíveis de controlar, devido ao regime e manejo da exploração.

Nesta exploração, tivemos oportunidade de observar, que apesar dos esforços feitos por parte de todas as entidades de sanidade animal, existem fatores extrínsecos que o comprometem, isto remete-nos para uma reflexão para a importância da biossegurança nas explorações pecuárias, que cada vez mais tem sido um assunto de grande importância, na Medicina Veterinária mas também, a nível da Organização Mundial da Saúde (OMS).

6. Conclusão

A brucelose, continua a ser uma doença endémica no nosso país, apesar de muitos esforços serem feitos para a sua erradicação, embora com todas as limitações inerentes aos nossos sistemas de produção.

Com este trabalho foi demonstrado que a idade média de infeção nesta exploração é aos 6 anos de idade, a época do ano mais incidente da doença será no início da época de parições, ou seja, no verão, e o sexo feminino revelou ser o mais afetado por esta doença, nesta exploração.

No geral, este surto de brucelose está perto de se encontrar controlado, e não deverá ser necessário o abate sanitário de todo o efetivo.

Seria interessante para esta exploração, o início de um controlo reprodutivo, tanto por parte do produtor, assim como da parte veterinária para saber dados importantes, tais como, taxa de fertilidade, taxa de conceção, taxa de aborto, entre outros, pois numa exploração que sofreu tantas perdas devido a esta patologia, seria interessante, tentar evitá-lo e/ou detetá-lo novamente a partir dos dados reprodutivos.

A nível nacional, ou pelo menos nas zonas onde a fauna selvagem é mais abundante, seria interessante fazer um estudo em conjunto com o Instituto da conservação da Natureza e das Florestas (ICNF), tanto da presença da doença na fauna selvagem, através da colheita de sangue de animais abatidos em atividade cinegéticas, sujeitos a exame veterinário *post-mortem*.

7. Bibliografia

- Acha, Pedro N., e Boris Szyfres. 2005. «Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre». *Revista Española de Salud Pública* 79(3):423–423.
- Ackermann, M. R., N. F. Cheville, e B. L. Deyoe. 1988. «Bovine Ileal Dome Lymphoepithelial Cells: Endocytosis and Transport of *Brucella abortus* Strain 19». *Veterinary Pathology* 25(1):28–35.
- Adams, L. Garry. 2002. «The pathology of brucellosis reflects the outcome of the battle between the host genome and the *Brucella* genome». *Veterinary Microbiology* 90(1–4):553–61.
- De Alencar Mota, Ana Lourdes Arrais, Fernando Ferreira, José Soares Ferreira Neto, Ricardo Augusto Dias, Marcos Amaku, José Henrique Hildebrand Grisi-Filho, Evelise Oliveira Telles, e Vítor Salvador Picão Gonçalves. 2016. «Large-scale study of herd-level risk factors for bovine brucellosis in Brazil». *Acta Tropica* 164:226–32.
- Alp, Emine, Rahmi Kemal Koc, Ahmet Candan Durak, Orhan Yildiz, Bilgehan Aygen, Bulent Sumerkan, e Mehmet Doganay. 2006. «Doxycycline plus streptomycin versus ciprofloxacin plus rifampicin in spinal brucellosis [ISRCTN31053647]». *BMC Infectious Diseases* 6:1–10.
- Alton, G. G. 1988. «Techniques for the brucellosis laboratory». P. 190 em. Paris: Institut national de la recherche agronomique.
- Alton, G. G., e P. D. Carter. 1980. «The indirect haemolysis test (IHLT) for bovine brucellosis - comparisons with the complement fixation test (CFT) in vaccinated and experimentally infected cattle.» *Australian Veterinary Journal* 56:405–8.
- Anderson, T. D., N. F. Cheville, e V. P. Meador. 1986. «Pathogenesis of Placentitis in the Goat Inoculated with *Brucella abortus*. II. Ultrastructural Studies». *Veterinary Pathology* 23(3):227–39.
- Ariza, J., F. Gudiol, R. Pallares, P. F. Viladrich, G. Rufi, J. Corredora, e M. R. Miravittles. 1992. «Treatment of human brucellosis with doxycycline plus rifampin or doxycycline plus streptomycin. A randomized, double-blind study». *Annals of Internal Medicine* 117(1):25–30.
- Ashford, David A., Jennifer Di Pietra, Jairam Lingappa, Christopher Woods, Heather Noll, Bridget Neville, Robbin Weyant, Sandra L. Bragg, Richard A. Spiegel, Jordan Tappero, e Bradley A. Perkins. 2004. «Adverse events in humans associated with accidental exposure to the livestock brucellosis vaccine RB51». *Vaccine* 22(25–26):3435–39.
- B. Lopes, L., R. Nicolino, e J. P.A. Haddad. 2010. «Brucellosis - Risk Factors and Prevalence: A Review». *The Open Veterinary Science Journal* 4(1):72–84.
- Baddour, Manal M., e Dalal H. Alkhalifa. 2008. «Evaluation of three polymerase chain reaction techniques for detection of *Brucella* DNA in peripheral human blood». *Canadian Journal of Microbiology* 54(5):352–57.
- Banai, Menachem. 2002. «Control of small ruminant brucellosis by use of *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine: Laboratory aspects and field observations». *Veterinary Microbiology* 90(1–4):497–519.
- Banai, Menachem, Rita Itin, e Svetlana Bardenstein. 2018. «Perspectives and outcomes of the activity of a reference laboratory for brucellosis». *Frontiers in Veterinary Science* 4(234):1–6.
- Baum, M., O. Zamir, R. Bergman-Rios, E. Katz, Z. Beider, e A. Cohen. 2010. «Bovine brucellosis». *Veterinary Microbiology* 130(2):312–19.
- Bengis, R. G., R. A. Kock, e J. Fischer. 2002. «Infectious animal diseases: The wildlife/livestock interface». *OIE Revue Scientifique et Technique* 21(1):53–65.
- Breitmeyer, R. E., D. W. Hird, e T. E. Carpenter. 1992. «Serologic and bacteriologic test results after adult vaccination with strain 19 in three dairy herds infected with brucellosis». *Journal of the American Veterinary Medical Association* 200(6):806–811.

- Bricker, Betsy J. 2002. «PCR as a diagnostic tool for brucellosis». *Veterinary Microbiology* 90(1–4):435–46.
- Bricker, Betsy J., e Darla R. Ewalt. 2005. «Evaluation of the HOOOF-Print assay for typing *Brucella abortus* strains isolated from cattle in the United States: Results with four performance criteria». *BMC Microbiology* 5:1–10.
- Bricker, Betsy J., Darla R. Ewalt, Steven C. Olsen, e Allen E. Jensen. 2003. «Evaluation of the *Brucella abortus* species-specific polymerase chain reaction assay, an improved version of the *Brucella* AMOS polymerase chain reaction assay for cattle». *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 15(4):374–78.
- Van Campen, Hana, e Jack Rhyan. 2010. «The Role of Wildlife in Diseases of Cattle». *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* 26(1):147–61.
- Cheville, N. F., M. G. Stevens, A. E. Jensen, F. M. Tatum, e S. M. Halling. 1993. «Immune responses and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutant strains of *Brucella abortus*». *American journal of veterinary research* 54(10):1591—1597.
- Cheville, Norman F., Steven C. Olsen, Allen E. Jensen, Mark G. Stevens, Mitchell V. Palmer, e Allison M. Florance. 1996. «Effects of age at vaccination on efficacy of *Brucella abortus* strain RB51 to protect cattle against brucellosis». *American Journal of Veterinary Research* 57(8):1153–56.
- Confalonieiri, Ulisses E. C. 2010. «emergência de doenças infecciosas humanas: Processos ecológicos e abordagens preditivas». *Oecologia Australis* 14(3):591–602.
- Cordes, D. O., e Margery E. Carter. 1979. «Persistence of *Brucella abortus* infection in six herds of cattle under brucellosis eradication». *New Zealand Veterinary Journal* 27(12):255–59.
- Corner, L. A., e G. G. Alton. 1981. «Persistence of *Brucella abortus* strain 19 infection in adult cattle vaccinated with reduced doses». *Research in Veterinary Science* 31(3):342–44.
- Detilleux, Philippe G., Billy L. Deyoe, e Norman F. Cheville. 1990. *Penetration and Intracellular Growth of Brucella abortus in Nonphagocytic Cells In Vitro*. Vol. 58.
- Diário da República. 2000. *Decreto-Lei nº244/2000 de 27 de Setembro de 2000*.
- Dorneles, Elaine M. S., Nammalwar Sriranganathan, e Andrey P. Lage. 2015. «Recent advances in *Brucella abortus* vaccines». *Veterinary Research* 46(1):1–10.
- Dorneles, EMS, LF Oliveria, e Andrey Pereira Lage. 2017. «*Brucella Abortus* Vaccines: Use in Control Programs and Immune Response». *Journal of Bacteriology and Mycology* 4(1).
- Dubie, Teshager, Mulie Adugna, Tesfaye Sisay, e Yimer Mukitar. 2014. «The economic and public health significance of brucellosis». *Global Research Journal of Public Health and Epidemiology* 1:054–064.
- Ducrotot, Marie J., Raquel Conde-Álvarez, José María Blasco, e Ignacio Moriyón. 2016. «A review of the basis of the immunological diagnosis of ruminant brucellosis». *Veterinary Immunology and Immunopathology* 171:81–102.
- Edmonds, M. D., G. G. Schurig, L. E. Samartino, P. G. Hoyt, J. V Walker, S. D. Hagius, e P. H. Elzer. 1999. «Biosafety of *Brucella abortus* strain RB51 for vaccination of mature bulls and pregnant heifers». *American journal of veterinary research* 60(6):722—725.
- Facciola, Alessio, Maria A. R. Palamara, Giuseppa D'Andrea, Fernanda Marano, Domenico Magliarditi, Giovanni Puglisi, Isa Picerno, Angela Di Pietro, e Giuseppa Visalli. 2018. «Brucellosis is a public health problem in southern Italy: Burden and epidemiological trend of human and animal disease». *Journal of Infection and Public Health* 11(6):861–66.
- Falagas, Matthew E., e Ioannis A. Bliziotis. 2006. «Quinolones for treatment of human brucellosis: Critical review of the evidence from microbiological and clinical studies». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50(1):22–33.

- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, e World Health Organization WHO. 1986. *Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis*.
- Ferroglio, E., F. Tolari, E. Bollo, e B. Bassano. 1998. «Isolation of *Brucella melitensis* from alpine ibex». *Journal of Wildlife Diseases* 34(2):400–402.
- Le Flèche, Philippe, Isabelle Jacques, Maggy Grayon, Sascha Al Dahouk, Patrick Bouchon, France Denoeud, Karsten Nöckler, Heinrich Neubauer, Laurence A. Guilloteau, e Gilles Vergnaud. 2006. «Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay». *BMC Microbiology* 6:1–14.
- Fonseca, Gabriela, A. Pina Fonseca, e C. Agrela Pinheiro. 2008. *Manual de apoio às estratégias de controlo da Brucelose Bovina*.
- Franc, K. A., R. C. Krecek, B. N. Häsler, e A. M. Arenas-Gamboa. 2018. «Brucellosis remains a neglected disease in the developing world: A call for interdisciplinary action». *BMC Public Health* 18(1).
- Gall, D., e K. Nielsen. 2004. «Serological diagnosis of bovine brucellosis: A review of test performance and cost comparison». *OIE Revue Scientifique et Technique* 23(3):989–1002.
- Gall, D., K. Nielsen, M. R. Bermudez, F. Moreno, e P. Smith. 2002. «Fluorescence polarization assay for detection of *Brucella abortus* antibodies in bulk tank bovine milk samples». *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 9(6):1356–60.
- Gardner, I. A., S. Hietala, e W. M. Boyce. 1996. «Validity of using serological tests for diagnosis of diseases in wild animals». *OIE Revue Scientifique et Technique* 15(1):323–35.
- Garin-Bastuji, B., J. M. Blasco, C. Marín, e D. Albert. 2006. «The diagnosis of brucellosis in sheep and goats, old and new tools». *Small Ruminant Research* 62(1-2 SPEC. ISS.):63–70.
- Garin-Bastuji, B., J. Oudar, Y. Richard, e J. Gastellu. 1990. «Isolation of *Brucella melitensis* biovar 3 from a chamois (*Rupicapra rupicapra*) in the southern French Alps». *Journal of wildlife diseases* 26(1):116–18.
- Godfroid, J. 2002. «Brucellosis in wildlife». *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 2002, 21 (2), 277-286 21(2):277–86.
- Godfroid, J., B. Garin-Bastuji, C. Saegerman, e J. M. Blasco. 2013. «Brucellosis in terrestrial wildlife». *OIE Revue Scientifique et Technique* 32(1):27–42.
- Godfroid, Jacques, e Annemarie Käsbohrer. 2002. «Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty-first century». *Veterinary Microbiology* 90(1–4):135–45.
- Godfroid, Jacques, Klaus Nielsen, e Claude Saegerman. 2010. «Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife». *Croatian Medical Journal* 51(4):296–305.
- Gorham, S. L., F. M. Enright, T. G. Snider, e E. D. Roberts. 1986. «Morphologic Lesions in *Brucella abortus* Infected Ovine Fetuses». *Veterinary Pathology* 23(3):331–32.
- Gorvel, Jean Pierre, e Edgardo Moreno. 2002. «*Brucella* intracellular life: From invasion to intracellular replication». *Veterinary Microbiology* 90(1–4):281–97.
- Graves, R. R. 1943. «The story of John M. Buck's and Matilda's contribution to the cattle industry». *Journal of the American Veterinary Medical Association* 102:193–95.
- Grilló, María Jesús, José María Blasco, Jean Pierre Gorvel, Ignacio Moriyán, e Edgardo Moreno. 2012. «What have we learned from brucellosis in the mouse model?». *Veterinary Research* 43(1):1–35.
- Guzmán-Verri, Caterina, Esteban Chaves-Olarte, Christoph Von Eichel-Streiber, Ignacio López-Goñi, Monica Thelestam, Staffan Arvidson, Jean Pierre Gorvel, e Edgardo Moreno. 2001. «GTPases of the Rho subfamily are required for *Brucella abortus* internalization in nonprofessional phagocytes: Direct activation of Cdc42». *Journal of Biological Chemistry* 276(48):44435–43.
- Gyles, CL, JF Prescott, JG Songer, e CO Thoen. 2008. «*Brucella*». Pp. 429–42 em *Pathogenesis of*

bacterial infections in animals.

- Haydon, Daniel T., Sarah Cleaveland, Louise H. Taylor, e M. Karen Laurenson. 2002. «Identifying reservoirs of infection: A conceptual and practical challenge». *Emerging Infectious Diseases* 8(12):1468–73.
- Ivanov, Arkady V., Konstantin M. Salmakov, Steven C. Olsen, e Glenn E. Plumb. 2011. «A live vaccine from *Brucella abortus* strain 82 for control of cattle brucellosis in the Russian Federation.» *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases* 12(1):113–21.
- Jiang, Xiaosui, e Cynthia L. Baldwin. 1993. «Effects of Cytokines». *Immunity* 61(1):124–34.
- Jones, F. M., e J. A. Hooper. 1976. «*Brucella abortus* strain 19 calfhood vaccination - a review». *Southwestern Veterinary Journal* 29:219–25.
- Jones, L. M., D. T. Berman, E. Moreno, B. L. Deyoe, M. J. Gilsdorf, J. D. Huber, e P. Nicoletti. 1980. «Evaluation of a radial immunodiffusion test with polysaccharide B antigen for diagnosis of bovine brucellosis». *Journal of Clinical Microbiology* 12(6):753–60.
- Khan, Fida Muhammad, Muhammad Subhan Qureshi, Shah Nawaz, Muhammad Aftab, Umar Sadique, Ziaul Islam, Zia Ur, e Rahman Khalil. 2017. «Comparative evaluation of Serum Plate Agglutination Test (SPAT) and Rose Bengal Plate Test (RBPT) for diagnosis of *Brucella abortus* in sera of cattle and human». *International Journal of Biosciences (IJB)* 10(5):367–71.
- Klaus Nielsen, J. Robert Duncan. 1990. *Animal Brucellosis*.
- Ko, Jinkyung, e Gary A. Splitter. 2003a. «Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: Current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans». *Clinical Microbiology Reviews* 16(1):65–78.
- Ko, Jinkyung, e Gary A. Splitter. 2003b. «Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: Current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans». *Clinical Microbiology Reviews*.
- Koh, S. H., e F. H. W. Morley. 1981. «the Effect of Calfhood Vaccination With Strain 19 on the Serological Diagnosis and Eradication of Bovine Brucellosis». *Australian Veterinary Journal* 57(12):551–53.
- López-Goñi, Ignacio, David García-Yoldi, Clara M. Marín, María J. de Miguel, Elías Barquero-Calvo, Caterina Guzmán-Verri, David Albert, e Bruno Garin-Bastuji. 2011. «New Bruce-ladder multiplex PCR assay for the biovar typing of *Brucella suis* and the discrimination of *Brucella suis* and *Brucella canis*». *Veterinary Microbiology* 154(1–2):152–55.
- Lord, Veronica R., Gerhardt G. Schurig, John W. Cherwonogrodzky, Mabel J. Marciano, e Gerardo E. Melendez. 1998. «Field study of vaccination of cattle with *Brucella abortus* strains RB51 and 19 under high and low disease prevalence». *American Journal of Veterinary Research* 59(8):1016–20.
- Luna-Martínez, J. Eduardo, e Claudia Mejía-Terán. 2002. «Brucellosis in Mexico: Current status and trends». *Veterinary Microbiology* 90(1–4):19–30.
- Mangen, M. ..., J. Otte, D. Pfeiffer, e P. Chilonda. 2002. «Bovine brucellosis in Sub-Saharan Africa: Estimation of sero-prevalence and impact on meat and milk offake potential Food and Agriculture Organization». *FAO Livestock Information and policy branch* 8.
- Mangi, Mazhar Hussain. 2015. «Seroprevalence of Brucellosis in Holstein-Friesian and Indigenous Cattle Breeds of Sindh Province, Pakistan». *Journal of Animal Health and Production* 3(4):82–87.
- Manthei, C. A. 1959. «Summary of controlled research with Strain 19.» *Summary of controlled research with Strain 19*. 91–97.
- Manthei, C. A. 1968. «Application of Research to Bovine Brucellosis Control and Eradication Programs». *Journal of Dairy Science* 51(7):1115–20.
- Marôco, João. 2014. *Análise Estatística com o SPSS Statistics*. 6ª edição. Lisboa.

- Martins, H., B. Garin-Bastuji, F. Lima, L. Flor, A. Pina Fonseca, e F. Boinas. 2009. «Eradication of bovine brucellosis in the Azores, Portugal-Outcome of a 5-year programme (2002-2007) based on test-and-slaughter and RB51 vaccination». *Preventive Veterinary Medicine* 90(1-2):80-89.
- De Massis, F., A. Giovannini, B. Di Emidio, G. F. Ronchi, M. Tittarelli, E. Di Giannatale, M. Di Ventura, D. Nannini, e V. Caporale. 2005. «Use of the complement fixation and brucellin skin tests to identify cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain RB51.» *Veterinaria italiana* 41(4):291-99.
- McDermott, J., D. Grace, e J. Zinsstag. 2013. «Economics of brucellosis impact and control in low-income countries». *OIE Revue Scientifique et Technique* 32(1):249-61.
- McDermott, John J., e S. M. Arimi. 2002. «Brucellosis in sub-Saharan Africa: Epidemiology, control and impact». *Veterinary Microbiology* 90(1-4):111-34.
- McDiarmid, A. 1958. «Brucellosis in Cattle». *PUBLIC HEALTH VOL. LXXV NO. 5 LXXV*:268-74.
- McGiven, J. A., J. D. Tucker, L. L. Perrett, J. A. Stack, S. D. Brew, e A. P. MacMillan. 2003. «Validation of FPA and cELISA for the detection of antibodies to *Brucella abortus* in cattle sera and comparison to SAT, CFT, and iELISA». *Journal of Immunological Methods* 278(1-2):171-78.
- Meador, V. P., e B. L. Deyoe. 1989a. «Intracellular Localization of *Brucella abortus* in Bovine Placenta». *Veterinary Pathology* 26(6):513-15.
- Meador, V. P., e B. L. Deyoe. 1989b. *Intracellular Localization of Brucella abortus in Bovine Placenta*.
- Meyer, M. E., e C. J. Nelson. 1969. «Persistence of *Brucella abortus*, strain 19 infection in immunized cattle.» *Proceedings, annual meeting of the United States Animal Health Association* 73:159-65.
- De Miguel, M. J., C. M. Marín, P. M. Muñoz, L. Dieste, M. J. Grilló, e J. M. Blasco. 2011. «Development of a selective culture medium for primary isolation of the main *Brucella* Species». *Journal of Clinical Microbiology* 49(4):1458-63.
- Miranda, Karina Leite, Fernando Padilla Poester, Silvia Minharro, Elaine Maria Seles Dorneles, Ana Paula Reinato Stylen, e Andrey Pereira Lage. 2013. «Evaluation of *Brucella abortus* S19 vaccines commercialized in Brazil: Immunogenicity, residual virulence and MLVA15 genotyping». *Vaccine* 31(29):3014-18.
- Mohan, Anju, Hari Mohan Saxena, e Puneet Malhotra. 2016. «A comparison of titers of anti-*Brucella* antibodies of naturally infected and healthy vaccinated cattle by standard tube agglutination test, microtiter plate agglutination test, indirect hemagglutination assay, and indirect enzyme-linked immunosorbent assay». *Veterinary World* 9(7):717-22.
- Muñoz, Pilar M., Mariana Boadella, Maricruz Arnal, María J. de Miguel, Miguel Revilla, David Martínez, Joaquín Vicente, Pelayo Acevedo, Álvaro Oleaga, Francisco Ruiz-Fons, Clara M. Marín, José M. Prieto, José de la Fuente, Marta Barral, Montserrat Barberán, Daniel F. de Luco, José M. Blasco, e Christian Gortázar. 2010. «Spatial distribution and risk factors of Brucellosis in Iberian wild ungulates». *BMC Infectious Diseases* 10.
- Naik, R. Venkatesh, Harish Murthy, H. K. Prakash, e B. V. Peerapur. 2017. «A Comparative Study of Microplate Agglutination Test (MAT) with Enzyme Linked Immunosorbant Assay (ELISA) for Diagnosis of Brucellosis». *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6(10):1550-58.
- Nathan, Andrew J., e Andrew Scobell. 2012. «How China sees America». *Foreign Affairs* 91(5):1689-99.
- Neta, Alcina V. Carvalho, Juliana P. S. Mol, Mariana N. Xavier, Tatiane A. Paixão, Andrey P. Lage, e Renato L. Santos. 2010. «Pathogenesis of bovine brucellosis». *The Veterinary Journal* 184(2):146-55.
- Nicoletti, P. 1990. «Vaccination against *Brucella*». *Advances in biotechnological processes* 13:147-168.
- Nicoletti, P. 2010. «BRUCELLOSIS: PAST, PRESENT AND FUTURE Nicoletti P.» *College of veterinary*

- medecine, University of florida, Gainesville; FL, USA 32(Brucellosis: past, present and future):21–32.
- Nicoletti, Paul. 2020. «Brucellosis in Cattle». *MSD MANUAL* 2–3.
- Nielsen, K., D. Gall, M. Jolley, G. Leishman, S. Balsevicius, P. Smith, P. Nicoletti, e F. Thomas. 1996. «A homogeneous fluorescence polarization assay for detection of antibody to *Brucella abortus*». *Journal of Immunological Methods* 195(1–2):161–68.
- Nielsen, K., P. Smith, W. Yu, P. Nicoletti, P. Elzer, A. Vigliocco, P. Silva, R. Bermudez, T. Renteria, F. Moreno, A. Ruiz, C. Massengill, Q. Muenks, K. Kenny, T. Tollersrud, L. Samartino, S. Conde, G. Draghi De Benitez, D. Gall, B. Perez, e X. Rojas. 2004. «Enzyme immunoassay for the diagnosis of brucellosis: Chimeric Protein A-Protein G as a common enzyme labeled detection reagent for sera for different animal species». *Veterinary Microbiology* 101(2):123–29.
- OIE. 2008. *OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees)*. Vol. 1.
- OIE - World Organizations for Anima health. 2018. «Brucellosis (*Brucella abortus*, *B. mellitensis* and *B. suis*) (infection with *B. abortus*, *B. mellitensis* and *B. suis*)». *OIE Terrestrial Manual* (chapter 3.1.4):355–98.
- Oliveira, Sergio C., e Gary A. Splitter. 1995. «CD8+ Type 1 CD44hi CD45 RBlo T lymphocytes control intracellular *Brucella abortus* infection as demonstrated in major histocompatibility complex class I- and class II-deficient mice». *European Journal of Immunology* 25(9):2551–57.
- Olsen, S C. 2000. «Imune responses and efficacy after administration of a Commercial *Brucella abortus* Strain RB51 Vaccine to Cattle». *Veterinary Therapeutics* 1(3):183–91.
- Olsen, S. C. 2000. «Responses of adult cattle to vaccination with a reduced dose of *Brucella abortus* strain RB51». *Research in Veterinary Science* 69(2):135–40.
- Olsen, S. C., B. Bricker, M. V. Palmer, A. E. Jensen, e N. F. Cheville. 1999. «Responses of cattle to two dosages of *Brucella abortus* strain RB51: Serology, clearance and efficacy». *Research in Veterinary Science* 66(2):101–5.
- Olsen, S. C., M. G. Stevens, N. F. Cheville, e G. Schurig. 1997. «Experimental use of a dot-blot assay to measure serologic responses of cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain RB51». *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 9(4):363–67.
- Olsen, Steven C., e W. S. Stoffregen. 2005. «Essential role of vaccines in brucellosis control and eradication programs for livestock». *Expert Review of Vaccines* 4(6):915–28.
- Pappas, Georgios, e Photini Papadimitriou. 2007. «Challenges in *Brucella* bacteraemia». *International Journal of Antimicrobial Agents* 30(SUPPL. 1):29–31.
- Pappas, Georgios, Photini Papadimitriou, Nikolaos Akritidis, Leonidas Christou, e Epameinondas V Tsianos. 2006. «The new global map of human brucellosis Georgios». 6(February):91–99.
- Payne, J. M. 1959. «The pathogenesis of experimental brucellosis in the pregnant cow». *The Journal of pathology and bacteriology* 78:447–63.
- Pepper, Ian L., Christopher Y. Choi, e Charles P. Gerba. 2009. *Microorganisms and Bioterrorism*. Second Edi. Elsevier Inc.
- Pérez, José, Manuel Quezada, Juana López, Olga Casquet, Miguel A. Sierra, e Juana Martín De Las Mulas. 1998. «Immunohistochemical detection of *Brucella abortus* antigens in tissues from aborted bovine fetuses using a commercially available polyclonal antibody». *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 10(1):17–21.
- Pizarro-Cerdá, Javier, Edgardo Moreno, Veronique Sanguedolce, Jean Louis Mege, e Jean Pierre Gorvel. 1998. «Virulent *Brucella abortus* prevents lysosome fusion and is distributed within autophagosome-like compartments». *Infection and Immunity* 66(5):2387–92.

- Poester, F. P., L. E. Samartino, e R. I. Santos. 2013. «Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in livestock». *OIE Revue Scientifique et Technique* 32(1):105–15.
- Poester, Fernando P., Vítor S. P. Gonçalves, Tatiane A. Paixão, Renato L. Santos, Steven C. Olsen, Gerhardt G. Schurig, e Andrey P. Lage. 2006. «Efficacy of strain RB51 vaccine in heifers against experimental brucellosis». *Vaccine* 24(25):5327–34.
- Porte, Françoise, Jean Pierre Liautard, e Stephan Köhler. 1999. «Early acidification of phagosomes containing *Brucella suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages». *Infection and Immunity* 67(8):4041–47.
- Pouillot, R., B. Garin-Bastuji, G. Gerbier, Y. Coche, C. Cau, B. Dufour, e F. Moutou. 1997. «The Brucellin skin test as a tool to discriminate false positive serological reactions in bovine brucellosis». *Veterinary Research* 28(4):365–74.
- Praud, Anne, Olivier Gimenez, Gina Zanella, Barbara Dufour, Nathalie Pozzi, Valérie Antras, Laurence Meyer, e Bruno Garin-Bastuji. 2012. «Estimation of sensitivity and specificity of five serological tests for the diagnosis of porcine brucellosis». *Preventive Veterinary Medicine* 104(1–2):94–100.
- Rhyan, Jack C. 2014. «Brucellosis in Terrestrial Wildlife and Marine Mammals». Pp. 161–84 em *Emerging Diseases of Animals*. American Society of Microbiology.
- Rhyan, Jack C., Sam D. Holland, Thomas Gidlewski, Dennis A. Saari, Allen E. Jensen, Darla R. Ewalt, Steve G. Hennager, Steven C. Olsen, e Norman F. Cheville. 1997. «Seminal vesiculitis and orchitis caused by *Brucella abortus* biovar 1 in young bison bulls from South Dakota». *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 9(4):368–74.
- Saavedra, Maria José, Andressa Ballem, Cristina Queiroga, e Conceição Fernandes. 2019. «Etiology: The Genus *Brucella*». *brucellosis in Goats and sheep* (195):24–29.
- Saavedra, Maria José, Conceição Fernandes, e Cristina Queiroga. 2019. «Laboratory Diagnosis of Brucellosis». em *Brucellosis in Goats and Sheep*.
- Saegerman, C., L. De Waele, D. Gilson, J. Godfroid, P. Thiange, P. Michel, B. Limbourg, T. K. O. Vo, J. Limet, J. J. Letesson, e D. Berkvens. 2004. «Evaluation of three serum i-ELISAs using monoclonal antibodies and protein G as peroxidase conjugate for the diagnosis of bovine brucellosis». *Veterinary Microbiology* 100(1–2):91–105.
- Salmakov, K. M., A. M. Fomin, E. M. Plotnikova, G. M. Safina, G. M. Galimova, A. V. Salmakova, A. V. Ivanov, A. N. Panin, O. D. Sklyarov, K. V. Shumilov, e A. I. Klimanov. 2010. «Comparative study of the immunobiological properties of live brucellosis vaccines». *Vaccine* 28(SUPPL. 5):F35–40.
- Samartino, L. E., M. Fort, R. Gregoret, e G. G. Schurig. 2000. «Use of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 in pregnant cows after calfhood vaccination with strain 19 in Argentina». *Preventive Veterinary Medicine* 45(3–4):193–99.
- Samartino, L. E., R. E. Truax, e F. M. Enright. 1994. «Invasion and Replication of *Brucella abortus* in Three». *Journal of Veterinary Medicine B*. 41:229–36.
- Samartino, Luis E., e Fred M. Enright. 1996. «*Brucella abortus* Differs in the multiplication within bovine chorioallantoic membrane explants from early and late gestation.» *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis* 19(1):55–63.
- Santos, Renato L., e Andreas J. Bäumler. 2004. «Cell tropism of *Salmonella enterica*». *International Journal of Medical Microbiology* 294(4):225–33.
- Schurig, Gerhardt, Stephen M. Boyle, e N. Sriranganathan. 1995. «*Brucella abortus* vaccine strain RB51: a brief review». *Archivos de Medicina Veterinaria* 28(Ó x Á r t i c u l o):19–22.
- Schurig, Gerhardt G., R. Marti. Roop, T. Bagchi, S. Boyle, D. Buhrman, e N. Sriranganathan. 1991. «Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*». *Veterinary Microbiology*

- 28(2):171–88.
- Seleem, Mohamed N., Stephen M. Boyle, e Nammalwar Sriranganathan. 2009. «Brucellosis: A re-emerging zoonosis». *Veterinary Microbiology* 140(3–4):392–98.
- Smartino, Luís E., e Fred M. Enright. 1993. «Review Pathogenesis of Abortion of Bovine». *Comp. Immun. Microbiol. Infect.* 16(2):95–101.
- Smirnova, Ekaterina A., Andrey V. Vasin, Nurlan T. Sandybaev, Sergey A. Klotchenko, Marina A. Plotnikova, Olga V. Chervyakova, Abylai R. Sansyzbay, e Oleg I. Kiselev. 2013. «Current Methods of Human and Animal Brucellosis Diagnostics». *Advances in Infectious Diseases* 03(03):177–84.
- Smits, Henk L., Theresia H. Abdoel, Javier Solera, Encarnacion Clavijo, e Ramon Diaz. 2003. «Immunochromatographic Brucella-Specific Immunoglobulin M and G Lateral Flow Assays for Rapid Serodiagnosis of Human Brucellosis». *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 10(6):1141–46.
- Solera, J., M. Rodriguez-Zapata, P. Geijo, J. Largo, J. Paulino, L. Saez, E. Martinez-Alfaro, L. Sanchez, M. A. Sepulveda, M. D. Ruiz-Ribo, F. Medrano, F. Jimenez-Zorzo, A. Puras, E. Camino, P. Ferreras, A. Alamillo, M. A. Barba, A. Fernandez, e A. Fernandez-Funez. 1995. «Doxycycline-rifampin versus doxycycline-streptomycin in treatment of human brucellosis due to *Brucella melitensis*». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39(9):2061–67.
- Stevens, M. G., S. G. Hennager, S. C. Olsen, e N. F. Cheville. 1994. «Serologic responses in diagnostic tests for brucellosis in cattle vaccinated with *Brucella abortus* 19 or RB51». *Journal of Clinical Microbiology* 32(4):1065–66.
- Stevens, Mark G., Steven C. Olsen, e Norman F. Cheville. 1995. «Comparative analysis of immune responses in cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 or strain RB51». *Veterinary Immunology and Immunopathology* 44(3–4):223–35.
- Teng, Ying-Hock, Jung-Jing Teng, Samantha Chao, Hsu Chao, e Suryakant D. Waghela. 2017. «Comparison of the Rose Bengal Plate and the Complement Fixation Tests with the Tube Agglutination Test for Diagnosis of Human Brucellosis». *Open Journal of Clinical Diagnostics* 07(03):73–82.
- UE - European Union. 2017. «European Commission of Bovine and Swine Diseases».
- Vitry, Marie-Alice, Delphine Hanot Mambres, Carl De Trez, Shizuo Akira, Bernhard Ryffel, Jean-Jacques Letesson, e Eric Muraille. 2014. «Humoral Immunity and CD4 + Th1 Cells Are Both Necessary for a Fully Protective Immune Response upon Secondary Infection with *Brucella melitensis*». *The Journal of Immunology* 192(8):3740–52.
- Wang, Margaret, Nilofer Qureshi, Nancy Soeurt, e Gary Splitter. 2001. «High levels of nitric oxide production decrease early but increase late survival of *Brucella abortus* in macrophages». *Microbial Pathogenesis* 31(5):221–30.
- Wilesmith, J. W. 1978. «The persistence of *Brucella abortus* infection in calves: a retrospective study of heavily infected herds». *The Veterinary record* 103(8):149–153.
- Wright, W., e F. Smith. 1897. «On the application of the serum test to the differential diagnosis of typhoid and Malta fever.» *the Lancet* 656–59.
- Wyatt, H. V. 2005. «How Themistocles Zammit found Malta Fever (brucellosis) to be transmitted by the milk of goats». *Journal of the Royal Society of Medicine* 98(10):451–54.
- Xavier, M. N., T. A. Paixão, F. P. Poester, A. P. Lage, e R. L. Santos. 2009. «Pathological, Immunohistochemical and Bacteriological Study of Tissues and Milk of Cows and Fetuses Experimentally Infected with *Brucella abortus*». *Journal of Comparative Pathology* 140(2–3):149–57.
- Yu, Da Hai, Xi Dan Hu, e Hong Cai. 2007. «A combined DNA vaccine encoding BCSP31, SOD, and

L7/L12 confers high protection against *Brucella abortus* 2308 by inducing specific CTL responses». *DNA and Cell Biology* 26(6):435–43.

8. Anexos

8.1. Anexo I - Modelo de Inquérito epidemiológico para a Brucelose Bovina

	Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas	
BRUCELOSE BOVINA - INQUÉRITO – PARTE I Explorações Bovinas com Animais Sero-Positivos / Focos de Brucelose		
Objectivo: Caracterização da exploração, avaliação da origem da infecção e avaliação da sua possível difusão para outras explorações.		
1- Caracterização da Exploração e Assistência Veterinária		
1.1.Marca Oficial de Exploração (MOE) _____ Detentor: _____ Telefone/Telemóvel: _____ Local: _____ Localidade/Freguesia _____ Concelho: _____ OPP _____ Não aderente a OPP ☐ Geo-referenciação (facultativa): Latitude _____ Longitude _____		
1.2.Efectivo da exploração (c/base no SIRA/RED): Fêmeas Adultos _____ Fêmeas de substituição _____ Machos reprodutores _____ Engorda _____ Outros ruminantes ☐ Indique espécie(s) _____ e nº _____		
1.3.Assistência Veterinária - Medico Veterinário Executor: Nome _____ Cédula Profissional nº _____ Contacto telefónico _____		
2 – Caracterização sanitária		
2.1.Classificação Sanitária B _____ Datas e resultados de todos os rastreios dos últimos 3 anos (Anexo 1) - listagem do PISA)		
2.2.Vacinação para Brucelose: Anexo 2 - listagem do PISA Tipo de vacina utilizada: _____ Data: início ____/____/____ última vacinação ____/____/____ Jovens/Adultos: ____/____ Taxa de cobertura: ____% / ____%		
2.3.Abortos: Ocorrência de abortos ☐ Meses da gestação: _____ Nº de abortos nos últimos 12 meses _____ Recolha e envio para análise laboratorial ☐ Data(s) de colheita _____ Número abortos enviados _____ Outras patologias que causem abortos diagnosticadas na exploração ☐ Caracterização e datas: _____		
2.4.Problemas de fertilidade das fêmeas reprodutoras ou de mortalidade neonatal ☐ Caracterização e datas: _____		
2.5. Observações: _____ _____ _____		
LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TELEF. 21 323 95 00 FAX. 21 346 35 18 1 MOD 794/DGV		



3- Origem e difusão da Infecção (*dados dos últimos 12 meses)

3.1. Contactos directos com ruminantes de outras explorações* ☐

Caracterização das explorações: Ovinos e Caprinos ☐ Bovinos ☐
Data(s) _____ MOE(s): _____ Classificação(ões) sanitária(s): _____
Tempo de contacto: acidental ☐ pouco frequente ☐ frequente ☐
vedações ☐ transumância ☐ pastos comuns ☐ caminhos partilhados ☐
Animais silváticos: ☐ Espécie(s) _____

3.2. Contacto com explorações de ruminantes do mesmo proprietário ☐

MOE (s) _____ (**Anexo 3**) - listagem do PISA/SNIRA com dados sobre espécies de animais, exploração (ões) – espécie(s), nº animais, localização)

3.3. Introdução de animais * ☐

Explorações ☐ MOE(s) _____ Centros de Agrupamento ☐ MOE(s) _____
Empréstimo ☐ tempo de permanência _____
Nº animais, idades, MOE de origem, classificação sanitária (**Anexo 4**) - listagem SNIRA)

3.4. Identificação do Transportador habitual _____

3.5. Testes de pré-movimentação de animais introduzidos * ☐ (**Anexo 5**) – resultados

Resultados _____ Data(s) colheita _____ Data(s) de análise _____

3.6. Utilização de macho(s) reprodutor(es) * ☐

Própria exploração ☐ Exterior à exploração ☐ I.A. ☐
MOE(s) de Origem _____ Classificação(ões) sanitária(s) B _____

3.7. Partilha de equipamentos/ alfaia com outras explorações * ☐

MOE(s) de Origem _____ Classificação(ões) sanitária(s) B _____

3.8. Casos de Brucelose nos últimos 5 anos ☐ (Se sim, **Anexo 6**) – listagem do PISA)

3.9. História prévia de Brucelose na Exploração

3.10. Opiniões do proprietário sobre a origem provável da doença

Introdução de animais ☐ Vizinhança ☐ Re-ocorrência ☐
Transumância /mistura de animais/pastagens comuns ☐ Outras causas ☐ _____

3.11. Opiniões do veterinário executor sobre a origem provável da doença

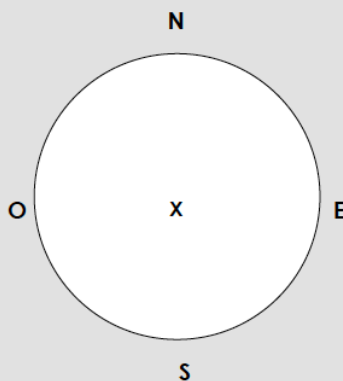
Introdução de animais ☐ Vizinhança ☐ Re-ocorrência ☐
Transumância/mistura de animais/pastagens comuns ☐ Outras causas ☐ _____

3.12. Saída de animais da exploração * ☐

Caracterização das explorações de destino: Ovinos e Caprinos ☐ Bovinos ☐
MOE(s): _____ Classificação(ões) sanitária(s): _____
Centros de agrupamento ☐ Saída de produtos / estrume da exploração ☐



3.13. Esquema das explorações confinantes geograficamente, MOE e classificações sanitárias das explorações envolventes



3.14. Observações

3.15. Provável origem da infecção:

.....
Data / /

Relator _____

Informações prestadas pelo detentor da exploração ☐

Se não, identificar função/ grau parentesco



BRUCELOSE BOVINA - INQUÉRITO – PARTE II
Explorações Bovinas com Animais Sero-Positivos / Focos de Brucelose

Objectivo: Informações que permitem avaliar a difusão da doença na exploração e programar estratégias de controlo para redução da sua difusão na própria exploração e para outras.

1. Caracterização da exploração e do sistema produtivo

1.1.Aptidão Produtiva

Leite ☐ Carne ☐ Outra ☐ _____
Intensivo ☐ semi-intensivo ☐ extensivo ☐

1.2.Regime da exploração

Estabulação ☐ Pastoreio ☐ Misto ☐ % Pastoreio _____

Animais por hectare _____

1.3.Pratica transumância /pastoreio comum ☐ Caracterize _____

1.4.Finalidade produtiva dos animais adquiridos

Reprodução ☐ Produção leite/carne ☐ Engorda ☐ Outras ☐ _____

1.5.Reposição do efectivo reprodutor (fêmeas):

Auto-reposição ☐ Compra no exterior ☐ Gestantes ☐

1.6.Avaliação dos possíveis pontos de contacto com animais de outras explorações
(em todo o perímetro da exploração):

1.7.Condições para isolamento dos animais ☐

1.8.Partos:

Sazonais ☐ Cuidados na assistência aos partos ☐
Isolamento das fêmeas ☐ Destino das secundinas/abortos: _____

1.9.Maneio em Grupos Produtivos ☐ Etários ☐

1.10.Higiene da exploração

Limpeza e desinfecção ☐ Periodicidade _____ Destino do estrume? _____

Apreciação das condições de higiene da exploração: Boas ☐ Suficientes ☐ Más ☐

1.11.Cães

Colheita sangue ☐ Resultado _____ tratamento _____

1.12.Zoonose

Brucelose Humana ☐ Venda de produtos e processamento ☐ _____

1.13.Recomendações de medidas de controlo:



BRUCELOSE BOVINA - INQUÉRITO – PARTE III
Explorações Bovinas com Animais Sero-Positivos / Focos de Brucelose

1. Explorações epidemiologicamente ligadas

1.1. Dados das explorações / Número de animais / Classificação sanitária

MOE _____
MOE _____
MOE _____

1.2. Caracterização das explorações

MOE _____
MOE _____
MOE _____

1.3. Ocorrência de abortos

MOE _____
MOE _____
MOE _____

1.4. Resultados Laboratoriais (Serologia positiva/ Isolamento/ Biovar)

MOE _____
MOE _____
MOE _____

1.5. Observações



ANEXOS

Anexo 1 □

Listagem do PISA c/ datas e resultados de todos os rastreios dos últimos 3 anos

Anexo 2 □

Listagem de todos os animais vacinados na exploração

Anexo 3 □

Listagem do PISA/SNIRA com dados sobre espécies animais, nº animais, localização de explorações de ruminantes do mesmo proprietário

Anexo 4 □

Listagem dos dados dos animais introduzidos na exploração nos últimos 12 meses (número, idades), com identificação da MOE de origem e respectiva classificação sanitária)

Anexo 5 □

Listagem dos testes de pré-movimentação de animais introduzidos nos últimos 12 meses ou cópia dos boletins de análise com o respectivo resultado

Anexo 6 □

Listagem do histórico das classificações sanitárias dos últimos 5 anos

8.2. Anexo II - Plano individual de Saneamento

 GOVERNO DE PORTUGAL
MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PESCAÇÃO E DESENVOLVIMENTO RURAL



DIRECÇÃO DE SERVIÇOS DE ALIMENTAÇÃO E VETERINÁRIA REGIÃO ALENTEJO

PIS

N.º 1/DSAVRA/2019

PLANO INDIVIDUAL DE SANEAMENTO CELEBRADO ENTRE A DIRECÇÃO DE SERVIÇOS VETERINÁRIOS DA REGIÃO DO ALENTEJO, O MÉDICO VETERINÁRIO COORDENADOR DO OPP DE _____, DR. _____, O MÉDICO VETERINÁRIO EXECUTOR, DR. _____ E O PRODUTOR/GERENTE _____

Neste protocolo será estabelecido as medidas a desenvolver no sentido de controlar a infecção brucélica nos bovinos desta unidade epidemiológica, prevenir a infecção de outros efectivos bem como evitar a sua reintrodução após a erradicação.

Entende-se por unidade epidemiológica (UE) a exploração denominada _____, situada no concelho de _____, com o número oficial _____

A – Introdução

A actual situação sanitária do efectivo de bovinos pertencentes a _____, localizado no Concelho de _____ da área da _____, devido à sua dimensão e condições de manejo, requer uma estratégia própria no combate à brucelose bovina, pelo que urge tomar as medidas descritas neste PIS.

Atendendo ao seguinte:

- Explora cerca de **231** bovinos numa área de **386,55** hectares com a finalidade de produção
- Não obstante se terem implementado as medidas de profilaxia e de polícia sanitária consideradas adequadas não se verificou melhoria da classificação sanitária nas explorações desta UE, tendo inclusive sido isolada *Brucella abortus* em material proveniente de abates sanitários efectuados.
- A situação epidemiológica que se verifica nesta UE é diferenciada da verificada na Região onde está inserida, constituindo risco epidemiológico para esta.
- Os bovinos encontram-se numa UE de alto risco de infecção, pretendendo-se aumentar a imunidade dos mesmos através da implementação de um programa de controlo e erradicação, incluindo a vacinação com RB-51.
- Face à ineficácia já demonstrada pelos meios de controlo aplicados, conhecidas as potencialidades da vacinação e uma vez que a decisão da Comissão 2002/598/CE de 15 de _____

1

DIRECÇÃO DE SERVIÇOS DE ALIMENTAÇÃO E VETERINÁRIA REGIÃO ALENTEJO

Julho aprova a vacina viva da estirpe RB 51 para animais em risco de infecção com *Brucella abortus*, no âmbito da Directiva 64/432/CEE do Conselho, considera-se recomendável adoptar nesta data a vacinação nos moldes que abaixo se propõem.

- O elevado risco de transmissão da doença, deve ser tido em conta, pelo que se propõe a vacinação de todos os bovinos reprodutores do sexo feminino com mais de 4 meses de idade, existentes nas explorações da UE, com o objectivo final de atingir a erradicação da *Brucella abortus* nesta UE, no menor espaço de tempo.

Face ao exposto e após avaliação epidemiológica da situação, é elaborado este PIS, pelo qual os intervenientes se obrigam a:

B – A Direcção de Serviços de Alimentação e Veterinária Região do Alentejo (DSAVRA) assume, pelo presente, e sem prejuízo das competências legais, os seguintes compromissos:

- Disponibilizar os meios humanos e materiais necessários ao acompanhamento e avaliação local da execução do programa de vacinação.
- Velar pelo cumprimento da condição de que a vacina só será aplicada por um médico veterinário autorizado para o efeito, no âmbito do programa de erradicação apresentado, através da realização de acções de acompanhamento da vacinação.
- Decidir na sequência da evolução da situação epidemiológica nas diferentes explorações da UE a revacinação das fêmeas adultas, passados 6 a 12 meses.
- Velar pelo acompanhamento das condições de armazenamento, distribuição, aplicação e destruição da vacina RB-51 não utilizada após a sua reconstituição, através da elaboração de relatórios trimestrais.
- Controlar o isolamento dos animais seropositivos até 30 dias após a notificação do produtor e proceder ao seu abate sanitário decorrido um período mínimo de 4 semanas após a inoculação da vacina.
- Assegurar o acompanhamento e a realização dos abates sanitários dos animais considerados seropositivos à brucelose, de acordo com o constante no Decreto-lei 244/2000 de 27 de Setembro.
- Controlar a entrada de animais na UE, através da emissão de documentos sanitários.
- Velar para que os animais da UE apenas possam ser movimentados com destino a abate imediato.

DIRECÇÃO DE SERVIÇOS DE ALIMENTAÇÃO E VETERINÁRIA REGIÃO ALENTEJO

- Controlar a obrigatoriedade, a assumir pelo detentor, de que os animais adquiridos sejam provenientes de explorações com estatuto sanitário oficialmente indemne de brucelose, tuberculose e leucose enzoótica bovina, sendo colocados em quarentena e submetidos a controlo sorológico e vacinação à entrada da exploração, mantendo-se a mesma até conhecimento dos resultados da prova da intradermotuberculinização e serológicos negativos.
- Efectuar a investigação epidemiológica (elaboração de inquéritos epidemiológicos) e laboratorial de todos os abortos notificados pelo produtor.
- Reforçar a implementação das medidas de polícia e profilaxia sanitária, na UE em causa.
- Criar e manter permanentemente actualizada uma base de dados informática específica para avaliação da implementação do programa de vacinação.
- Promover a elaboração de relatórios de progresso trimestral de acompanhamento com vista a discussão e controlo e comunicar qualquer anomalia detectada durante a vigência do programa de vacinação.
- Desenvolver acções de informação e divulgação junto dos tratadores dos animais.
- Informar a Direcção Regional de Saúde sobre a realização do programa de vacinação com RB-51, atendendo à sua resistência à rifampicina e à penicilina.

C – Os Médicos Veterinários Coordenador e Executor da OPP de _____, assumem no âmbito do presente protocolo e sem prejuízo das suas atribuições, o seguinte compromisso:

- Enviar à DSAVRA a programação das actividades anuais e a publicitação da realização semanal, com uma antecedência mínima de quinze (15) dias.
- Efectuar as colheitas de sangue regulares, de acordo com o constante no Manual de Procedimentos para a Classificação Sanitária dos Efectivos.
- Efectuar a colheita de sangue e a vacinação a todos os bovinos do sexo feminino com mais de 4 meses de idade e a recolha de sangue aos machos reprodutores, existentes na UE.
- Aplicar a dose vacinal de 2ml (correspondente a 10 a 34 x10⁹ UFC de microorganismos da estirpe (RB-51) por via subcutânea, na tábua do pescoço, independentemente do estado fisiológico de gestação em que as fêmeas se encontrem.
- Não vacinar os machos.
- No primeiro ano de implementação do PIS, revacinar todas as fêmeas jovens vacinadas com RB-51 entre os 4 e os 12 meses de idade, 6 a 12 meses depois da primo vacinação. Esta acção, deve, idealmente, ser efectuada 2 a 3 semanas antes da cobrição.

DIRECÇÃO DE SERVIÇOS DE ALIMENTAÇÃO E VETERINÁRIA REGIÃO ALENTEJO

- Assumir o compromisso de acompanhar e assegurar que todas as fêmeas bovinas adquiridas para repovoamento dos efectivos, provenientes de explorações com estatuto sanitário oficialmente indemne de brucelose, tuberculose e leucose enzoótica bovina, serão colocadas em quarentena e submetidos a controlo sorológico e vacinação à entrada da exploração. A quarentena manter-se-á até conhecimento dos resultados das provas de diagnóstico.
- Dependendo da evolução da situação epidemiológica na UE, poderá ser decidida a revacinação das fêmeas adultas, passados 6 a 12 meses.
- Após a primo vacinação de todo o efectivo, a qual deve ser efectuada em tempo útil, não podendo ultrapassar os 6 meses, e até determinação da DGAV, a OPP vacinará, anualmente, com uma única aplicação de vacina, todas as fêmeas jovens de substituição nascidas na UE, com idades compreendidas entre os 4 e os 12 meses.
- Devem ser escrupulosamente respeitados todos os cuidados com a refrigeração da vacina (entre os 2 e os 7 ° C.), assim como com a sua reconstituição. Após reconstituição (mistura do liofilizado da vacina com o solvente) a vacina deve ser aplicada dentro das 3 horas seguintes. Devem ser respeitadas todas as condições de assepsia durante a reconstituição e aplicação da vacina. Devem ainda ser tomadas todas as medidas referentes à eliminação pelos métodos apropriados, (através da utilização de contentores "PDF", para incineração obrigatória) de frascos e de todo o material utilizado durante a vacinação, nomeadamente seringas ou agulhas descartáveis.
- Criar todas as medidas de biossegurança durante a aplicação da vacina.
- Efectuar o registo minucioso referente à entrada, armazenamento, saída e destruição da vacina RB 51, de modo a permitir verificar o controlo deste processo pelos SVR.
- Efectuar o registo da vacinação e averbamento da data, em cada passaporte de bovino.
- Proceder ao registo individual da vacinação no PISA.
- Compromete-se o médico veterinário executor, após a vacinação de cada efectivo, a apresentar ao médico veterinário coordenador, um relatório técnico pormenorizado sobre o cumprimento do PIS, o qual será enviado de imediato aos SVR.
- Efectuar a identificação de todos os animais nascidos na UE, de acordo com as normas em vigor.
- Diligenciar o envio de material dos abortos, para exame laboratorial.
- Reforçar a implementação das medidas de profilaxia sanitária na UE, comunicando à DSVRA qualquer anomalia detectada, aquando da realização dos saneamentos.

DIRECÇÃO DE SERVIÇOS DE ALIMENTAÇÃO E VETERINÁRIA REGIÃO ALENTEJO

- Diligenciar todos os esforços no sentido de aumentar a sensibilização dos tratadores de animais, contribuindo para a divulgação e informação dos mesmos.

D – O detentor assume através do presente Protocolo e sem prejuízo das obrigações que legalmente lhe incumbem enquanto detentor de bovinos, os seguintes compromissos:

- Diligenciar todas as condições de manejo ou outras que permitam poder efectuar a vacinação, no tempo e forma determinados, de modo a atingir os objectivos propostos.
- Garantir as condições de isolamento dos efectivos, no sentido de impedir que se verifique qualquer contacto com outros animais ou partilha de áreas forrageiras com outros efectivos.
- Tomar conhecimento da recomendação de evitar a cobrição de qualquer fêmea durante as 14 semanas posteriores à vacinação.
- Notificar o médico veterinário executor de todos os abortos verificados, diligenciando o seu envio para o laboratório e sempre que possível isolar os animais até à confirmação da doença.
- Providenciar a destruição ou enterramento de materiais de parto ou aborto não enviados para o laboratório.
- Solicitar autorização prévia à DSAVRA para a entrada de animais na UE.
- Repovoar, sempre que possível, com fêmeas jovens provenientes da própria exploração.
- A adquirir animais, estes deverão ser, obrigatoriamente, provenientes de explorações com estatuto sanitário oficialmente indemne de brucelose, tuberculose e leucose enzoótica bovina. Estes animais ficarão em quarentena em local apropriado, onde serão submetidos a provas de diagnóstico e vacinação. A situação de quarentena manter-se-á até conhecimento dos resultados das provas de diagnóstico.
- Os animais vacinados que apresentem reacção serológica positiva devem ser imediatamente isolados após a notificação, aguardando o abate sanitário e cumprindo sempre um período mínimo de 4 semanas após a inoculação da vacina.
- A não introduzir animais na UE durante o período de tempo que durar a primeira vacinação dos animais existentes.
- A garantir a formação dos tratadores de animais.
- A proceder sempre que possível à lavoura profunda de terrenos.

DIRECÇÃO DE SERVIÇOS DE ALIMENTAÇÃO E VETERINÁRIA REGIÃO ALENTEJO

E – Medidas complementares

- O cumprimento deste PIS está ao abrigo da legislação em vigor, nomeadamente do constante no Decreto-lei 244/2000 de 27 de Setembro e alterações que venham a ser introduzidas.
- Em caso de qualquer incumprimento deste PIS, aplica-se o constante no artigo 16º do referido Diploma, bem como o disposto no Decreto-lei 338/99 de 24 de Agosto e no Decreto-lei 39 209 de 14 de Maio de 1953.
- O não cumprimento das determinações da DSAVRA fica ainda abrangido pelos artigos 281º (perigo relativo a animais) e 348º (desobediência), do Código do Processo Penal.
- Poderá a DSAVRA suspender este PIS em caso de grave infracção sanitária.

Portalegre, 18 de Junho de 2019

Direcção de Serviços Veterinários da Região do Alentejo

Médico Veterinário Coordenador da OPP

Médico Veterinário Executor da OPP

O detentor

8.3. Anexo III - Manual de apoio às estratégias de controlo da Brucelose bovina.



Ministério da
Agricultura,
do Desenvolvimento
Rural e das Pescas

Direcção de Serviços de Saúde e Protecção Animal

DGV
Direcção-Geral
de Veterinária

MANUAL DE APOIO ÀS ESTRATEGIAS DE CONTROLO DA BRUCELOSE BOVINA

NO ÂMBITO DO PROGRAMA DE
ERRADICAÇÃO DA BRUCELOSE BOVINA

DIRECÇÃO GERAL DE VETERINÁRIA
NOVEMBRO 2008
Versão 1.2

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TELEF. 21 323 95 00 FAX. 21 346 35 18

8.4. Anexo IV - Certificado da Limpeza e desinfeção de explorações após abate sanitário



REPÚBLICA
PORTUGUESA

AGRICULTURA, FLORESTAS
E DESENVOLVIMENTO RURAL



CONTROLO DA LIMPEZA E DESINFEÇÃO DE EXPLORAÇÕES APÓS ABATE SANITÁRIO

Nº PROCESSO:			
Marca de exploração		Data do abate sanitário	
1. Identificação da exploração/detentor			
Nome do produtor			
Morada da exploração			
NIF / NIPC detentor		Telef.	
2. Animais submetidos a abate sanitário			
Bovinos	☒	Ovinos	☐
Caprinos	☐	Outros,	☐
Tratou-se de despovoamento?		Sim	Não ☒
3. Desinfeção das instalações			
Instalações afetadas aos animais que foram limpas e desinfetadas			
Entidade que procedeu à limpeza e desinfeção		Data de aplicação	
4.			
Eu (produtor / representante legal), _____ declaro que as instalações foram limpas e desinfetadas de acordo com as instruções dos serviços veterinários. _____ de _____ de _____			
O Produtor _____			
5.			
Eu, _____, Médico Veterinário, atesto que (assinalar com X): executei/acompanhei (riscar o que não interessa) a desinfeção das instalações no dia _____ verifiquei o estado de limpeza das instalações no dia _____ e apresentavam adequado estado de limpeza. _____ de _____ de _____			
O Médico Veterinário _____			

NOTA: Este documento deve ser enviado/entregue nos serviços da respetiva DSAVR/DAV como evidência do cumprimento das medidas de limpeza e desinfeção determinadas no sequestro. Constitui parte integrante do processo de levantamento do sequestro à exploração.

CAMPO GRANDE, 50 - 1700-093 LISBOA TELEF. 21 323 95 00 FAX. 21 346 35 18 - DOCUMENTO DE TRABALHO - REV3

8.5. Anexo V - Relatório técnico da DGAV sobre a brucelose bovina em Portugal.



AGRICULTURA, FLORESTAS
E DESENVOLVIMENTO RURAL

RELATÓRIO TÉCNICO



Plano de Erradicação: **BRUCELOSE DOS BOVINOS**

Período Analisado: **Anual de 2017**

Estado Membro: **PORTUGAL**

Data de Emissão: **22/04/2018**

Entidade Emissora: **DIREÇÃO GERAL DE ALIMENTAÇÃO E VETERINÁRIA**

Origem dos Dados: **Unidade Orgânica - DIREÇÃO GERAL DE ALIMENTAÇÃO E VETERINÁRIA**

DADOS SOBRE EXPLORAÇÕES												
Dir. Serv. Alimentação e Veterinária da Região (DSAVR)	Nº Total / Existentes	Nº Total Abrangidas pelo Programa	Nº DE CONTROLADAS			Nº de Explorações Positivas	Nº de Novas Explorações Positivas	Nº de Explorações Despovoadas	% de Explorações Positivas Despovoadas	INDICADORES		
			1º Controlo	Sujeitas a Controlos Sequenciais	Sujeitas a Controlos Coletivos					% de Cobertura em Explorações	% de Positivas (Prevalência no Período)	% de Novas Positivas (Incidência)
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10=8/9x100	11=(10/100)	12=(7/10x100)	13=(3/10x100)
DSAVRN	19 376	16 042	16 040	4 314	894	31	31	0	0,00	99,99	0,19	0,19
DSAVRC	7 981	6 383	6 347	1 333	514	0	0	0	0,00	99,40	0,00	0,00
DSAVRLVT	2 264	1 367	1 329	353	61	1	1	0	0,00	97,22	0,08	0,08
DSAVRALT	4 726	4 464	4 371	2 056	23	16	11	0	0,00	97,92	0,37	0,23
DSAVRALG	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
TOTAIS 1	34 347	28 258	28 087	8 058	1 492	48	43	0	0,00	99,39	0,17	0,15
AÇORES	4 713	3 753	2 984	740	0	14	14	0	0,00	79,51	0,47	0,47
TOTAIS 2	39 060	32 011	31 071	8 798	1 492	62	57	0	0,00	97,06	0,20	0,18
DADOS DO ANO ANTERIOR NO PERÍODO CORRESPONDENTE												
DSAVRN	18 469	15 983	15 738	4 186	539	28	19	1	3,57	98,47	0,18	0,12
DSAVRC	7 533	5 733	5 722	1 205	489	2	2	0	0,00	99,81	0,03	0,03
DSAVRLVT	2 028	1 064	1 039	274	67	2	2	0	0,00	97,65	0,19	0,19
DSAVRALT	4 494	4 325	4 319	1 863	18	26	23	0	0,00	99,86	0,60	0,53
DSAVRALG	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
TOTAIS 1	32 524	27 105	26 818	7 528	1 113	58	46	1	1,72	98,94	0,22	0,17
AÇORES	5 001	3 959	2 946	703	1 947	7	7	0	0,00	74,41	0,24	0,24
TOTAIS 2	37 525	31 064	29 764	8 231	3 060	65	53	1	1,54	95,82	0,22	0,18

- (1) Região conforme definida no programa de erradicação aprovado para o Estado-Membro.
(2) Número total de explorações da Região, incluindo explorações elegíveis e não elegíveis para o programa.
(3) Número total de explorações da Região elegíveis para o programa (igual ou menor que (2)).
(4) Controlo significa a realização a nível da exploração, de testes no âmbito do programa para a doença em questão, a fim de manter ou melhorar o estatuto sanitário da exploração. Explorações sujeitas a pelo menos um controlo.
(5) Explorações sujeitas a pelo menos um controlo sequencial.
(6) Explorações sujeitas a pelo menos um controlo coletivo.
(7) Explorações com, pelo menos, um animal seropositivo durante o período em análise, independentemente do nº de vezes que a exploração tenha sido controlada.
(8) Explorações cujo estatuto no período anterior (ou seja, à data do dia anterior ao início do período em análise) não tinha classificação atribuída, era indeternada, oficialmente indeternada ou suspenso e com, pelo menos, um animal positivo neste período.
(9) Número de explorações sujeitas a abate total.

TOTAIS 1: Totais do Continente (DSAVRN, DSAVRC, DSAVRLVT, DSAVRLT e DSAVRALG)
TOTAIS 2: Totais Nacionais (DSAVRN, DSAVRC, DSAVRLVT, DSAVRALG e AÇORES)

Observações:

Origem dos Dados:

Unidade Orgânica - DIREÇÃO GERAL DE ALIMENTAÇÃO E VETERINÁRIA



Processado por Computador - PISA.NET - Programa Informático de Saúde Animal (Rel. Técnico) P.E. 2014/0

78DEA448-4EB2-4FF1-A7A6-A0B6E757E00C

8.6. Anexo VI - Procedimento de Referencia para colheita de amostras de Material Biológico para diagnóstico da Brucelose.



Instituto Nacional de
Investigação Agrária e Veterinária, I.P.



PROCEDIMENTO DE REFERÊNCIA PARA COLHEITA DE AMOSTRAS

MATERIAL BIOLÓGICO PARA DIAGNÓSTICO DA BRUCELOSE

AC-LNR 01 (2016-02-18)

ÍNDICE

Introdução e Advertências	2
1. OBJETIVO	3
2. ÂMBITO	3
3. REFERÊNCIAS	3
4. SIGLAS E DEFINIÇÕES	3
5. COLHEITA DE AMOSTRAS	4
5.1 Material	4
5.2 Equipamento para conservação das amostras	4
5.3 Colheita de amostras para diagnóstico serológico	4
5.3.1 Sangue	4
5.3.2 Leite	5
5.3.3 Sêmen	5
5.4 Colheita de amostras para diagnóstico bacteriológico:	5
5.4.1 Colheita após o abate ou durante a necropsia (ver anexo 1, com tabela indicativa das amostras a colher por espécie animal/género)	5
5.4.2 Leite / Colostro	6
5.4.3 Zagaratoas vaginais	6
5.4.4 Esperma	6
5.4.5 Produtos do Aborto ou Parto	7
5.4.6 Abscessos, Higromas ou Exsudados de Artrites	7
5.5 Identificação das amostras	8
5.5.1 Rotulagem das amostras de sangue/soro (serologia):	8
5.5.2 Rotulagem das amostras de leite (serologia):	9
5.5.3 Rotulagem das amostras destinadas à bacteriologia:	10
6. ENVIO DAS AMOSTRAS AO LABORATÓRIO	10
7. ANEXOS	10
ANEXO 1. Tabela indicativa das amostras a colher por espécie animal/género:	11

ALTERAÇÃO (ÕES) À ÚLTIMA VERSÃO:

Atualização da Publicação de Procedimento de Referencia entre Autoridade Competente e Laboratório Nacional de Referencia para a Brucelose.

Mod. AC-LNR/1	-Certifique-se que está a utilizar a última versão válida deste documento -	Página 1 de 11
---------------	---	----------------