

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

# **Brucelose em pequenos ruminantes: estudo das práticas de risco no concelho de Alfândega da Fé**

Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária

Carlos Renato Cardoso da Costa

**Orientador:** Professor Doutor Nuno Francisco Fonte Santa Alegria

**Co – orientador:** Doutor Hélder Miranda Pires Quintas



Vila Real, 2013



Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

# **Brucelose em pequenos ruminantes: estudo das práticas de risco no concelho de Alfândega da Fé**

Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária

Carlos Renato Cardoso da Costa

**Orientador:** Professor Doutor Nuno Francisco Fonte Santa Alegria

**Co – orientador:** Doutor Hélder Miranda Pires Quintas



Vila Real, 2013



“As doutrinas apresentados  
neste trabalho são da exclusiva  
responsabilidade do autor”



## **Agradecimentos**

A Deus pois se o trabalho é meu fruto, a sorte e as condições ótimas para realizá-lo não emanam de mim.

À Santo Expedito, padroeiro dos estudantes, santo de devoção e acompanhante fiel em tantos anos.

À família, pais e irmão, por serem uma rocha inabalável.

Ao meu orientador, Prof. Nuno Alegria e ao meu co-orientador, Dr. Hélder Quintas, pela inestimável ajuda.

Aos amigos tantos que me acompanharam nestes cinco anos de caminhada.

À todos os funcionários da ACRIGA, nomeadamente o Dr. João Reis Esteves, Dr. Jorge Façanha, Dra. Mónica Moura, Dra. Ana Margarida Afonso, Sra. Lúcia Pires e Sr. Neves.

Ao Dr. Carlos Pires e à Dra. Ana Paula Peixoto pela ajuda determinante para o começo da minha experiência profissional.

Aos senhores agricultores e funcionários de matadouro e a Sra. Patrícia Posse que se prontificaram a ajudar na busca por informações para realização deste trabalho.



## Resumo

A brucelose dos pequenos ruminantes está presente em diversos países dos continentes americano, europeu, asiático e africano. Portugal, como outros países da bacia mediterrânica, luta para erradicar a doença tendo já conseguido fazê-lo em algumas regiões.

Utilizando dados cedidos pela ACRIGA, referentes aos concelhos de Macedo de Cavaleiros, Mirandela, Alfândega da Fé, Vila Flor, Bragança e Mogadouro, caracterizou-se a região em estudo e a distribuição da brucelose pelos seus rebanhos.

Realizou-se um inquérito-piloto à 31 explorações do concelho de Alfândega da Fé de maneira a estudar as práticas de risco adotados pelos produtores. O inquérito incluí 33 práticas de risco selecionados para estudo. A análise dos resultados permitiu detetar as práticas de risco que ocorrem com maior frequência e destacar a sua presença em maior número em explorações em freguesias com brucelose em comparação com as explorações situadas em freguesias sem brucelose.

**Palavras-chave:** Brucelose, pequenos ruminantes, inquérito-piloto, práticas de risco, ACRIGA.



## Abstract

Brucellosis in small ruminants is present in several countries in Europe, Africa, Asia and America. Portugal, as other countries of the Mediterranean area, struggle to eradicate the disease, being able to do so in some regions.

Analyzing data from records provided by ACRIGA, regarding the counties of Macedo de Cavaleiros, Mirandela, Alfândega da Fé, Vila Flor, Bragança and Mogadouro, the area and the distribution of brucellosis on its hers were characterized.

A survey to 31 herds from the county of Alfândega da Fé was realized to study risk practices adopted by the cattle breeders. The survey contain 33 risk behaviors selected for this study. Analyzing the results obtained allowed to detect which risk practices are more frequent. It also shows the presence of risk practices in greater number in areas where brucellosis is present relatively to areas where it is not.

**Key words:** Brucellosis, small ruminants, survey, risk practices, ACRIGA.

## Índice Geral

<b>Índice de figuras e quadros</b> .....	xiv
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	xvi
<b>1 - Introdução</b> .....	17
<b>2 – Revisão bibliográfica</b> .....	27
2.1 - O género <i>Brucella</i> .....	27
2.2 - Resistência.....	28
2.3 - Distribuição Geográfica.....	29
2.4 - Espécies afetadas.....	30
2.5 - Transmissão.....	31
2.6 – Sensibilidade.....	33
2.6.1 - Idade.....	33
2.6.2 - Espécie e raça.....	33
2.6.3 - Fatores individuais.....	34
2.6.4 - Outros fatores.....	34
2.7 - Patogenia.....	35
2.8 - Sinais clínicos.....	37
2.9 - Diagnóstico.....	38
2.9.1 – Testes serológicos.....	38
2.9.2 - Testes bacteriológicos.....	41
2.9.3 – Outros testes.....	41
2.10 – Impacto económico.....	42
2.11 – Medidas de prevenção.....	43
2.11.1 – Maneio Preventivo.....	43
2.11.2 – Vacinação.....	45
2.11.3 – Vacinação em Portugal.....	48
2.12 – Plano Nacional de Erradicação da Brucelose (PNEB) .....	49
2.13 – Brucelose Humana.....	51
<b>3 – Material e Métodos</b> .....	53
<b>4 – Resultados</b> .....	55
<b>5 – Discussão</b> .....	65
<b>6 - Conclusão</b> .....	73

<b>Bibliografia</b> .....	75
<b>Anexos</b> .....	80

## Índice de figuras e quadros

Figura 1 – Ovelhas em pastoreio.....	17
Figura 2 – Exemplo de estábulos com fraca qualidade encontrados na região.....	18
Figura 3 - % de explorações infetadas por freguesia do concelho de Alfandega da Fé.....	24
Figura 4 - % de explorações infetadas por freguesia do concelho de Macedo de Cavaleiros. .....	25
Figura 5 - % de explorações infetadas por freguesia do concelho de Mirandela.....	26
Figura 6 - Plano para erradicação da Brucelose em rebanhos classificados como B2.1.....	80
Figura 7 - Esquema de controlo em rebanhos classificados como B3.....	81
Figura 8 - Esquema de controlo em rebanhos classificados como B3 e B4.....	81
Tabela 1 – Tipo e tamanho dos efetivos. ....	19
Tabela 2 –% de explorações infetadas por tipo de criação.....	20
Tabela 3 - % de explorações infetadas por número de animais no efetivo ovino. .....	20
Tabela 4 - % de explorações infetadas por número de animais no efetivo caprino. .....	21
Tabela 5 - % de explorações infetadas por número de animais no efetivo misto. .....	21
Tabela 6 – Classificação sanitária de rebanhos testados positivos.....	22
Tabela 7 – Número e percentagem de explorações que introduziram novos animais no último ano. ....	55
Tabela 8 – Número e percentagem de explorações que apenas adquire animais provenientes de rebanhos B3/B4. ....	55
Tabela 9 – Número e percentagem de explorações que realizam quarentena aos animais recém-adquiridos. ....	55
Tabela 10 – Número e percentagem de explorações que realizam provas serológicas aos animais recém-adquiridos. ....	56
Tabela 11 – Número e percentagem de explorações que apenas compram adultos se vacinados. ....	56
Tabela 12 – Número e percentagem de explorações segundo a frequência de lavagem e desinfecção dos estábulos. ....	57

Tabela 13 – Número e percentagem de explorações que isolam as fêmeas antes dos partos. .....	57
Tabela 14 – Número e percentagem de explorações que pratica cada tipo de procedimento após a saída da fêmea da maternidade. ....	58
Tabela 15 – Número e percentagem de explorações que isolam as fêmeas após os partos. .....	59
Tabela 16 – Número e percentagem de explorações que efetuam troca de reprodutores com outros proprietários. ....	59
Tabela 17 – Número e percentagem de explorações que isolam animais doentes ou suspeitos de doença. ....	59
Tabela 18 – Número e percentagem de explorações com fêmeas adultas não vacinadas. .....	60
Tabela 19 – Número e percentagem de explorações cujos cães têm acesso a placentas e abortos. ....	60
Tabela 20 – Origem da água de bebida dos animais. ....	60
Tabela 21 – Número e percentagem de rebanhos que partilham a zona de abeberamento com outros ruminantes. ....	61
Tabela 22 – Número e percentagem de rebanhos que partilham pastos/caminhos com outros ruminantes. ....	61
Tabela 23 – Número e percentagem de rebanhos que praticam transumância.....	61
Tabela 24 – Número e percentagem de agricultores que conhecem os sinais clínicos de brucelose. ....	62
Tabela 25 – Número e percentagem de agricultores que conhecem o impacto económico da doença. ....	62
Tabela 26 – Número e percentagem de agricultores que conhecem outras formas de prevenção para além da vacinação. ....	62
Tabela 27 – Número e percentagem de agricultores que já tiveram Febre de Malta.....	63
Gráfico 1 – Número de animais seropositivos por exploração. ....	23
Gráfico 2 – Número de partos por local de ocorrência. ....	58

## **Lista de abreviaturas, siglas, símbolos e acrónimos**

FCB – Freguesias com brucelose

FSB – Freguesias sem brucelose

RBT – Teste do Rosa de Bengala

FCT – Teste da fixação do complemento

PNEB – Plano Nacional de Erradicação da Brucelose

ACRIGA – Associação de Criadores de Gado e Agricultores

% - Percentagem

OPP – Organização de Produtores Pecuários

i.e. – isto é

## 1 - Introdução

A ACRIGA (Associação de Criadores de Gado de Macedo de Cavaleiros), sediada em Macedo de Cavaleiros, é responsável pela sanidade animal de explorações que se distribuem por seis concelhos: Macedo de Cavaleiros, Bragança, Alfândega da Fé, Vila Flor, Mogadouro e Mirandela.

Nesta região, a exemplo de outras partes da região de Trás-os-Montes, são criadas maioritariamente raças autóctones, destacando-se a serrana, entre as raças de cabras, e a badana, a churra da terra quente e a merina, entre as raças de ovelhas. Predominantemente são rebanhos de gado de corte criados em regime extensivo ou semi-extensivo, sendo as áreas de pastos propriedades dos criadores ou, mais frequentemente, terrenos públicos. O pastoreio é auxiliado pela utilização de cães que convivem intimamente com o rebanho tendo, inclusive, acesso livre à maior parte dos estábulos.



Figura 1 – Ovelhas em pastoreio

Deve-se encarar a produção na região como algo artesanal. A estrutura de estabulação resume-se, assim, basicamente, a humildes edifícios para abrigo do rebanho, dotados de manejadoras, não possuindo maternidade, fossas para recolha de excrementos ou locais para isolamento de animais doentes ou recém-adquiridos. Encontra-se desde instalações aceitáveis, ainda que modestas, à estábulos com péssimas condições para abrigo

dos animais, com fraca iluminação e ventilação e mistura do local de estabulação com o de armazenamento de alimentos e material de camas, por exemplo.



Figura 2 – Exemplo de estábulos com fraca qualidade encontrados na região

Muitos criadores não dependem da criação do gado para sobreviver, esta é apenas mais uma atividade económica em que estão envolvidos. Outros ainda apenas sustentam a atividade devido aos incentivos governamentais na forma de subsídios pois assumem não conseguir rentabilizar a produção sem esta ajuda. Há ainda os que seguem com a criação de gado apenas para ocupar o tempo, como reformados. Assim, juntando a fragilidade da estrutura do tecido produtivo à fraca capacidade financeira e vontade de muitos produtores seguir com a atividade, qualquer plano para erradicar a brucelose deve assentar em três fatores para ser bem sucedido sem comprometer a sobrevivência das explorações: propôr medidas realizáveis que sejam suportáveis financeiramente pelos produtores, ser cuidadosamente adaptado à região em que se aplica, e garantir que todos os pagamentos compensatórios e/ou de incentivo à erradicação sejam feitos atempadamente de maneira a que o agricultor não tenha de suportar a totalidade dos custos do programa.

A OPP (Organização de Produtores Pecuários) assume vários importantes papéis na região, no que diz respeito à brucelose, destacando-se a vacinação de jovens e epidemiovigilância.

A vacinação dos jovens sexualmente imaturos é realizada, regra geral, aquando da identificação dos animais para recria (com brinco e bolo reticular), com estirpe Rev-1 e por via conjuntival. A identificação é feita pelos mesmos profissionais, assegurando que não existam animais não registados, que escapem assim dos controlos serológicos anuais.

A epidemiovigilância é realizada durante cada campanha anual de sanidade animal. Os profissionais da ACRIGA recolhem amostras de sangue dos animais sexualmente maduros de todos os rebanhos que servem. Após a recolha, enviam o material para laboratório para a identificação dos animais seropositivos à brucelose. Isto permite detetar atempadamente focos de brucelose, proceder ao abate dos animais seropositivos e sequestrar as explorações não indemnes, de maneira a salvaguardar os restantes animais do rebanho e dos demais rebanhos da região. A OPP será ainda responsável por todos os controlos serológicos que uma exploração que perde a classificação B3 ou B4 tem obrigatoriamente de realizar.

Estando numa posição privilegiada de proximidade com os produtores e rebanhos, por estar na linha de frente da luta pela erradicação da brucelose, a OPP desempenha ainda a importante função de aconselhar os produtores acerca de melhorias de manejo capazes de auxiliar na prevenção da doença.

Os dados a seguir apresentados referem-se à campanha de sanidade de pequenos ruminantes, entre os dias 02/01/2012 e 03/08/2012. Estes dados foram recolhidos em Agosto de 2012 e os resultados são apresentados de modo a melhor entender a distribuição da doença na região.

Foram avaliadas 739 explorações, excetuando os efetivos com 5 ou menos animais, que não foram tidos em conta neste estudo. As explorações mistas são aquelas que contêm tanto caprinos como ovinos mesmo que só tenham um animal de espécie diferente da predominante.

Tabela 1 – Tipo e tamanho dos efetivos

Tipo de efetivo	Média de animais por efetivo
Ovino	77,4
Caprino	53,5
Misto	100

O número de animais por efetivo é bastante variável, independentemente do tipo de rebanho. Ainda assim, excetuando os rebanhos mistos, que tendem a apresentar efetivos maiores, os efetivos caprinos e ovinos são habitualmente de menor dimensão. Efetivos ovinos são constituídos, em média, por 77,4 animais, enquanto que os caprinos são, em média, menores, com 53,5 animais. Os efetivos mistos possuem, em média, um maior número de animais, em média 100.

Tabela 2 –% de explorações infetadas por tipo de criação.

Tipo exploração	Indemne (%)	Não indemne (%)
Ovino	447 (90,67%)	46 (9,39%)
Caprino	97 (93,23%)	7 (6,77%)
Misto	130 (91,55%)	12 (8,45%)
Total	674 (91,20%)	65 (8,80%)

A percentagem de explorações não indemnes é considerável, ao atingir perto de 9% do total de explorações.

Tabela 3 - % de explorações infetadas por número de animais no efetivo ovino

Número de animais por rebanho ovino	Indemne (%)	Não indemne (%)	Total
≤ 20	104 (95,41%)	5 (4,59%)	109
21-50	121(90,30%)	13 (9,70%)	134
51-80	64 (84,21%)	12 (15,79%)	76
81-110	39 (84,78%)	7 (15,21%)	46
111-150	51 (94,4%)	3 (5,56%)	54
151-199	37 (90,24%)	4 (9,76%)	41
≥ 200	31 (93,93%)	2 (6,06%)	33

As tabelas 3, 4 e 5 apresentam a distribuição da doença consoante a dimensão do efetivo, em rebanhos ovinos, caprinos e mistos.

Dentre os rebanhos de ovinos indemnes à brucelose, o número médio de animais é de 77,4. Já nos não indemnes, a média de animais é de 75,47. Os dados mostram uma concentração de explorações não indemnes em efetivos constituídos por 51 a 110 animais.

Tabela 4 - % de explorações infetadas por número de animais no efetivo caprino

Número de animais por rebanho caprino	Indemne (%)	Não indemne (%)	Total
≤ 20	26 (100%)	0 (0%)	26
21-50	24 (92,31%)	2 (7,69%)	26
51-80	17 (85%)	3 (15%)	20
81-110	16 (94,12%)	1 (5,88%)	17
111-150	10 (90,91%)	1 (9,09%)	11
151-199	3 (100%)	0 (0%)	3
≥ 200	1 (100%)	0 (0%)	1

Os rebanhos caprinos indemnes têm, em média, 59,17 animais, enquanto não indemnes têm 68,14. Também nos rebanhos caprinos não há relação entre uma maior ocorrência de brucelose e um rebanho maior. Os dados mostram igualmente uma concentração de explorações não indemnes com efetivos constituídos por 51 a 110 animais.

Tabela 5 - Prevalência animal e % de explorações infetadas por número de animais no efetivo misto

Número de animais por rebanho misto	Indemne (%)	Não indemne (%)	Total
≤ 20	19 (100%)	0 (0%)	19
21-50	31 (93,93%)	2 (6,06%)	33
51-80	19 (100%)	0 (0%)	19
81-110	16 (94,12%)	1 (5,88%)	17
111-150	13 (76,47%)	4 (23,53%)	17
151-199	17 (80,95%)	4 (19,05%)	21
≥ 200	15 (88,24%)	2 (11,76%)	17

Dentre os rebanhos mistos, os rebanhos indemnes apresentam em média 100,41 animais, enquanto nos infetados essa média é maior, sendo de 142,67. Neste tipo de rebanhos as percentagens mais elevadas de explorações infetadas aparecem em efetivos maiores, concentrando-se principalmente em rebanhos com mais de 111 animais.

Tabela 6 – Classificação sanitária de rebanhos testados positivos

Tipo de exploração	B3	B3S; B2.1; B2.2
Ovinos	10 (21,74%)	36 (78,26%)
Caprinos	1 (14,29%)	6 (85,71%)
Mista	7 (58,33%)	5 (41,67%)
Total	18 (27,69%)	47 (72,30%)

A tabela anterior mostra a classificação sanitária das explorações onde foram detetados, na última campanha de sanidade, animais positivos. Constatase que a larga maioria (72,3%) das explorações onde existiam animais seropositivos nesta última campanha (02/01/2012 e 03/08/2012) já estavam sequestradas por conterem animais seropositivo em colheitas anteriores. Esta elevada percentagem evidencia tanto a dificuldade de uma exploração eliminar o agente e evitar novas infeções, como a lenta eficácia do método do abate seletivo implementado nas zonas endémicas de brucelose, confirmando a necessidade imperiosa da implementação de um plano profilático contra a brucelose.

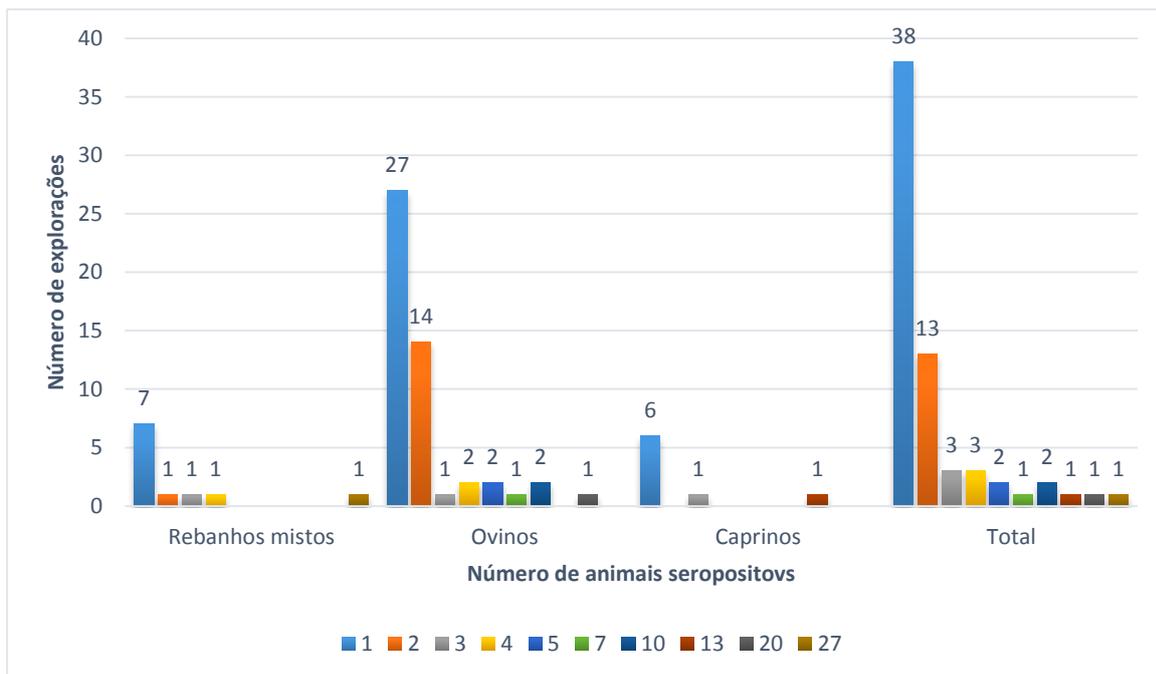


Gráfico 1 – Número de animais seropositivos por exploração

As explorações apresentam baixo número de animais seropositivos detetados. As explorações infetadas de rebanho misto que testam positivo têm, em média, 3,75 animais seropositivos. Já os rebanhos ovinos nas mesmas circunstâncias têm, em média, 2,51 animais seropositivos, enquanto os caprinos que testam positivo apresentam, em média, 2,75 animais seropositivos. Nota-se que a prevalência animal é bastante inferior à prevalência de explorações infetadas, possivelmente pelo papel da vacinação, já que esta tem como principal função prevenir infeções e diminuir a excreção do agente pelos animais infetados. Na esmagadora maioria dos rebanhos que possuem animais infetados, o número de animais seropositivos é reduzido. Dentre as 65 explorações rastreadas onde se detetaram animais seropositivos no ano de 2012, em 38 delas (58,46%) apenas um animal foi detetado positivo. Em 13 delas (20 %) dois animais eram seropositivos. Apenas em 15 delas (23,08%) três ou mais animais eram seropositivos. Tendo em conta o número médio de animais por efetivo (77,4 em rebanhos ovinos, 53,5 em rebanhos caprinos e 100 em rebanhos mistos), o número de animais seropositivos é consideravelmente baixo. Sabendo-se da obrigatoriedade da vacinação nos concelhos estudados, a vacinação parece cumprir a sua função. Porém não se poderá assegurar com absoluta certeza a total eficácia da vacina, uma vez que não sabemos se os animais seropositivos haviam ou não sido vacinados em jovens.

As figuras 1, 2 e 3 apresentam a distribuição de explorações infetadas nos concelhos de Alfândega da Fé, Macedo de Cavaleiros e Mirandela, respetivamente. Os mapas dos concelhos de Vila Flor, Bragança e Mogadouro não são apresentados devido ao pequeno número de freguesias (e explorações) servidas pela ACRIGA nestes concelhos.

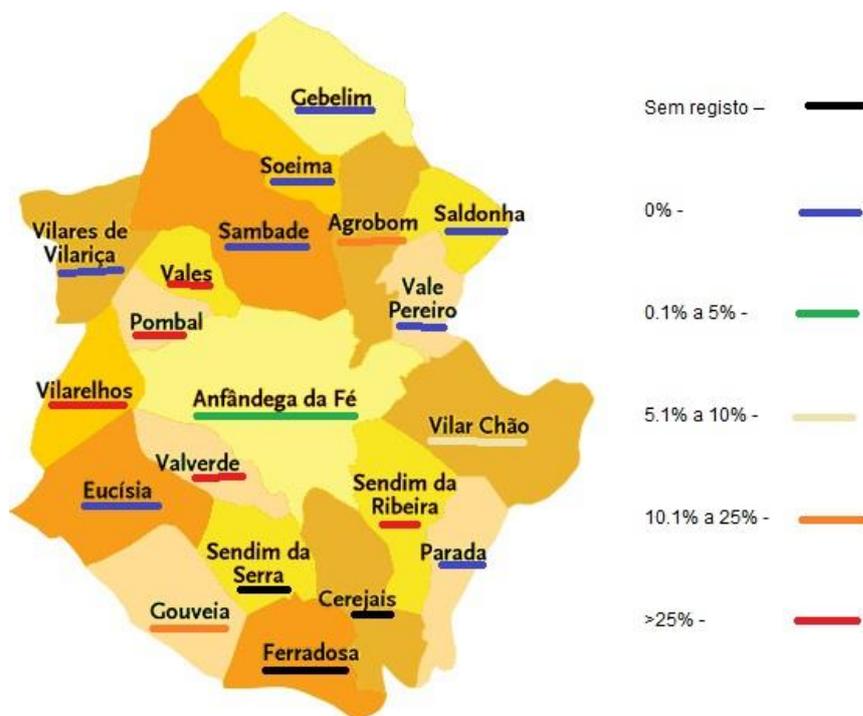


Figura 3 – % de explorações infetadas por freguesia do concelho de Alfândega da Fé

No que diz respeito à distribuição da doença por freguesias, no concelho de Alfândega da Fé nota-se que a brucelose está claramente presente num anel nas freguesias do interior do concelho (Alfândega da Fé, Vales, Pombal, Vilarelhos, Valverde, Vilar Chão e Sendim da Ribeira). A ACRIGA serve 112 explorações neste concelho, estando 54 (48%) distribuídas nestas 7 freguesias, ou em 34,9% da área total do concelho.

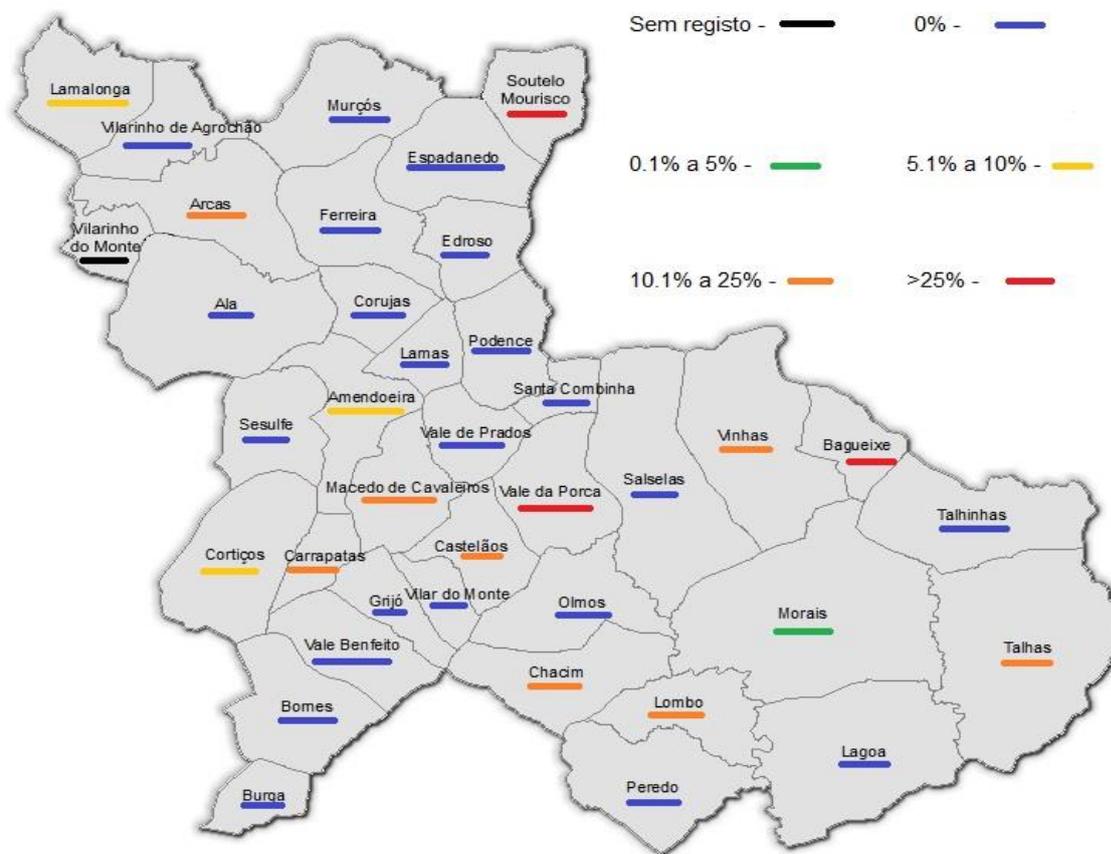


Figura 4 – % de explorações infetadas por freguesia do concelho de Macedo de Cavaleiros

Também no concelho de Macedo de Cavaleiros há claramente um centro de maior ocorrência de brucelose rodeado por um círculo de freguesias indemnes. Este centro inclui as freguesias de Macedo de Cavaleiros, Amendoeira, Vale da Porca, Castelãos, Carrapatas e Cortiços, onde residem 65 explorações (22,34% do total).

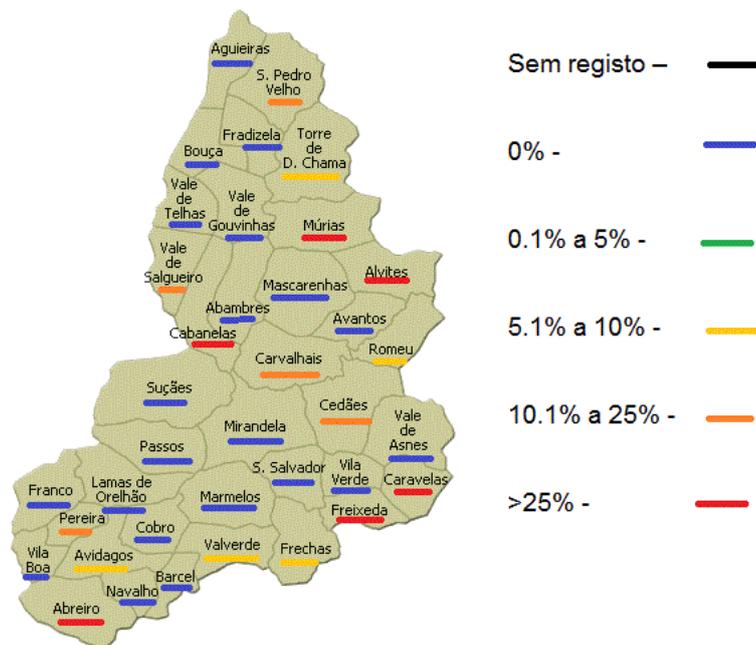


Figura 5 – % de explorações infetadas por freguesia do concelho de Mirandela

Ao contrário dos outros dois concelhos, em Mirandela as freguesias com rebanhos infetados não se concentram num núcleo, distribuem-se em linha. Nota-se uma sequência em forma de “V” desde São Pedro Velho até Vale de Salgueiro. Nestas freguesias existem 94 explorações, ou seja, 32,1% do total do concelho.

O presente trabalho tem os seguintes objetivos:

- Verificar a adequação do inquérito-piloto ao estudo dos comportamentos de risco das explorações;
- Propor melhorias ao inquérito-piloto de maneira a reparar falhas detetadas aquando da sua realização;
- Verificar quais os mais frequentes comportamentos de risco das explorações e comparar a sua ocorrência entre explorações em freguesias com e sem brucelose;

## 2.1 - O género *Brucella*

O agente *Brucella* deve seu nome a David Bruce, patologista e microbiologista escocês, que conseguiu isolar a bactéria a partir do fígado de um soldado que sofria da chamada Febre de Malta, em 1887 (Xavier *et al.*, 2009).

Apesar de só identificada séculos mais tarde, estudos indicam que a primeira *Brucella* a surgir foi a *B. ovis* e que todas as demais espécies se originaram a partir deste ancestral nos últimos 86.000 a 296.000 anos (Xavier *et al.*, 2009). Já a primeira prova que temos da existência de *Brucella* data do tempo dos antigos romanos, tendo sido encontrado um organismo que faz lembrar a atual *Brucella* em queijos carbonizados daquele período (Gul *et al.*, 2007).

*Brucella* é um cocobacilo, imóvel, curto, sem cápsula, não esporulado, gram negativo, aeróbio e intracelular facultativo (Young, 2006).

O género *Brucella* pertence, filogeneticamente, à categoria das  $\alpha$ -proteobactérias, categoria que inclui espécies de bactérias com uma ampla variedade de estilos de vida, incluindo desde simbioses a bactérias que são parasitas intracelulares obrigatórios ou agentes patogénicos extracelulares, como são exemplos *Rickettsia*, *Brucella* e *Agrobacterium* (Xavier *et al.*, 2009).

O Comité Internacional de Sistemática de Procariotas recomenda a classificação taxonómica do género fazendo constar do mesmo dez espécies: *B. ovis*, *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. microti*, *B. cetti*, *B. neotomae*, *B. pinnipedialis* e *B. inopinata* (<http://www.the-icsp.org/subcoms/Brucella.htm> - em 02/03/2013). Uma possível nova espécie de *Brucella* isolada a partir do útero de um babuíno no pós-parto ainda não foi classificada não podendo ser incluída na lista (Xavier *et al.*, 2009). Cada uma destas espécies de *Brucella* está finamente adaptada para o seu hospedeiro principal apesar de poder sobreviver em outras espécies. Estas diferentes espécies de *Brucella* variam não apenas na sua patogenicidade mas também nos sinais clínicos que originam (Nicoletti, 2010).

Os estudos taxonómicos demonstraram um elevado grau de homologia (maior do que 90%) do DNA das espécies existentes. Foi então proposto que *Brucella* passasse a ser classificada como um género monoespecífico, sendo *Brucella melitensis* a única espécie e as restantes apenas biovars, que totalizariam 18 (Garrido-Abellan *et al.*, 2001). Todavia optou-se por se manter a classificação atual principalmente por questões epidemiológicas, baseando-se, em parte, por diferentes preferências de hospedeiros das diferentes espécies. Esta classificação é suportada por estudos que demonstram que o polimorfismo genético

existente nas proteínas da membrana exterior é suficiente para permitir a diferenciação entre espécies e biovars, sustentando a atual classificação taxonómica adotada (Young, 2006).

Dentre as dez espécies existentes, 15 biovars são reconhecidos, sendo sete pertencentes à espécie *B. abortus*, três à *B. melitensis* e cinco à *B. suis* (Rodrigues, 2010). A título de maior interesse para o presente estudo, para *B. melitensis*, o biovar 3 é o mais comum na região mediterrânica, particularmente em Portugal, enquanto na América Latina o biovar 1 é mais relevante (Xavier *et al.*, 2009). Para as espécies não mencionadas, não estão caracterizados biovars apesar de comprovadamente existirem variantes dentro dessas espécies (Corbel, 1997).

*Brucella* tem um grande número de componentes antigénicos. Ainda assim, o componente que domina a resposta imunitária, sendo o principal responsável pela resposta humoral, é o lipopolissacárido (LPS), existente na membrana externa da bactéria (Garrido-Abellan *et al.*, 2001).

Destacam-se dois tipos do agente, consoante a composição do lipopolissacárido: as espécies denominadas lisas, como *B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus* e *B. neotomae* e as denominadas rugosas, como *B. canis* e *B. ovis* (Lang, 1995).

Nas espécies lisas, o lipopolissacárido compreende o lípido A, que contém dois tipos de aminoglicoses, ácidos gordos, uma região central constituída por glucose, manose e quinovosamina e uma cadeia O (tipo de polissacárido). A única diferença das espécies lisas para as rugosas é que, nestas últimas, a cadeia O do lipopolissacárido é rudimentar ou inexistente (Xavier *et al.*, 2009).

Além do lipopolissacárido, sabe-se que também as proteínas ribossomais L7 e L12 da bactéria são capazes de estimular uma resposta imunitária mediada por células. Abre-se assim uma nova possibilidade de tecnologia vacinal para o futuro, já que as vacinas existentes atualmente visam somente a imunidade despoletada pelo lipopolissacárido da bactéria (Garrido-Abellan *et al.*, 2001).

## **2.2 - Resistência**

As espécies do género *Brucella* não são particularmente resistentes, ainda que, em condições adequadas, possam sobreviver por bastante tempo no meio ambiente (Garrido-Abellan *et al.*, 2001).

As bactérias são inativadas em pouco tempo por ação da luz direta (quatro a cinco horas), se sujeita a altas temperaturas (duas a quatro horas) ou se estiverem em solo seco (quatro dias) (Garrido-Abellan *et al.*, 2001). Pelo contrário, *Brucella* spp. demonstra grande

capacidade de sobrevivência em meio aquático. Em água potável a bactéria pode sobreviver até quatro meses, enquanto em águas poluídas, a mesma sobrevive de um a cinco meses. Os solos húmidos também favorecem a persistência da bactéria que, nestas condições, pode permanecer viável até 66 dias. Caso o solo húmido se encontre numa região de baixas temperaturas, o tempo de resistência aumenta para cinco a seis meses (Rodrigues, 2010).

Em fezes contaminadas o microrganismo pode permanecer viável até quatro meses (FAO/WHO, 1986).

Relativamente aos principais produtos virulentos, o aborto e os corrimentos uterinos, admite-se que *Brucella* permaneça com capacidade infetante durante cerca de 6 meses em fetos abortados (Aune *et al.*, 2011). Em corrimentos uterinos, a bactéria permanece viável durante pelo menos 200 dias (FAO/WHO, 1986).

O microrganismo representa um perigo biológico, também pela sua possível existência em alimentos, o que reforça o seu carácter zoonótico e incrementa o risco de transmissão ao homem. A bactéria resiste no leite não tratado termicamente por 17 dias, no leite congelado por mais de dois anos, no iogurte até três meses, na manteiga até quatro meses e no queijo até seis meses (Rodrigues, 2010).

Ao contrário do perigo que os laticínios podem representar, o agente não resiste muito tempo na carne, exceto em carne congelada, onde a bactéria pode sobreviver por anos. O número de bactérias decresce rapidamente junto com o decréscimo do pH da carne após o abate (Garrido-Abellan *et al.*, 2001).

### **2.3 - Distribuição Geográfica**

A brucelose é uma doença com uma considerável importância mundial, sendo um problema continuado e de difícil solução em algumas regiões do mundo. A doença atinge a região mediterrânica, na Europa (Portugal, Espanha, Chipre, França, Itália e Grécia mais fortemente atingidos), a parte mais ocidental da Ásia, em especial a região do médio oriente, toda a África e a América Latina (Gul *et al.*, 2007). De todas as formas de brucelose, é a causada por *B. abortus*, principal agente da brucelose bovina, a de distribuição mais difundida (Corbel, 1997).

A brucelose está frequentemente presente em países em difíceis condições sócio-económicas, onde haja criação de pequenos ruminantes e onde o grau de associação corporativa dos produtores seja baixo, os serviços de saúde pública e de diagnóstico laboratorial sejam insuficientes e hajam carência de informação e infraestruturas sanitárias. Curiosamente, os países ou regiões de países que possuem estas características coincidem

com áreas onde predominam sistemas de criação extensiva de pequenos ruminantes (Corbel, 1997).

Pelo contrário, países como os Estados Unidos, Nova Zelândia, Austrália, Canadá e países do Norte da Europa são indenes de *B. melitensis* e não sofrem de brucelose animal (Blasco, 2010).

Em Portugal, a brucelose de pequenos ruminantes está presente em todo o território continental, sendo mais prevalente em Trás-os-Montes e no Algarve (Direção de Serviços de Saúde e Proteção Animal/Direção Geral de Veterinária, 2012).

## 2.4 - Espécies afetadas

A brucelose atinge uma grande variedade de espécies animais, tendo cada espécie do agente um hospedeiro preferencial. Dentre as espécies de *Brucella*, é a *B. melitensis* aquela que apresenta menor especificidade de hospedeiro (Nicoletti, 2010).

*B. abortus* é o principal agente da brucelose bovina, *B. melitensis* é o principal agente da brucelose caprina e ovina, *B. ovis* é o agente da epididimite infecciosa ovina, *B. canis* é a espécie causadora de brucelose canina e *B. suis* é o agente da brucelose suína (Xavier *et al.*, 2009).

Os estudos subsequentes identificaram novas espécies com outros hospedeiros preferenciais: *B. ceti*, tendo cetáceos como hospedeiros preferenciais, *B. pinnipedialis*, atingindo sobretudo focas, entre outros mamíferos marinhos, *B. microti*, cujo hospedeiro principal são roedores, principalmente ratos, de onde foram isoladas, *B. inopinata*, sendo uma espécie absolutamente diferente das demais, já que foi isolada de um implante mamário infetado de uma paciente humana que mostrava sinais clínicos de brucelose e *B. neotomae* também afetando roedores, particularmente o rato do deserto (*Neotoma lepida*) (Xavier *et al.*, 2009).

A identificação de *Brucella* com um determinado hospedeiro presume-se ser devida a uma diferença em um “cluster” de genes que varia entre as diferentes espécies do agente (Xavier *et al.*, 2009). Ainda assim, as diferentes espécies de *Brucella* tendem a não se limitar a infetar unicamente o seu respetivo hospedeiro preferencial.

Excetuando-se o gato, praticamente todas as espécies animais domésticas podem ser infetadas pela bactéria. Além de animais domésticos, uma série de animais silváticos podem também ser atingidos. Deste modo, a lista de hospedeiros inclui também bisontes, búfalos, camelos, renas e iaques (Corbel, 2006). Determinadas espécies silváticas atuam como reservatórios da doença, como javalis, porcos selvagens, lebres, veados e raposas (Godfroid

*et al.*, 2005). Curiosamente, a segunda maior prevalência já registada de brucelose foi num efetivo de mulas no Egito (Corbel, 1997).

## 2.5 – Transmissão

O animal infetado excreta a bactéria por diversas vias, contaminando o meio ambiente, o que constitui um risco para todo o rebanho.

As principais fontes de contaminação do ambiente e de elevada importância epidemiológica são os fetos abortados, os corrimentos uterinos e os restos placentários que levam a que o agente atinja a água e a pastagem (Maurin, 2005). Os supracitados são os principais produtos virulentos devido ao grande número de bactérias expulsas, já que usualmente é necessária uma exposição maciça ao agente patogénico para infetar um hospedeiro suscetível. Por este mesmo motivo, apesar de a bactéria estar presente nos corrimentos vaginais de um animal não gestante, não é expectável que este constitua uma grande ameaça para o restante rebanho (Radostits *et al.*, 2001).

As cabras excretam a bactéria nos corrimentos vaginais, no período após o aborto ou parto, durante cerca de três meses. As ovelhas habitualmente eliminam bactérias durante menos tempo, até cerca de três semanas após o parto ou aborto (Garrido-Abellan *et al.*, 2001).

O leite e o colostro também são produtos virulentos e constituem importantes fontes de infeção, ainda que a carga bacteriana aqui presente não seja tão elevada quanto nos produtos virulentos anteriormente referidos. Em cabras, a excreção de bactérias no leite, após migração e colonização da glândula mamária, ocorre durante todo o período de aleitamento e, comumente, também na próxima lactação. Já em ovelhas, a eliminação de *Brucella* no leite tende a ficar-se por um período mais curto, habitualmente não maior do que dois meses. Ocorre, contudo, em ovelhas, o prolongamento da excreção por até 140 ou 180 dias. A ingestão do leite e do colostro é o grande perigo para a infeção de jovens que são particularmente resistentes à brucelose. Conclui-se objetivamente que, na eventualidade de um animal jovem aparecer infetado, a probabilidade da infeção ter ocorrido através do leite é elevada (Garrido-Abellan *et al.*, 2001).

O sémen de machos infetados é igualmente um produto virulento e a bactéria poderá estar presente no sémen durante toda a sua vida, especialmente em bodes (Iowa State University, 2007). Todavia a transmissão venérea não é um grande perigo em pequenos ruminantes, tendo maior importância epidemiológica na infeção por *B. suis* (Robinson, 2003). A bactéria está presente no sémen de bodes e carneiros apresentando todavia um diminuto risco de causar infeção ao recorrer-se à monta natural (Garrido-Abellan *et al.*, 2001).

Outras possíveis vias de excreção são as fezes e urina (Maurin, 2005). A excreção de bactérias por via fecal acontece caso a infecção atinja linfonodos que drenem a região gastrointestinal, sobretudo em animais jovens (Garrido-Abellan *et al.*, 2001).

A infecção pode ocorrer por via aerógena pela inspiração de pós contendo *Brucella* em suspensão, principalmente em locais fechados (Crespo León, 1994). Todavia, a infecção ocorre principalmente por ingestão de materiais contaminados, pelo que água e pastagem contaminadas serão vias de infecção importantes (Garrido-Abellan *et al.*, 2001).

Menos habitual mas também uma porta de entrada para a bactéria são as feridas na pele. Estas áreas desprotegidas, se em contacto com materiais contaminados, possibilitam a entrada da bactéria no organismo (Iowa State University, 2007).

Por fim, existe ainda a possibilidade de transmissão transplacentária da doença. Tal modo de transmissão é raro em ovinos e caprinos e o seu mecanismo ainda desconhecido mas, uma vez acontecendo, não só a cria terá um risco elevado de desenvolver a doença quando se tornar sexualmente madura como a erradicação da *B. melitensis* será muito mais difícil, já que os animais não desenvolvem uma resposta imunitária capaz devido à sua imunotolerância à bactéria, apresentando-se como serologicamente negativos até ao primeiro parto ou aborto (Garrido-Abellan *et al.*, 2001; Grilló *et al.*, 1997).

Além da transmissão entre ruminantes, existe ainda a possibilidade dela ser transmitida por animais silváticos e cães (Garrido-Abellan *et al.*, 2001). O cão pode ter um papel importante na disseminação da doença. Beer (1981) afirma que os cães de rebanho presentes em efetivos infetados devem ser considerados infetados também. O perigo reside na evidência do cão ser capaz de ser infetado por *B. melitensis*, principalmente através da ingestão de placentas, abortos e cadáveres. Para além de vetor biológico, o cão poderá atuar como vetor mecânico da *B. melitensis*. Como vetor mecânico, o cão transporta placentas ou abortos de uma exploração para outra ou para locais de pastoreio, contaminando o ambiente. Como vetor biológico, o cão infetado excreta o agente através da urina, das fezes e, eventualmente, pelos corrimentos vaginais. Apesar de conservar a infecção por muito tempo no seu sistema retículo-endotelial, não é de considerar que constitua um risco muito grande para as populações animais, presumindo-se que o cão também não seja um reservatório muito importante. A dispersão do agente ocorrerá maioritariamente pelo seu papel de vetor mecânico (Corbel *et al.*, 2006; Ganiere, 2004).

Várias espécies de animais silváticos podem ser infetadas pelo agente, como cervídeos, bisons, camelos, alces, lebres, zebras, coelhos, ratos, raposas, lobos, hienas, doninhas, texugos, furões, lincos, coiotes, javalis, ovinos e caprinos selvagens, entre outros (Ganiere, 2004). Estes animais silváticos atuam como hospedeiros primários de alguns

biovares de *Brucella* e são os principais reservatórios de brucelose. Na verdade frequentemente as infecções de animais silváticos são consequência da existência de rebanhos infetados. Neste caso, se a brucelose não for erradicada das espécies silváticas ao mesmo tempo que o foco de brucelose nos rebanhos, a infecção poderá persistir de forma latente nos animais silváticos (Ganiere, 2004). Os animais silváticos servirão como reservatório da bactéria, albergando-a e dispersando-a com a sua movimentação errática pelos pastos da região, sendo um fator de risco para a re-infecção dos rebanhos indemnes. Outras dificuldades se colocam, como sejam a impossibilidade prática de detetar a prevalência nestes animais silváticos, bem como as questões éticas e ecológicas associadas ao seu abate.

## **2.6 - Sensibilidade**

Apesar dos pequenos ruminantes serem naturalmente mais resistentes do que outras espécies, diversos fatores influenciam a infecção, disseminação e manifestação da doença em caprinos e ovinos. A seguir listam-se os mais importantes fatores de sensibilidade à brucelose.

### **2.6.1 - Idade**

Na larga maioria dos casos, *B. melitensis* causa doença em animais sexualmente maduros. Animais jovens podem ser infetados mas não manifestam a doença e têm apenas uma resposta serológica transitória. A sensibilidade à doença aumenta com a maturidade sexual e principalmente com a gestação (Garrido-Abellan *et al*, 2001). Todavia, os animais jovens, apesar de serem frequentemente resistentes, podem ser alvo de infecções latentes, constituindo um risco para o resto do rebanho quando atingirem a maturidade sexual (Corbel *et al.*, 2006).

### **2.6.2 - Espécie e raça**

Inicialmente pensava-se que os hospedeiros principais de *B. melitensis* eram os caprinos devido à maior ocorrência de brucelose nesta espécie quando comparada com os ovinos, principalmente na América do Sul, onde ovelhas, mesmo se criadas conjuntamente com cabras não contraíam a doença. Porém a diferença de sensibilidade não estava na espécie mas principalmente nas raças, já que as raças de ovelhas criadas na América do Sul são naturalmente mais resistentes à brucelose. Tal não acontece em Portugal, uma vez que as raças de ovelhas de cauda grossa da região Mediterrânica, como a Merina ou a Churra da Terra Quente, são mais sensíveis (Garrido-Abellan *et al*, 2001).

Também raças de leite são mais sensíveis do que raças de carne, particularmente as raças ovinas que são muito sensíveis à *B. melitensis* (Corbel, 2006).

### **2.6.3 - Fatores individuais**

Aparenta ser óbvio que a sensibilidade à doença varia de animal para animal. Contudo ainda não se conseguiu mostrar quais são os fatores responsáveis por aumentar ou diminuir a vulnerabilidade do animal à brucelose (Garrido-Abellan *et al.*, 2001).

### **2.6.4 - Outros fatores de risco**

O sistema de criação influencia bastante a ocorrência de brucelose num rebanho. Um dos fatores que ajudam a explicar a elevada incidência de brucelose em ovelhas na região mediterrânica é a sua criação em rebanhos grandes, em condições que favorecem a disseminação da doença. O modo de vida gregário dos pequenos ruminantes, a partilha de áreas de pastagem e trilhos e a criação de rebanhos com elevada densidade populacional, principalmente se acomodados em espaços fechados, também tendem a aumentar a ocorrência da brucelose. Esse estilo de vida e este modo de criação facilitam a transmissão da doença entre animais, sendo frequente animais sensíveis entrarem em contato com materiais contaminados, devido à proximidade entre os animais e à grande quantidade de bactérias presentes no ambiente. Além disso, a transumância, a mistura de animais em mercados e feiras de animais, mistura de espécies no mesmo rebanho e a partilha de machos reprodutores também facilitam a transmissão entre animais e entre explorações (Corbel, 2006; Megersa *et al.*, 2011). A grande mobilidade dos rebanhos expõem-nos aos riscos do contato com outros rebanhos, animais selvagens e cães (Garrido-Albellan *et al.*, 2001; Megersa *et al.*, 2011).

A falta de higiene também é um importante fator de risco. A desinfecção de estábulos por um mínimo de três vezes ao ano contribui eficazmente para a proteção do rebanho (Domínguez *et al.*, 2000) enquanto que uma baixa frequência de remoção de estrume e limpeza dos estábulos está ligada ao aumento de seropositividade dos animais (Mainar-Jaime *et al.*, 1999).

O parto em locais fechados e sobrelotados favorece a disseminação da doença, em comparação com o parto ao ar livre (Iowa State University, 2007). Da mesma maneira, a sobrelotação dos estábulos aumenta a exposição ao agente, principalmente após o parto ou aborto (Megersa *et al.*, 2011)

Por fim, a inexistência de serviço veterinário próximo e de um plano nacional de controlo da doença dificultam o combate à doença e contribuem para o aumento da sua prevalência (Mainar-Jaime *et al.*, 1999).

## 2.7 - Patogenia

A infeção causada por *B. melitensis* em ovelhas e cabras é bastante semelhante à infeção que *B. abortus* causa em bovinos, exceto em pequenas diferenças nos tempos de colonização dos tecidos (Davis, 1990).

*Brucella* spp. são organismos intracelulares facultativos que desenvolveram mecanismos para dificultar a neutralização por parte das células fagocitárias do organismo hospedeiro. Ainda que estes mecanismos não estejam completamente claros e estudados, crê-se que a cadeia de polissacáridos O, constituinte da camada LPS das bactérias denominadas “lisas”, esteja envolvida, já que as espécies lisas são mais resistentes à fagocitose e destruição do que as espécies rugosas (Young, 2006).

A bactéria entra no hospedeiro principalmente pela membrana mucosa da orofaringe, trato respiratório ou conjuntiva ocular (Garrido-Abellan *et al.*, 2001). Após penetrar no organismo através de células da porta de entrada a resposta imunitária é desencadeada. Os neutrófilos são a primeira linha de defesa apesar de não serem realmente eficazes na destruição das bactérias. Assim, o microorganismo entra na circulação linfática e, a partir dos linfonodos, entra na corrente sanguínea, concentrando-se em locais ricos em células reticuloendoteliais, como linfonodos, baço, fígado e medula óssea, onde inicia a sua multiplicação (Castro *et al.*, 2005; Young, 2006).

Davis e colaboradores (1990), num estudo acerca da patogenia de *B. abortus*, afirmam que a bactéria atinge os linfonodos regionais adjacentes ao local da infeção experimental, a saber, suprafaríngeo, mandibular, parotídeo e atlantal, em sete dias após a exposição ao agente, com intensa proliferação de linfócitos B, neutrófilos, macrófagos e eosinófilos nestes locais. Durante a semana seguinte a bactéria atinge os linfonodos ilíaco interno, supramamário e hepático, evidenciando a rápida disseminação da bactéria pelo corpo.

O destino da bactéria será decidido pela capacidade de resposta imunitária do hospedeiro. Enquanto os neutrófilos são facilmente ultrapassados, os macrófagos e os linfócitos T são activados e há produção de anticorpos. Fatores como idade, espécie animal, estado imunitário, gestação e número de bactérias invasoras têm um papel decisivo no desfecho da luta entre o sistema imunitário e o agente (Garrido-Abellan *et al.*, 2001).

Na eventualidade da bactéria prevalecer, esta consegue atingir a corrente sanguínea. A bacteriemia é detectável em 10 a 20 dias e persiste entre um a dois meses. No caso do animal estar gestante, o útero gravídico é um alvo preferencial. O úbere também é um dos locais de predileção de *B. melitensis*, afetando-o mesmo se o animal for infetado no período pós-parto (Garrido-Abellan *et al.*, 2001).

É nesta fase da infecção que ocorrem sinais clínicos como o aborto. Outros sinais clínicos, variáveis consoante a localização das bactérias, como artrite, metrite, mamite subclínica, orquite, epididimite, também surgem nesta fase. Muitos animais, porém, tornam-se portadores assintomáticos (Garrido-Abellan *et al.*, 2001).

O estudo anteriormente citado de Davis e colaboradores (1990) atenta para o aparecimento de lesões concentradas nos linfonodos da cabeça (local de exposição experimental) e do trato reprodutivo, entre o 21º e 42º dias após exposição. Neste mesmo período de tempo o número de neutrófilos e eosinófilos decresce enquanto cada vez mais linfócitos T são recrutados. Já as lesões causadoras de aborto aparecem apenas depois do 35º dia após infecção, evidenciando-se edema e zonas focais de necrose da membrana coriônica com acúmulo de bactérias. A partir do 42º dia a bactéria atinge ainda a membrana coriônica e uma reação inflamatória subsequente nos pulmões do feto causa uma broncopneumonia purulenta.

O aborto será causado pela predileção da bactéria pelas células do trofoblasto, onde se multiplica. Esta predileção é consequência da alta concentração de hormonas esteróides e eritritol existentes durante o último terço da gestação. Nestas células a bactéria consegue multiplicar-se rapidamente, comprometendo a integridade da placenta e infetando o feto, originando o aborto ou nascimento de crias débeis. A invasão e multiplicação da bactéria induz ainda mudanças hormonais, como o aumento das concentrações de prostaglandina F<sub>2α</sub>, estrogénios e cortisol e diminuição dos níveis de progesterona, variações semelhantes às verificadas durante o parto (Xavier *et al.*, 2010).

Numa fase mais avançada da infecção, ocorre a eliminação de agentes patogénicos para o ambiente através de secreções genitais e leite, bem como uma infecção persistente das glândulas mamárias e dos linfonodos genitais e supramamários (Corbel, 2006; Blasco, 2010).

A resposta imunitária desencadeada é do tipo humoral e celular. A primeira baseia-se na produção de anticorpos direcionados principalmente contra a LPS das bactérias e desenvolve-se na primeira semana após a infecção. Esta resposta humoral é bastante variável tanto na intensidade como no tempo, podendo mesmo nunca vir a ocorrer. Geralmente ocorre um aumento acentuado na produção de anticorpos aquando da invasão do útero. Pelo contrário, a colonização do úbere não desencadeia uma elevada produção de anticorpos e a

localização isolada em poucos linfonodos desencadeia uma resposta humoral mínima ou ausente (Garrido-Abellan *et al.*, 2001).

A resposta imunitária celular é desencadeada pelos linfócitos T CD4, que participam na imunidade contra *Brucella* de duas maneiras: através da ativação dos linfócitos T CD8 e pela produção de citocinas, como o interferão- $\gamma$ , que regulam a ativação de macrófagos com atividade anti-*Brucella* (Young, 2006). A resposta celular será desencadeada nas primeiras semanas após a infecção, sendo muito variável e podendo mesmo, tal como a humoral, não ser detetada (Garrido-Abellan *et al.*, 2001).

Apesar do animal poder ficar livre da bactéria, o curso mais usual da doença será o estabelecimento de uma infecção duradoura, especialmente em cabras (Garrido-Abellan *et al.*, 2001).

Habitualmente a brucelose em pequenos ruminantes tende a cursar de maneira subaguda ou crónica, sendo bem tolerada pelos animais (Maurin, 2005).

## **2.8 - Sinais clínicos**

A brucelose é caracterizada por apresentar vários sinais clínicos inespecíficos, o que dificulta e atrasa o diagnóstico. Ambos os sexos são igualmente sensíveis (Xavier *et al.*, 2009).

Em pequenos ruminantes a exibição de sinais clínicos não é inevitável. Os adultos podem não exibir qualquer sinal clínico de brucelose, devido à elevada resistência dos animais à doença e à adaptabilidade da bactéria a esses hospedeiros (Iowa State University, 2007).

A infecção por *B. melitensis* (ou outro agente causador de brucelose em pequenos ruminantes, nomeadamente *B. abortus* e *B. suis*) afeta basicamente a reprodução e a fertilidade dos animais do rebanho. Todavia, a mortalidade causada nos animais adultos do rebanho é insignificante (Roth *et al.*, 2003).

Os sinais clínicos ocorrem apenas em machos e fêmeas adultos, sexualmente maduros. Animais jovens podem ser infetados mas não exibem sinais clínicos até atingirem a maturidade sexual e, usualmente, apenas exibem uma resposta serológica fraca e transitória (Garrido-Abellan *et al.*, 2001).

As fêmeas adultas abortam com frequência nos últimos dois meses de gestação e o aborto pode ser seguido de retenção placentária. Habitualmente os pequenos ruminantes abortam apenas na primeira gestação após a infecção e nas gestações subsequentes os cordeiros e cabritos nascem fracos ou normais (Garrido-Abellan *et al.*, 2001). A taxa de abortos num rebanho varia entre 10% a 60% (Alton, 1990). A ocorrência de abortos em série num rebanho onde nunca fora detetado animal seropositivo à brucelose e a partir do terceiro mês

de gestação acarreta maiores suspeitas de brucelose (Ganiere, 2004). Além do aborto, a fêmea pode parir crias muito fracas, mesmo na primeira gestação após a infecção. Ocorre conjuntamente uma queda na produção do leite de, no mínimo, 10%, após o parto/aborto, sem visíveis sinais de mamite, como aumento da temperatura e tumefação do úbere, dor ao toque, rubor e alteração de características físicas do leite como cor, viscosidade e odor, sendo a exibição física destes sinais muito rara (Iowa State University, 2007).

Em machos adultos destaca-se a ocorrência de orquite, epididimite e consequente infertilidade (Corbel *et al.*, 2006). A orquite manifesta-se pelo aparecimento de uma tumefação firme presente habitualmente apenas em um dos testículos, sendo também mais comum o seu aparecimento em bodes do que em carneiros (Alton, 1990).

Em ambos os sexos, *B. melitensis*, pode causar perda de peso, infertilidade e, mais raramente, depressão, por altura da fase aguda da infecção e consequente hipertermia, e artrites (Alton, 1990).

A morte de animais adultos, quando acontece, é frequentemente consequência de metrite aguda seguida de retenção placentária (Gul *et al.*, 2007).

## **2.9 - Diagnóstico**

### **2.9.1 – Testes serológicos**

Os testes serológicos são os métodos de diagnóstico mais eficientes e económicos de realizar. Baseiam-se na utilização de um teste de alta sensibilidade para analisar amostras sanguíneas de animais, visando a deteção de animais seropositivos. Seguidamente, as amostras positivas aos primeiros testes de rastreio devem ser submetidos a testes mais específicos de maneira a conseguir a confirmação do diagnóstico anterior (Corbel, 2006). A larga maioria dos testes serológicos têm em comum o fato de detetarem basicamente anticorpos produzidos contra a cadeia O da camada de LPS, principal antigénio de *Brucella* (Diaz *et al.*, 1997).

O teste de Rosa de Bengala (RBT) e o teste da fixação do complemento (CFT) são os mais utilizados para rastreio de brucelose, sendo estes dois os testes recomendados pela União Europeia para o diagnóstico de brucelose ovina e caprina e os mais aplicados e de maior relevância na serovigilância da brucelose em pequenos ruminantes (Direção de Serviços de Saúde e Proteção Animal/Direção Geral de Veterinária, 2012). Além destes, também o i-ELISA (Indirect Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) e a imunofluorescência podem ser utilizados como métodos de rastreio (Garrido-Abellan *et al.*, 2001)

Dentre as desvantagens dos testes serológicos conta-se a incapacidade de diferenciarem anticorpos vacinais de anticorpos produzidos após uma infecção natural, traduzindo-se em baixa especificidade ao testar animais vacinados, com ocorrência de resultados falso-positivos (Nicoletti, 2010). A vacinação com Rev-1 por via conjuntival diminui a especificidade dos testes serológicos (Jiménez de Bagüés *et al.*, 1992, citado por Garrido-Abellan *et al.*, 2001)

O teste do Rosa de Bengala (RBT) tem a vantagem de ser um teste barato, de fácil execução e simples (Corbel, 2006). Este teste utiliza como antigénio *B. abortus* biovar 1. Apresenta-se ainda como um teste com elevada sensibilidade, seguro e apurado (Diaz *et al.*, 1997). O RBT peca apenas pela ocorrência de reações falso-positivas, principalmente por reação cruzada com outras bactérias, frequentemente *Yersinia enterocolitica*. Por isso recomenda-se a confirmação de um resultado positivo no RBT com o CFT, cuja especificidade é maior. Ainda que o RBT seja um teste de sensibilidade suficiente para a vigilância de áreas livres de brucelose, ele deve ser combinado com o CFT para vigilância de rebanhos inseridos em áreas não indenes, de maneira a alcançar um índice de performance adequado a programas de erradicação baseados na estratégia de “teste-abate”, como Portugal (Garrido-Abellan *et al.*, 2001)

O teste da fixação do complemento (CFT) é o teste mais utilizado para confirmação de brucelose em animais, sendo consensualmente considerado um método eficiente de deteção de brucelose em pequenos ruminantes. Todavia é um método complexo, de difícil execução em amostras hemolisadas e em que pode ocorrer o fenómeno prozona, em soros com baixas diluições, e reações anti-complementares, resultando em reações positivas por fixação do complemento por outros fatores que não a presença de anticorpos anti-*Brucella* (Garrido-Abellan *et al.*, 2001).

Em Portugal, o RBT é o teste primário para deteção de animais infetados e o CFT é utilizado para confirmação, sendo estes os testes oficiais preconizados pela União Europeia para deteção de brucelose (Council Directive 91/68/EEC). Todavia, Molina e colaboradores (1994) põem em causa a eficácia desta metodologia e corrobora com outros autores a ideia de que a padronização atual dos testes supracitados não é a ideal para obter a máxima sensibilidade. A metodologia do RBT está perfeitamente desenhada para o diagnóstico de *B. abortus* em gado bovino. Contudo, ao ser aplicado em pequenos ruminantes, o teste perde sensibilidade na deteção da infecção por *B. melitensis*. Por isso também alguns antigénios comercializados para o RBT têm baixa sensibilidade e levam a que ocorram vários casos de animais de áreas endémicas obterem um resultado negativo no RBT e positivo no CFT (Garrido-Abellan *et al.*, 2001).

Novas metodologias têm surgido, como a técnica de c-ELISA (ELISA de competição), i-ELISA (ELISA indireto), ensaio da fluorescência polarizada e a técnica da contraimunoeletroforese.

As técnicas de **ELISA** têm elevada especificidade e sensibilidade, são simples de executar e encontram-se disponíveis em *kits* comerciais (Corbel, 2006). Como antigénio são utilizados extratos da camada lisa de LPS (sLPS) de *B. abortus* ou *B. melitensis*, apesar de se considerar a utilização de sLPS de *B. melitensis* mais adequada ao diagnóstico de brucelose caprina e ovina (Garrido-Abellan *et al.*, 2001). O c-Elisa tem maior especificidade e sensibilidade do que o RBT e o CFT mas tem menor sensibilidade do que o i-ELISA, recomendando-se que seja utilizado como teste complementar e não como teste único (Weynants *et al.*, 1996). Recomenda-se ainda que o teste de ELISA com extratos de sLPS apenas seja utilizado em regiões onde a incidência da doença seja baixa e onde não se faça vacinação ou esta seja realizada através da via conjuntival (Diaz *et al.*, 1997).

A **imunofluorescência** é um teste barato, facilmente executável, de maior sensibilidade e especificidade do que os já citados métodos serológicos e indicado para o diagnóstico de brucelose em regiões onde a prevalência é elevada (entre 2-4%) e onde a vacinação é realizada. É um teste muito bom em diferentes situações epidemiológicas. A especificidade e sensibilidade variam consoante a espécie animal. Poderá ser utilizado em teste seriado com o RBT, em substituição do CFT como teste de confirmação (Ramirez-Pfeiffer *et al.*, 2007). É um método de diagnóstico excelente para bovinos e suínos, não se conhecendo ainda com precisão a sua utilidade para o serodiagnóstico de brucelose ovina e caprina (Garrido-Abellan *et al.*, 2001). Tal como para o ELISA, ainda é necessário validar este método de diagnóstico para ser recomendado para o diagnóstico de brucelose de pequenos ruminantes (OIE, 2009)

A técnica da **contraimunoeletroforese** recorre a proteínas citoplasmáticas características do género *Brucella*, o que evita reações cruzadas com outras bactérias que apresentam semelhança na constituição da camada LPS, como *Yersinia enterocolitica* (Garrido-Abellan *et al.*, 2001). Também carece de mais testes para ser utilizada no diagnóstico de brucelose de pequenos ruminantes

A existência simultânea de *B. ovis* e *B. melitensis* no rebanho não é causa de reação cruzada, uma vez que o LPS liso utilizado nos antigénios para o RBT e CFT não existe em *B. ovis*. Contudo em testes como o i-ELISA é expetável a existência de reações cruzadas nesta situação.

### 2.9.2 - Testes bacteriológicos

O isolamento e identificação de *Brucella* serve como diagnóstico definitivo de brucelose, sendo útil para estudos epidemiológicos e para monitorizar a eficácia do programa vacinal, ainda que não se obtenham culturas positivas a partir de animais infetados (Corbel, 2006).

É mais fácil isolar a bactéria no período que se segue ao aborto ou parto, embora também seja possível proceder ao isolamento após a morte ou abate dos animais. O microrganismo pode ser isolado a partir de descargas vaginais, placenta, conteúdo estomacal do feto, fetos abortados e leite. É fundamental para que o isolamento seja bem sucedido que a contaminação ambiental das amostras seja mantida a um nível mínimo. Caso nenhum dos demais materiais estejam disponíveis em condições não contaminadas, o conteúdo estomacal do feto é a amostra que deve ser preferencialmente utilizada. Quando se procede ao isolamento em cadáver, os materiais a enviar para diagnóstico bacteriológico serão os linfonodos supramamários, íliaco interno e retrofaríngeos, assim como o úbere, o testículo, baço, líquido sinovial em caso de artrite e o útero gravídico (Corbel, 2006).

O agente após cultura é identificado com base nas suas características culturais, aparência, coloração Gram e aglutinação com antisoro específico (Corbel, 2006). A determinação da espécie e biovar poderá ser feita posteriormente através de métodos serológicos, moleculares, bioquímicos ou através da lise por bacteriófagos. A identificação definitiva das colónias deverá ser feita em Centros de Referência para a *Brucella*, em Portugal, o Laboratório Nacional de Investigação Veterinária – Instituto Nacional de Recursos Biológicos (LNIV-INRB) (OIE, 2009).

Além da cultura da bactéria, o diagnóstico também é possível através de zaragatoa de vaginas, placentas ou fetos abortados e posterior coloração com a modificação de Stamp do método de Ziehl-Neelsen e observação microscópica. Este método tem, contudo, a desvantagem de *B. melitensis* ser morfológicamente muito semelhante a *B. ovis*, *Chlamydis pscittaci* e *Coxiella burnetii*, dificultando o diagnóstico (Garrido-Abellan *et al.*, 2001).

### 2.9.3 – Outros testes

No teste alérgico é utilizado um preparado de antígenos citoplasmáticos de *Brucella* como a Brucelina INRA ou o Brucellergene OCB (Garrido-Abellan *et al.*, 2001).

O teste consiste na inoculação subcutânea do alérgeno na pálpebra inferior. Espera-se uma resposta de hipersensibilidade do tipo retardado que é visível após 48 horas e atinge o seu máximo às 72 horas após inoculação. Recomenda-se a leitura dos resultados após as

48 horas para haver a certeza da ocorrência da resposta de hipersensibilidade. Este teste não consegue diferenciar animais infetados de vacinados nem animais infetados por *B. ovis* de animais infetados por *B. melitensis* (Garrido-Abellan *et al.*, 2001).

Ainda assim é um teste sensível com a desvantagem de originar falsos-positivos em casos de animais como nas duas situações anteriormente apresentadas. Poderá servir para monitorização do estatuto sanitário de rebanhos em zonas livres de *Brucella* (Corbel, 2006).

Este método de diagnóstico não é utilizado em Portugal.

O **teste da imunodifusão em gel** é um teste de execução mais fácil do que ELISA e CFT (Blasco *et al.*, 1999) e que tem a vantagem de diferenciar animais infetados com *B. melitensis* de animais recém-vacinados com Rev-1 (Garrido-Abellan *et al.*, 2001).

## 2.10 – Impacto económico

A brucelose, pelo seu impacto reprodutivo e por se tratar de uma zoonose é uma doença cuja presença é economicamente muito prejudicial. O impacto reprodutivo prejudica o normal ciclo de funcionamento da produção, já que o parto está sempre no centro da atividade económica. O fato de ser uma zoonose faz com que menos riscos se assumam correr, repercutindo-se numa menor tolerância com os produtos animais.

A brucelose atinge economicamente as explorações tanto na redução das receitas como pelo aumento dos encargos necessários com as recorrentes análises sanguíneas necessárias para obter estatuto sanitário superior.

A prevenção da brucelose tem vantagens económicas para vários setores:

- A população salva dinheiro, não necessitando de tratamentos para a doença;
- A indústria e o comércio não perdem força de trabalho com pessoas em recobro;
- A indústria alimentar beneficia de um aumento na eficiência das explorações e do menor risco de exposição de seus trabalhadores em matadouros;
- O estado arrecada mais dinheiro proveniente de impostos devido a normal compra e venda de animais/carne/outros produtos animais e poupa em gastos com tratamentos, hospitalizações e indemnizações;
- Os produtores capitalizam devido a menores taxas de aborto, perdas neonatais, infertilidade, aumento da vida produtiva do animal, produção leiteira aumentada e venda livre de qualquer produto animal do seu rebanho dentro e fora do seu país. Poupa ainda em gastos com laboratórios para isolamento de *Brucella* e sucessivos testes serológicos ao rebanho (FAO, 2009; Corbel, 2006; Crespo León, 1994).

Uma região/país livre de brucelose capitaliza ainda no livre movimento e comércio animal, já que a regulação veterinária internacional impede a circulação de produtos e animais em presença de *B. abortus*, *B. melitensis* ou *B. suis*, resultando em avultadas perdas económicas para as áreas afetadas (Godfroid, 2005).

## **2.11 – Medidas de prevenção**

A prevenção da brucelose deve ser prioritária para as autoridades sanitárias e veterinárias, seja pelo impacto económico que a doença tem, impedindo o livre comércio de produtos animais, seja pelo risco de infeção humana. Esse risco é reduzido significativamente ao mesmo tempo que a prevalência de brucelose animal é reduzida (Roth *et al.*, 2003).

A prevenção da brucelose tem vantagens para vários setores: o Estado salva dinheiro, não gastando com tratamentos para os doentes, e não perdendo força de trabalho com pessoas em recobro; a indústria alimentar beneficia-se de um aumento na eficiência das explorações e do menor risco de exposição de seus trabalhadores em matadouros; o estado arrecada mais dinheiro proveniente de impostos devido a normal compra e venda de animais/carne; os produtores capitalizam devido a menores taxas de aborto, perdas neonatais e infertilidade, produção leiteira aumentada e venda livre do mesmo e liberdade para venda de qualquer animal do seu rebanho (FAO, 2009).

Tendo em vista que a deteção de brucelose obriga a abates sanitários e sequestro e que o tratamento da doença é proibido, a erradicação da brucelose será facilitada com auxílio de uma vigilância sanitária apertada ladeada pela implementação de medidas de prevenção adequadas para impedir a infeção do rebanho ou dificultar o alastramento da mesma entre os animais do efetivo. A prevenção baseia-se em medidas práticas de manejo, na manutenção de boas condições de higiene e no recurso a vacinação em áreas onde a brucelose está presente.

### **2.11.1 – Maneio preventivo**

Dentre as formas de entrada da brucelose na exploração, sem dúvidas que a mais fácil será através da introdução de novos animais no efetivo. O comércio e empréstimo de ovinos e caprinos desempenham um papel importante na infeção dos rebanhos indemnes (Ganiere, 2004). Uma exploração indemne de brucelose (classificada como B3 ou B4) apenas deve adquirir animais provenientes de explorações de classificação sanitária igual ou superior à sua.

Animais recém-chegados à exploração devem ser isolados em quarentena por um mínimo de 30 dias. A quarentena é utilizada para dar tempo aos animais introduzidos de manifestarem sinais clínicos da doença (Garrido-Abellan *et al*, 2001; FAO, 2009). Em quarentena, recomenda-se a realização de testes serológicos para averiguar a seronegatividade dos animais adquiridos. Em caso dos animais isolados em quarentena serem seropositivos, deve-se desinfetar cuidadosamente os objetos e locais conspurcados e repudiar o animal (Ferreira, 1979).

As fêmeas adquiridas prenhes devem ser mantidas em quarentena obrigatoriamente até que completem uma gestação sem evidência de infecção. Caso o parto ocorra com normalidade e a cria esteja em boas condições não só após o parto mas também durante os dias seguintes ao mesmo, uma vez que o nascimento de crias muito débeis e com pouca viabilidade é um possível sinal de infecção por brucelose, a fêmea pode ser colocada junto com o resto do rebanho mesmo sem a realização do teste serológico (Radostits *et al*, 2001).

A vigilância da ocorrência de abortos na exploração deve ser apertada já que é este o principal sinal clínico da doença. Todas as placentas e abortos devem ser enterrados como prática de rotina sendo a incineração uma alternativa possível. Qualquer que seja a forma de eliminação do abortado e das placentas, esta deve ser feita o mais rapidamente possível e o seu transporte até ao local da eliminação deve ser feito de maneira a não contaminar o ambiente, devendo o material de transporte ser desinfetado prontamente após o serviço (Radostits *et al*, 2001; Corbel *et al*, 2006).

Se o aborto ocorrer num efetivo infetado, para se proceder ao saneamento desse efetivo, todos os animais que abortem devem ser prontamente abatidos (Ferreira, 1979).

A ocorrência de qualquer aborto deve ser obrigatoriamente declarada, pelo que nenhum produtor se deve esquivar a isso.

Os partos são ocasiões propícias para ocorrer a disseminação da *Brucella* no ambiente. Sabe-se também que a contaminação ambiental maciça das áreas utilizadas para as ovelhas prenhes e que parem pode transformar a brucelose num problema contínuo, indicando a necessidade de delimitar o espaço de partos. Como o parto em locais com elevada densidade populacional favorecem a disseminação do agente, o parto em locais abertos e isolados previne a disseminação (Radostits *et al*, 2001; Iowa State University, 2007)

A maternidade deve ser constituída, preferencialmente, por baias separadas que possam ser limpas e desinfetadas e localizadas a salvo de correntes de ar, uma vez que há a possibilidade de contaminação por aerossóis (Radostits *et al*, 2001; Garrido-Abellan *et al*,

2001). Pode ser colocada cal viva sob a cama da baia, já que ajuda a prevenção de transmissão de doenças infecciosas (Valentim, 2012).

Por fim, é importante manter boas condições de higiene no estábulo para reduzir a exposição dos animais ao agente. A não higienização dos estábulos constitui um risco para o aparecimento de novos focos de brucelose mesmo em explorações alvo de planos de erradicação (baseados em “teste e abate”), devido à capacidade considerável de sobrevivência da bactéria no ambiente. Destacam-se as seguintes medidas de higiene: lavagem e desinfecção dos locais onde ocorreram abortos ou partos prontamente após o ocorrido, remoção diária do estrume ou chorume e armazenamento em área isolada até se tornar seguro por processos de decomposição natural, podendo também ser queimado ou imerso em desinfetante antes da sua eliminação, utilização de rodilúvios com desinfetante para os veículos que entram e saem de explorações infetadas e repovoamento de explorações com novos animais 4 meses após as operações de limpeza e desinfecção (Corbel, 2006)

Para proceder a desinfecção pode-se utilizar hipoclorito de sódio (2,5%), a soda cáustica (2,3%), uma suspensão atenuada a 20% de cal e formaldeído (2%), sendo todos eficazes, para um tempo de ação respeitado de uma hora, mesmo em presença de matéria orgânica, que tende a reduzir a eficácia dos desinfetantes. Também a creolina a 5% é eficaz (Láu, 1997; Iowa State University, 2007).

Outra possibilidade de desinfetar vestuário de uma maneira bastante simples é proceder a submersão em água fervente por 30 minutos, enquanto as mãos podem ser desinfetadas com solução fenólica a 2-3% seguida de lavagem com sabão normal (WHO, 1984).

### **2.11.2 – Vacinação**

A vacinação tem, relativamente a outras formas de prevenção coadjuvantes, a grande vantagem de ser uma forma de combate que é facilmente aceite pelos produtores, uma vez que os mesmos estão acostumados a esse tipo de mecanismo para prevenção de outras doenças. Ela torna-se muito importante já que praticamente elimina os sinais clínicos da brucelose e é acompanhada por uma redução da contaminação do ambiente e da exposição da população animal em risco ao agente infeccioso (Garrido-Abellan *et al*, 2001). Assim, a vacinação tenta conseguir dois feitos: prevenir o aparecimento da doença nos animais vacinados e prevenir que animais doentes, mas que não manifestam a doença, sigam disseminando o agente.

Segundo Garrido (1992), no entanto, uma proteção adequada só é assegurada caso a vacina seja de boa qualidade e 80% dos animais em risco sejam vacinados. Deste modo, dever-se-á ter um cuidado muito grande antes de avaliar o sucesso ou insucesso da vacinação da exploração, uma vez que não se poderá obter resultados definitivos antes desta percentagem ser atingida.

A vacinação pode ser feita por duas vias: a via subcutânea ou a via conjuntival (Garrido Abellan *et al.*, 2001).

A vacinação por via subcutânea, todavia, origina uma resposta imunitária longa e duradoura devido à elevada produção de anticorpos, o que interfere com o diagnóstico da doença através de testes serológicos (El Idrissi *et al.*, 2001).

Uma forma de diminuir o tempo da reação pós-vacinal após inoculação por via subcutânea, assim antecipando a validade dos testes serológicos de despiste de brucelose, seria diminuir a carga bacteriana vacinal. Contudo isto leva a uma imunização menos eficaz, sendo uma estratégia de prevenção deveras arriscada (Dias *et al.*, 1994).

A via conjuntiva torna-se a via de eleição, já que esta via de administração reduz a intensidade e duração da resposta serológica pós-vacinal, deixando mais rapidamente de ser detetada pelos testes serológicos, ao mesmo tempo que garante uma imunidade semelhante à conferida pela via subcutânea. Assim, por via conjuntival, a vacinação torna-se compatível com programas de controlo da brucelose baseados em “teste e abate”, como é o nacional (Diaz *et al.*, 1994; WHO, 1998; El Idrissi *et al.*, 2001).

Corbel (2006) preconiza que com a vacinação por via conjuntival, a imunização do rebanho é rapidamente atingida e os custos de aplicação são minimizados. Além disso, o título de anticorpos regride rapidamente, sem interferir com a proteção do animal contra a doença.

A vacina de eleição contra a brucelose em pequenos ruminantes é a vacina Rev-1, uma vacina viva atenuada, produzida a partir de uma estirpe rugosa de *Brucella melitensis*. A Rev-1 é uma vacina eficaz contra *B. melitensis* e *B. ovis*, sendo mais eficaz em ovelhas do que em cabras (WHO, 1998; Poeta *et al.*, 2003). El Idrissi e colaboradores (2001) obtiveram uma taxa de fertilidade de 93% expondo animais vacinados com Rev-1 a estirpe *B. melitensis* H38. No mesmo estudo, 86% dos animais são considerados protegidos, tendo definido como protegidos aqueles animais que não abortavam nem excretavam a estirpe *B. melitensis* H38 no corrimento vaginal. Poeta e colaboradores (2003) mostram que a vacina Rev - 1 não origina uma resposta imunitária de tão longa duração detetável nos testes do Rosa de Bengala e da fixação do complemento. Para a maior parte dos animais, em quatro meses já não há resposta imunitária induzida pela vacina. Exceção aparenta ser quando o teste é feito com o Rosa de

Bengala Modificado. Todavia “essa prova deveria ser desaconselhada uma vez que a estatística de efetivos infetados revela muitos animais positivos antes da vacinação e também aos quatro meses após a vacinação”.

A vacinação com Rev-1 por via subcutânea está recomendada para animais jovens e sexualmente imaturos. A vacinação em animais adultos desencadeia uma resposta serológica de maior intensidade e mais longa duração do que em animais jovens, o que poderá interferir com métodos de diagnóstico (Blasco *et al.*, 1999). Além disso, a vacinação de fêmeas gestantes pode desencadear abortos mesmo em doses reduzidas (menor número de Unidades Formadoras de Colónias) e a resposta imunitária não será muito eficaz pela imunodepressão que naturalmente ocorre durante a gestação (Corbel, 2006).

Outras estirpes estão sendo testadas para serem utilizadas em vacinação, como VTRM1, RfbK, *B. suis* S2, M111 e *B. abortus* RB51 (Garrido-Abellan *et al.*, 2001).

A vacina VTRM1 é uma vacina viva obtida a partir da mutagénese de uma estirpe de *B. melitensis*. A eficácia desta vacina é posta em causa já que ela não confere proteção adequada contra *B. melitensis* em caprinos (Garrido-Abellan *et al.*, 2001).

A vacina RfbK é uma vacina viva obtida a partir da mutagénese da estirpe *B. abortus* 2308. Os estudos preliminares sugerem que esta estirpe mutante poderá ser eficiente na profilaxia médica de infeção causada por *B. melitensis* em caprinos (Garrido-Abellan *et al.*, 2001). Contudo, será necessário aprofundar os estudos para se saber ao certo o grau de imunidade conferido pela vacina, pelo que não está, para já, recomendada.

A vacina com estirpe *B. suis* S2 foi, aparentemente, utilizada com sucesso no controlo de brucelose após aplicações orais em pequenos ruminantes na China e Líbia. Contudo, esta vacina não demonstrou qualquer capacidade de proteger ovelhas da infeção por *B. melitensis* em condições experimentais controladas. (Garrido-Abellan *et al.*, 2001). Esta vacina, como a anterior, carece de mais estudos para assegurar a sua total eficácia já que os estudos realizados contrariam o relativo sucesso da vacina quando utilizada na China e Líbia. O que se sabe com certeza, desde já, é que a S2 é uma estirpe vacinal mais estável e menos virulenta do que a Rev-1 (WHO, 1998), duas vantagens que não devem ser descuradas.

A M111 é uma estirpe rugosa de *B. melitensis* usada como vacina viva. Esta vacina apresenta a grande vantagem de não induzir a produção de anticorpos contra as estirpes de *Brucella* utilizados nos testes serológicos, como o teste do Rosa de Bengala, sendo assim compatível como uma política de abate seletivo conjuntamente com a vacinação. A vacina mostra-se ainda eficaz na prevenção da ocorrência de abortos provocados pelo agente. No

norte da China, as taxas de aborto foram reduzidas de cerca de 50% para zero em 2 anos. (WHO, 1998).

A M111 provou-se eficaz em 84% das ovelhas e 78% das cabras, sendo segura para os animais e capaz de estimular a imunidade contra *B. melitensis* (WHO, 1998).

A vacina com estirpe *B. abortus* RB51 é uma vacina viva atenuada. Esta vacina já foi parcialmente testada em caprinos e, em comparação com a vacina Rev-1, demonstrou ser menos eficaz, ao proteger apenas 31% dos animais vacinados, ao passo que 86% dos animais vacinados com Rev-1 se encontravam protegidos contra *B. melitensis*. No entanto nenhum estudo foi realizado com relação a eficácia da vacina quando usada em ovelhas (El Idrissi *et al*, 2001).

Para o futuro novas vacinas estão já a ser desenvolvidas. Esta nova geração engloba estirpes recombinantes, a quem foram subtraídas proteínas relevantes para o diagnóstico de brucelose, e vacinas de DNA. Contudo, mais estudos serão necessários ainda antes da sua aprovação já que, até agora, nenhuma dessas vacinas conseguiu superar a segurança e o grau de imunidade conferido pela vacina Rev-1. Assim, e até que novas vacinas eficazes sejam desenvolvidas e testadas de forma apropriada, a vacina Rev-1 deve continuar sendo a vacina de referência para a profilaxia da brucelose em pequenos ruminantes (Garrido-Abellan *et al*, 2001).

### **2.11.3 – Vacinação em Portugal.**

Atualmente, em Portugal, o plano de erradicação da brucelose recorre à estratégia de abate seletivo, vacinando-se apenas animais entre os 3 e os 6 meses de idade altura em que os animais ainda não estão maduros sexualmente, e assim, apenas os animais de reposição serão vacinados. A vacinação é realizada com estirpe Rev-1, aplicada por via conjuntival. Recomenda-se a vacinação das fêmeas sexualmente imaturas, de maneira a compatibilizar a vacinação com os testes serológicos e para prevenir a ocorrência de abortos devido à vacina. Os machos que forem escolhidos para serem criados devem ser também vacinados, ainda que o risco de machos infetados transmitirem a doença a fêmeas sensíveis através de monta natural seja baixo. Este plano de vacinação exclusiva de animais de reposição por 5 ou 6 anos (o tempo usual de vida produtiva de pequenos ruminantes) funciona na hipótese de que toda a população teria imunidade para toda a vida, criando-se um rebanho inteiro vacinado. Sabe-se, porém, que apenas as duas gestações subsequentes à vacinação com estirpe Rev-1 estão seguramente protegidas (Corbel, 2006; Vaz, 2012).

## 2.12 - Plano Nacional de Erradicação da Brucelose (PNEB)

Portugal, como todo país membro da União Europeia onde a brucelose é endémica, tem um plano nacional para erradicação da doença. O plano é elaborado pelo Ministério da Agricultura, Do Ambiente, do Mar e do Ordenamento do Território, mais especificamente, pela Direção de Serviços de Saúde e Proteção Animal e pela Direção Geral de Veterinária. O Plano Nacional de Erradicação conseguiu, nos últimos 5 anos, diminuir a prevalência da doença em todas as regiões de Portugal continental, exceto no Algarve (Direção de Serviços de Saúde e Proteção Animal/Direção Geral de Veterinária, 2012).

O plano aplica a estratégia de abate seletivo. O sucesso dessa estratégia está intimamente ligado a dois fatores: epidemiovigilância e rapidez no abate dos animais seropositivos.

O objetivo da epidemiovigilância é detetar surtos ou a reintrodução da doença, o que permite delinear as melhores estratégias de ação e prevenção a médio ou longo prazo, quantificar custos, prever benefícios e otimizar os recursos disponíveis. Assim, a epidemiovigilância é um pré-requisito indispensável a qualquer plano de erradicação da brucelose (Blasco, 2010; Corbel, 2006). A recolha de dados deve ser ativa, contando-se no PNEB as seguintes medidas:

- Rastreio serológico regular de uma amostra significativa da população (Blasco, 2010). O plano preconiza a recolha de amostras de sangue de todos os ovinos e caprinos com idade superior a 6 meses ou 18 se tiverem sido vacinados em jovens pelo menos uma vez por ano. As amostras são depois submetidas a análise em laboratório acreditado, onde é realizado o teste do Rosa de Bengala e, em caso deste resultar positivo, o teste da fixação do complemento, de acordo com as normas da União Europeia;
- Inquéritos epidemiológicos são realizados aquando do aparecimento de focos de brucelose. O seu objetivo é detetar as possíveis causas do surto, eliminá-las e providenciar medidas preventivas para que estas não voltem a ocorrer;
- Averiguação de provas para determinar causas de aborto. O aborto deve ser obrigatoriamente declarado às autoridades competentes.

Os dados colhidos serão utilizados para o cálculo da prevalência e incidência da doença. A incidência é particularmente importante para averiguar o sucesso do programa de controlo e erradicação implementado (Corbel, 2006).

Os animais considerados positivos serão abatidos no período máximo de 30 dias, podendo o abate se estender a todo o efetivo, caso se conclua ser esta a medida mais adequada devido

às condições epidemiológicas da área geográfica. O abate de todo o rebanho é ponderado quando não ocorre melhoria da classificação sanitária do efetivo nos 12 meses após sequestro, quando não é possível aplicar medidas de profilaxia e polícia sanitária e caso o agente tenha sido isolado (Dec-Lei 244/2000).

Ao invés de todo o efetivo ser testado, rebanhos classificados como B3 ou B4 podem ser controlados por amostragem de uma fração representativa da população animal do rebanho com idade superior a 6 meses, caso a área epidemiológica em que o rebanho está localizado (freguesia, concelho, Organização de Produtores Pecuários, Divisão de Intervenção Veterinária ou Direção de Serviços Veterinários das Regiões) tenha 99.8% dos rebanhos classificados como B3 ou B4 (Direção de Serviços de Saúde e Proteção Animal/Direção Geral de Veterinária, 2012).

Segundo a avaliação serológica dos rebanhos, eles são classificados como B2 (Não indemne), B3 (Indemne) ou B4 (Oficialmente indemne). Existem ainda as classificações B2.1, B3S e B4S. Existe ainda a classificação B1 reservada a rebanhos cujos antecedentes clínicos, vacinais ou serológicos são desconhecidos e/ou em que se observem infrações ao sequestro sanitário ou onde um programa de saneamento não esteja a ser cumprido (Portaria 3/1995).

Os rebanhos são classificados como B3 ou B4 caso todo o efetivo seja seronegativo após a realização dos testes serológicos anuais. Adicionalmente, a classificação B4 é atribuída a explorações em que não se encontrem animais vacinados com Rev-1 enquanto a classificação B3 será atribuída para explorações que possuam animais vacinados (Decreto-Lei 244/2000). Um rebanho B3 ou B4 com animais seropositivos é prontamente classificado como B3S ou B4S. Os animais positivos são abatidos e novo rastreio é realizado em 60 dias. Caso algum animal seja novamente considerado positivo, a exploração é reclassificada como B2 ou B2.1. Caso todos os animais sejam negativos, o rebanho retoma a classificação B3.

A classificação B2 é atribuída quando são detetados animais positivos nos testes serológicos. Procede-se ao isolamento de *Brucella* destes animais. Caso o isolamento seja bem-sucedido, o rebanho é reclassificado como B2.1.

Segue em anexo a sequência de medidas programadas pelo plano a serem tomadas para rebanhos de classificação sanitária B2.1, B2, B3 e B4 (ver Anexo 1).

O programa estipula ainda a obrigatoriedade de vacinação de animais em regiões assoladas pela doença, como são as regiões do Algarve e de Trás-os-Montes, assim como recomenda a vacinação de qualquer população que se considere em risco, mesmo que não pertença a uma área em que a brucelose seja considerada endémica (Direção de Serviços de Saúde e Proteção Animal/Direção Geral de Veterinária, 2012).

### 2.13 - Brucelose humana

A brucelose é, a par da tuberculose e da raiva, das zoonoses mais difundidas no mundo. A brucelose é a zoonose bacteriana mais comum no mundo, com mais de meio milhão de casos todos os anos (Franco *et al.*, 2007).

A doença, no homem, é causada por *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* biovars 1-4 e, raramente, por *B. canis* e *B. pinnipedialis* (Iowa State University, 2007). Dentre estes agentes, é *B. melitensis* o principal e mais virulento agente de brucelose humana, apesar das campanhas de vacinação contra o agente (Corbel, 1997). A infeção por *B. canis* é rara mesmo em países onde a brucelose canina causada por este agente está disseminada (Iowa State University, 2007).

A doença é também chamada de Febre de Malta, Febre Ondulante, Doença de Bang ou Febre da Rocha de Gibraltar, e é considerada, nos países tidos como desenvolvidos, ocupacional, ou seja, que atinge principalmente pessoas cujo emprego está diretamente relacionado com rebanhos animais e processamento de produtos animais, como veterinários, tosquiadores, agricultores, pastores, inseminadores, empregados de matadouros, talhantes, profissionais de laboratório, entre outros (Gul *et al.*, 2007). Nestes casos, as principais vias de infeção são a percutânea, respiratória e conjuntival (Corbel, 2006).

O homem infeta-se principalmente através do contato de materiais contaminados com mucosas e abrasões na pele e pela ingestão de produtos animais contaminados, como leite e uma variada gama produtos lácteos não pasteurizados como queijos, manteiga, natas e gelados, onde a bactéria pode sobreviver por longos períodos de tempo. A má higiene dos equipamentos de transporte ou confeção de produtos lácteos e do leite pode contaminar outros produtos (Corbel, 2006; Crespo León, 1994). O consumo de carne não representa um risco muito grande já que nela as concentrações de *Brucella* são baixas e a bactéria habitualmente não resiste à acidificação *post-mortem* da carne nem à confeção culinária. O consumo de carne só representará um risco caso seja consumida crua ou insuficientemente cozinhada (Crespo León, 1994). Os vegetais só constituirão um risco caso sejam contaminados por fezes de animais infetados e consumidos crus (Corbel, 2006). Também os aerossóis podem servir para infetar seres humanos, ainda que a sua importância seja considerada menor (Xavier *et al.*, 2009), sendo os profissionais de laboratório os mais frequentemente infetados por esta via (Martin-Mazuelos *et al.*, 1994).

A transmissão entre humanos, seja por transplante de órgãos e tecidos, transfusão de sangue ou transmissão venérea está documentada mas é insignificante (Corbel, 1997; Mantur *et al.*, 1996).

A brucelose humana é uma doença multisistêmica e com sinais clínicos não específicos. Alguns pacientes infetados são mesmo assintomáticos (Iowa State University, 2007).

Tipicamente, a doença manifesta-se como uma gripe, com febre, dor de cabeça, dores nas costas, dores musculares e mal-estar generalizado. Ocasionalmente podem ser observadas esplenomegalia, hepatomegalia, tosse e dor torácica. Em adultos são também frequentes sinais gastrointestinais como anorexia, enjôo, vômitos, diarreia e constipação. Em muitos pacientes, esta sintomatologia dura de duas a quatro semanas, seguindo-se uma recuperação espontânea. Contudo, outros desenvolvem uma febre e outros sinais persistentes em intervalos de 2 a 14 dias. Nestes casos, a recuperação total ocorre em 3 a 12 meses. Outra categoria de pacientes são os que se tornam cronicamente infetados. Nestes casos, as complicações mais frequentes são artrite, espondilite, orquite, epididimite e fadiga crônicas (Iowa State University, 2007).

Menos frequente é a ocorrência de uveíte, neurite ótica, nefrite, dermatite, vasculite, hepatite granulomatosa, osteomielite, anemia, abscessos hepáticos, linfadenopatia, endocardite e sinais de natureza neurológica, que ocorrem em 5% dos casos, manifestando os pacientes alterações comportamentais, meningite e encefalite (Iowa State University, 2007).

Em humanos a brucelose é alvo de tratamento etiológico. Este é feito com recurso a antibióticos, sendo os mais utilizados os pertencentes à classe das tetraciclina. Outros antibióticos utilizados são a rifampicina, particularmente útil em casos de sintomatologia neurológica e a estreptomicina, antibiótico mais frequentemente conjugado com as tetraciclina no tratamento padrão de brucelose. Também se utiliza o co-trimoxazole em associação com aminoglicosídeos ou rifampicina em casos de gravidez, quando as tetraciclina estão contra-indicadas, e as fluoroquinolonas e macrólidos como a claritromicina, azitromicina e a roxitromicina (Banai *et al.*, 1994).

A prevenção da brucelose humana só pode ser conseguida seguindo regras de higiene estritas em situações de risco, consumo de alimentos seguramente tratados e controlando a infeção em efetivos animais (Iowa State University, 2007).

### **3 – Material e métodos**

Para reconhecer falhas de manejo e detetar comportamentos de risco realizou-se um inquérito-piloto em 31 explorações do concelho de Alfândega da Fé, entre os dias 01/09/2013 a 10/10/2013, representando pouco mais de ¼ do número total de explorações do concelho. O inquérito-piloto (ver anexo II) contém 36 questões distribuídas por 6 categorias, sendo elas: trânsito animal, higiene, manejo reprodutivo, sanidade, alimentação e pastagem e informações gerais. Dentre essas categorias há dois tipos de pergunta: as de resposta livre e as de escolha múltipla. Não se colocou nenhum entrave em relação ao tipo de rebanho (ovino, caprino ou misto) apenas se exigiu que o efetivo contasse com mais de 5 animais.

O inquérito-piloto foi realizado pelo autor com colaboração do orientador e co-orientador, baseando-se nos conhecimentos sobre a epidemiologia da doença e no inquérito epidemiológico realizado às explorações com animais seropositivos à brucelose. A aplicação do inquérito-piloto foi apenas realizada por médicos veterinários.



#### 4 – Resultados

Apresentam-se a seguir os resultados segundo as categorias do inquérito-piloto, de maneira a focar melhor as disparidades no manejo entre explorações de freguesias com e sem brucelose, FCB e FSB, respetivamente.

##### Trânsito Animal

Tabela 7 – Número e percentagem de explorações que introduziram novos animais no último ano.

Tipo de Exploração	Sim	Não	Média de animais adquiridos
FCB	8 (57,14%)	6 (42,86)%	26,4
FSB	4 (23,5%)	13 (76,5%)	12,5

Observa-se que, não só menos explorações de FSB adquiriram animais provenientes de outros rebanhos, como o número de animais adquiridos anualmente é menor. 57,12% das explorações em FCB compraram animais nos últimos 12 meses, numa média de 26,4 animais adquiridos, enquanto apenas 23,5% de explorações em FSB compraram animais, numa média de 12,5 animais adquiridos no último ano.

Tabela 8 – Número e percentagem de explorações que apenas adquire animais provenientes de rebanhos B3/B4

Tipo de Exploração	Sim	Não
FCB	10 (76,92%)	3 (23,08%)
FSB	14 (87,5%)	2 (12,5%)

A percentagem de explorações que não atentam para a classificação sanitária do rebanho de proveniência do animal adquirido é maior em FCB do que em FSB. Ainda assim, a larga maioria das explorações (77,42%) apenas adquire animais de rebanhos classificados como B3 ou B4.

Tabela 9 – Número e percentagem de explorações que realizam quarentena aos animais recém-adquiridos.

Tipo de Exploração	Sempre	Ocasionalmente	Nunca
FCB	0	0	14 (100%)
FSB	1 (7,70%)	3 (23,07%)	9 (69,23%)

Globalmente, 74,19% das explorações nunca realizam quarentena aos animais comprados antes de os introduzir no rebanho. Pior ainda, todas as explorações que assumem não atentar para a classificação sanitária dos rebanhos de proveniência dos animais que compraram também não realizam quarentena destes animais. Dentre as 4 explorações que realizam quarentena destes novos animais, todas elas o fazem por um período menor do que o recomendado de, no mínimo, 30 dias.

Tabela 10 – Número e percentagem de explorações que realizam provas serológicas aos animais recém-adquiridos.

<b>Tipo de Exploração</b>	<b>Sempre</b>	<b>Ocasionalmente</b>	<b>Nunca</b>
<b>FCB</b>	3 (23,08%)	3 (23,08%)	7 (53,84%)
<b>FSB</b>	1 (7,14%)	7 (50%)	6 (42,86%)

Globalmente, pouco mais de metade das explorações assumem solicitar a realização de provas serológicas aos animais recém-adquiridos, porém apenas 12,90% delas o fazem a cada aquisição. Novamente, uma maior percentagem de explorações localizadas em FSB adota a medida preventiva relativamente às explorações localizadas em FCB.

Tabela 11 – Número e percentagem de explorações que apenas compram adultos se vacinados.

<b>Tipo de Exploração</b>	<b>Sim</b>	<b>Não</b>
<b>FCB</b>	0	14 (100%)
<b>FSB</b>	1 (6,67%)	14 (93,33%)

Globalmente, apenas 3,23% das explorações exige que animais adultos que comprem estejam vacinados. Em explorações de FCB nenhuma exploração exige vacinação prévia do animal adulto e em explorações de FSB apenas 1 o faz.

## Higiene

Tabela 12 – Número e percentagem de explorações segundo a frequência de lavagem e desinfecção dos estábulos.

Tipo de Exploração	Nunca	Anualmente	Até 6 vezes por ano	Entre 7 e 12 vezes por ano	Mais de 12 vezes por ano
FCB	1 (7,15%)	1 (7,15%)	8 (57,14%)	4 (28,57%)	0
FSB	0	6 (35,29%)	6 (35,29%)	5 (29,41%)	0

Considerando que 3 ou mais lavagens e desinfecções anuais do estábulo garantem um importante grau de proteção dos animais (Domínguez *et al.*, 2000), 14,29% das explorações em FCB estariam em maior risco, e 35,29% das explorações em FSB correriam risco considerável devido ao seu grau de higiene. Porém existe o problema do produto utilizado ser eficaz quando esta é feita. Dentre os 31 entrevistados, 26 (83,87%) não desinfetam ou não utilizam produto capaz de eliminar *Brucella*, muitos mesmo recorrendo apenas a água ou a produtos ectoparasiticidas. Apenas 4 explorações (12,90%) desinfetam eficazmente o estábulo. Um dos entrevistados não soube dizer qual o produto utilizado.

Nenhum dos entrevistados se preocupa em desinfetar roupas e instrumentos que tenham entrado em contato com materiais resultantes do parto e apenas 2 explorações (ambas de FCB) procede a troca de vestuário antes de entrar nas maternidades.

Por fim, nenhuma das explorações entrevistadas que isolam animais suspeitos de doença ou doentes limpam e desinfetam o local de isolamento após a saída do animal do confinamento.

## Maneio Reprodutivo

Tabela 13 – Número e percentagem de explorações que isolam as fêmeas antes dos partos.

Tipo de Exploração	Sim, sempre	Não, mas tem meios de o fazer	Não e não tem meios de o fazer
FCB	4 (30,77%)	7 (53,85%)	3 (15,38%)
FSB	5 (29,4%)	3 (17,65%)	9 (52,95%)

A percentagem de explorações que procedem ao isolamento das parturientes é muito baixo em qualquer um dos grupos e não satisfatório globalmente (29,03%).

Em relação aos agricultores que isolam suas fêmeas, todos eles assumem só o fazer quando observam que o animal está para parir. Das 9 explorações que procedem ao isolamento, 7 (77,78%) alojam os animais no mesmo edifício onde os demais permanecem. As restantes 2 (22,22%) explorações isolam as fêmeas em outro edifício próprio para o efeito. Ainda relativamente a estas 9 explorações, 7 apenas trocam as camas entre cada ocupação enquanto as outras três nem sequer o fazem.

Como se pode constatar no gráfico seguinte (nº2), apesar de 9 explorações tentarem isolar partos, 5 delas admitem que o parto pode ocorrer também fora da maternidade.

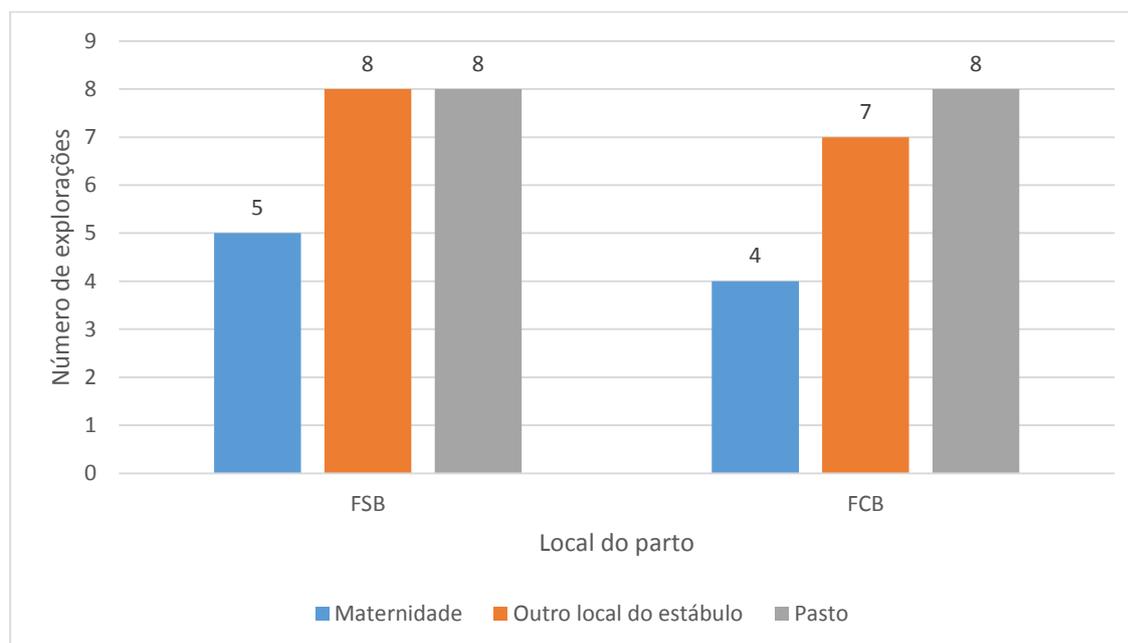


Gráfico 2 – Número de partos por local de ocorrência.

Tabela 14 – Número e percentagem de explorações que pratica cada tipo de procedimento após a saída da fêmea da maternidade.

Tipo de exploração	Troca das camas e desinfeção	Apenas desinfeção	Apenas troca das camas	Nada
FCB	0	0	3 (75%)	1 (25%)
FSB	0	0	4 (80%)	1 (20%)

Nenhuma das explorações realiza uma desinfeção correta das maternidades após a saída das fêmeas. A larga maioria procede unicamente a troca das camas enquanto duas delas nem sequer isso fazem.

Tabela 15 – Número e percentagem de explorações que isolam as fêmeas após os partos.

<b>Tipo de Exploração</b>	<b>Sim</b>	<b>Não</b>
<b>FCB</b>	3 (30%)	7 (70%)
<b>FSB</b>	6 (35,29%)	11 (64,71%)

Poucas explorações separam as fêmeas após o parto e as que o fazem, fazem-no por um período entre 5 a 15 dias.

Nenhuma das explorações inquiridas enterra ou incinera os fetos, abortos, nados mortos e secundinas. Ou seja, material com potencial de ter elevada carga bacteriana não é eliminado corretamente. Os agricultores admitem que não realizam qualquer ação especial pelo que o fim a ser dado a estes materiais variará do abandono em terrenos de pastoreio, ao depósito em lixo comum ou à refeição de cães pastores ou vadios.

Apenas 2 das 31 explorações inquiridas (ambas em FSB) separa e isola as fêmeas que abortaram. Todas as demais reintegram a fêmea de imediato, sem qualquer precaução especial ou suspeita de ter um animal doente e potencialmente perigoso para o resto do rebanho.

Tabela 16 – Número e percentagem de explorações que efetuam troca de reprodutores com outros proprietários.

<b>Tipo de Exploração</b>	<b>Sim</b>	<b>Não</b>
<b>FCB</b>	5 (35,71%)	9 (64,29%)
<b>FSB</b>	1 (5,88%)	16 (94,12%)

Poucas explorações promove troca de reprodutores com outros proprietários. Globalmente, apenas 19,35% das explorações o fazem.

### **Sanidade**

Tabela 17 – Número e percentagem de explorações que isolam animais doentes ou suspeitos de doença.

<b>Tipo de Exploração</b>	<b>Sim, sempre</b>	<b>Não, mas tem meios de o fazer</b>	<b>Não e não tem meios de o fazer</b>
<b>FCB</b>	3 (21,43%)	7 (53,85%)	4 (24,72%)
<b>FSB</b>	4 (23,53%)	6 (35,29%)	7 (41,18%)

Relativamente ao isolamento de animais doentes e suspeitos de doença, verifica-se a semelhança das percentagens entre os dois tipos de exploração. Globalmente a percentagem de explorações que isolam animais doentes ou suspeitos de doença está claramente aquém

do desejado, apenas 22,58%. Porém existe a possibilidade imediata de fazer essa porcentagem disparar para 64,52%, bastando para isso que os produtores com capacidade de separar estes animais o façam.

Tabela 18 – Número e porcentagem de explorações com fêmeas adultas não vacinadas.

<b>Tipo de Exploração</b>	<b>Sim</b>	<b>Não</b>
<b>FCB</b>	14 (100%)	0
<b>FSB</b>	16 (94,12%)	1 (5,88%)

Relativamente à existência de fêmeas adultas não vacinadas no rebanho, 30 explorações assumem ter animais adultos não vacinados no rebanho. A única exploração sem fêmeas adultas por vacinar localiza-se numa FSB.

Tabela 19 – Número e porcentagem de explorações cujos cães têm acesso a placentas e abortos.

<b>Tipo de Exploração</b>	<b>Sim</b>	<b>Não</b>
<b>FCB</b>	13 (92,86%)	1 (7,14%)
<b>FSB</b>	14 (82,35%)	3 (17,65%)

Os cães têm livre acesso aos materiais resultantes do parto, seja por lhes serem dados ou por conseguirem roubá-los devido à facilidade que têm de entrar no estábulo. Globalmente 87,10% das explorações admitem que seus cães comem placentas e abortos. Não se verifica grande diferença entre explorações em FCB ou FSB, apesar da porcentagem de explorações de FCB que assume esse risco ser maior do que explorações de FSB.

### **Alimentação e pastagem**

Tabela 20 – Origem da água de bebida dos animais.

<b>Tipo de Exploração</b>	<b>Rede pública</b>	<b>Furo</b>	<b>Poços/charcos</b>
<b>FCB</b>	8 (57,14%)	2 (14,29%)	4 (28,57%)
<b>FSB</b>	8 (47,06%)	2 (5,88%)	8 (47,06%)

Uma porcentagem considerável de explorações utiliza água de poços e charcos (38,71%), possivelmente de pior qualidade microbiológica, para abeberar os animais. As explorações em FCB apresenta maior porcentagem de utilização de água da rede pública,

57,14%. As explorações em FSB utilizam água de menor segurança em 47,06% das explorações.

Tabela 21 – Número e percentagem de rebanhos que partilham a zona de abeberamento com outros ruminantes.

<b>Tipo de Exploração</b>	<b>Sim</b>	<b>Não</b>
<b>FCB</b>	9 (64,26%)	5 (35,74%)
<b>FSB</b>	13 (76,47%)	4 (23,53%)

Globalmente a larga maioria das explorações (70,97%) assume que seus rebanhos partilham com outros as zonas de abeberamento. Apenas 35,74% das explorações de FCB e 23,53% das explorações em FSB não partilham zonas de abeberamento com outros ruminantes.

Tabela 22 – Número e percentagem de rebanhos que partilham pastos/caminhos com outros ruminantes.

<b>Tipo de Exploração</b>	<b>Sim</b>	<b>Não</b>
<b>FCB</b>	12 (85,71%)	2 (14,29%)
<b>FSB</b>	12 (70,59%)	5 (29,41%)

Globalmente, 77,42% das explorações partilham caminhos e pastos com outros ruminantes. Essa percentagem é maior em FCB, atingindo 85,71% das explorações, enquanto em FSB esse valor fica-se pelos 70,59% das explorações.

Tabela 23 – Número e percentagem de rebanhos que praticam transumância.

<b>Tipo de Exploração</b>	<b>Sim</b>	<b>Não</b>
<b>FCB</b>	5 (35,71%)	9 (64,29%)
<b>FSB</b>	7 (41,18%)	10 (58,82%)

A transumância é prática comum em Alfândega da Fé mas não realizada pela maioria das explorações. Apenas 35,71% das explorações em FCB e 41,18% das explorações em FSB praticam transumância. Apesar do baixo número, salienta-se que todos os praticantes de transumância assumem a partilha das zonas de transumância com outros rebanhos.

## Informações Gerais

Tabela 24 – Número e percentagem de agricultores que conhecem os sinais clínicos de brucelose.

<b>Tipo de Exploração</b>	<b>Sim</b>	<b>Não</b>
<b>FCB</b>	8 (57,14%)	6 (42,86%)
<b>FSB</b>	10 (58,82%)	7 (41,18%)

A maioria dos agricultores (58,06%) assume conhecer os sinais clínicos da doença, apesar de se desejar uma percentagem ainda maior do que a obtida. Não existe grande disparidade entre os dois tipos de exploração. Todavia nenhum agricultor comunica às autoridades competentes a ocorrência de abortos na exploração.

Tabela 25 – Número e percentagem de agricultores que conhecem o impacto económico da doença.

<b>Tipo de Exploração</b>	<b>Sim</b>	<b>Não</b>
<b>FCB</b>	6 (42,86%)	8 (57,14%)
<b>FSB</b>	11 (64,71%)	6 (35,29%)

Também relativamente ao impacto económico da brucelose, pouco mais de metade dos agricultores (54,84%), assumindo conhecê-lo. Produtores de FSB aparentam estar mais atentos a este impacto, já que 64,71% deles afirmam conhecer o impacto económico da doença, enquanto em FCB, apenas 42,88% dos produtores conhecem este impacto.

Tabela 26 – Número e percentagem de agricultores que conhecem outras formas de prevenção para além da vacinação.

<b>Tipo de Exploração</b>	<b>Sim</b>	<b>Não</b>
<b>FCB</b>	1 (7,14%)	13 (92,86%)
<b>FSB</b>	5 (29,41%)	11 (64,71%)

O número de agricultores que assume conhecer outros meios de prevenir a brucelose para além da vacinação é muito reduzido, apenas 19,36% na totalidade das explorações inquiridas. Também neste ponto, as explorações em FCB (92,86%) apresentam piores resultados, apesar do resultado das explorações em FSB também estar longe de satisfatório (70,59%).

Tabela 27 – Número e percentagem de agricultores que já tiveram Febre de Malta.

<b>Tipo de Exploração</b>	<b>Sim</b>	<b>Não</b>
<b>FCB</b>	3 (21,43%)	9 (78,57%%)
<b>FSB</b>	5 (29,41%)	12 (70,59%)

A percentagem de produtores que já teve Febre de Malta (i.e. os próprios ou seus familiares) é considerável (25,81%). Neste parâmetro os produtores em FSB sofrem mais com a doença (29,41%) do que os de FCB (21,43%).



## 5 – Discussão

Os resultados obtidos através do inquérito-piloto evidenciam o mau manejo praticado nas explorações. Dentre as 33 práticas de risco avaliadas, as explorações adotam, em média, 23 práticas de risco. As explorações de FCB estão mais expostas às práticas de risco do que as explorações de FSB. Dentre essas 33 práticas de risco avaliadas, 15 delas estão mais presentes em explorações em FCB do que em FSB. Outras 12 práticas de risco são adotadas em proporção muito semelhante ou mesmo igual nos dois tipos de explorações. E apenas 6 das práticas de risco são mais adotadas em explorações em FSB do que em explorações em FCB.

No que diz respeito aos resultados da categoria “Higiene”, conclui-se que o grau de higiene das explorações não é satisfatório, não tanto pelo número de lavagens ser reduzido mas principalmente por não se realizarem desinfecções. A lavagem por si só não é capaz de eliminar *Brucella* que, em condições de estábulo, com baixa luminosidade e condições de temperatura e humidade favoráveis à sua subsistência, resistirá por tempo considerável, permanecendo capaz de infectar os animais do rebanho, como nos diz Garrido-Abellan e colaboradores (2001). Os agricultores mostram-se ignorantes relativamente ao papel da desinfecção, procedendo apenas à troca de camas, remoção do estrume e lavagem das instalações. Quando muito utilizam produtos apenas capazes de eliminar ectoparasitas, sem qualquer capacidade de desinfecção. Assim, apesar de reduzir potencialmente o perigo biológico presente no estábulo, ao remover material potencialmente contaminado, apenas 12,90% das explorações entrevistadas utilizam desinfetantes com regularidade.

Ainda relativamente a esta categoria, nenhuma das explorações procede à limpeza e desinfecção do espaço de isolamento de animais doentes ou suspeitos de doença. Isto representa um perigo por variados motivos: o produtor poderá funcionar como vetor mecânico caso existam materiais contaminados no local de isolamento; os cães com acesso ao estábulo também poderão funcionar como vetores mecânicos devido à liberdade de que gozam nos estábulos (Ganiere, 2004); muitas explorações não possuem verdadeiramente locais de isolamento de animais doentes, simplesmente vedam áreas do estábulo para guardar estes animais, o que faz com que quando o animal doente ou suspeito sair do local de isolamento, esta área do estábulo voltará a ser aberta para o restante do rebanho sem ser limpa nem desinfetada. A falta de cuidado com a indumentária de trabalho e a sua segurança biológica, traduzida pela inexistência de produtores que assumam lavar e desinfetar peças de roupa e calçado que entrem em contato com materiais potencialmente infectados, reafirma o papel de vetor mecânico que o ser humano poderá desempenhar nestas explorações.

Relativamente ao manejo reprodutivo, começaremos pelo isolamento das fêmeas prontas a parir. Como nos diz Radostits e colaboradores (2001), os partos são ocasiões propícias para ocorrer a disseminação da *Brucella* no ambiente tendo em conta que os materiais com maior carga bacteriana são corrimentos uterinos, placentas e abortos. Isolar as fêmeas prestes a parir ganha grande importância por variados motivos, como diminuir a exposição do rebanho ao material potencialmente infetado, impedir a contaminação de pastagens, assegurar que o produtor saiba da ocorrência de cada aborto e do nascimento de crias com baixa viabilidade e dificultar o roubo de placentas e abortados por cães. Pesa a necessidade de instruir os produtores e de mostrar-lhes o prejuízo que a doença pode causar à exploração. Positivamente, os resultados mostram também que, por mais que seja difícil fazer com que maternidades sejam desenhadas de raiz, caso todas as explorações que têm condições de isolar suas fêmeas o fizessem, a percentagem de explorações que passariam a isolar suas fêmeas transitaria de 29,03% para 61,29%, mais do dobro do que os que hoje separam os animais. Conseguir-lo seria ainda mais importante em explorações de FCB. Nestas freguesias 84,62% das explorações poderiam passar a separar as fêmeas antes do parto, pelo que seria uma medida simples e barata de diminuir o risco nestas explorações. O objetivo deveria sempre caminhar para que todas as explorações isolassem suas fêmeas mas tendo em conta que mais de metade das explorações inquiridas podem passar a fazê-lo já na próxima época de parição fica a dúvida se tal não é realizado por falta de incentivo ou por falta de vontade dos agricultores. Mesmo as explorações que isolam os seus animais devem ainda melhorar as condições em que o fazem, o que pode ser facilmente conseguido. O fato de as fêmeas serem isoladas apenas quando se atenta que estão para parir, além de demonstrar que a época de parição não está planeada e o rebanho não está ordenado, possibilita que algumas fêmeas não sejam isoladas antes do parto. Isto implica que nem sequer o isolamento realizado é seguro para prevenir que fêmeas sejam eficazmente impedidas de expor outros animais à *Brucella*. Desta forma, as poucas explorações que isolam suas fêmeas não asseguram que os partos ocorrerão apenas na maternidade. Nota-se ainda que o isolamento é mal conseguido devido à (falta de) desinfeção das maternidades. Esta desinfeção, tal como nos dizem variados autores como Corbel (2006), Radostits (2001) e Garrido-Abellan (2001), é absolutamente fundamental para que o uso de maternidades constitua uma medida efetiva de segurança no manejo reprodutivo da exploração. Tal como no isolamento de animais doentes, muitas vezes as maternidades são locais vedados do próprio estábulo. Repetindo os maus hábitos de higiene, nenhuma maternidade é desinfetada. No caso das explorações em que as maternidades são apenas espaços vedados do estábulo, após a saída da fêmea, todo o rebanho terá acesso a essa área potencialmente contaminada, bem como cães e o próprio

produtor que, devido ao seu descuido quanto à higiene da sua vestimenta, poderá funcionar como vetor mecânico.

O isolamento de fêmeas após o parto não é tão importante quanto antes do parto, a não ser que a fêmea tenha abortado, parido um nado-morto ou um animal pouco viável. Tão pouco pedir-se-á que as fêmeas sejam isoladas durante todo o tempo de potencial risco para o rebanho já que este período é muito longo (i.e. 3 meses para cabras e 3 semanas para ovelhas (Radostits *et al*, 2001)), sendo impraticável no atual sistema de produção de Alfândega da Fé. De acordo com o que nos diz Ganiere (2004), o isolamento de fêmeas após o parto ganha importância pela possibilidade de isolar animais até termos a certeza de que a progénie é viável já que *Brucella* pode não causar aborto mas originar crias muito frágeis. O tempo de isolamento das fêmeas após o parto nas explorações inquiridas varia entre 5 a 15 dias, tempo satisfatório para cumprir estes objetivos. Desta forma previne-se o contato da fêmea infetada com o restante rebanho. Para o caso de uma fêmea infetada parir crias completamente viáveis não há nada a fazer já que será difícil suspeitar da doença.

A troca de reprodutores não é um risco sob condições controladas, uma vez que a monta natural não será um risco de infeção significativo (Garrido-Abellan *et al*, 2001). Poderá vir a ser caso os reprodutores trocados provenham de explorações com classificações sanitárias inferiores. Não surpreende notar que as explorações em FCB tenham uma percentagem maior de explorações que efetuam troca de reprodutores. Não se pode concluir que esta é a causa de haver brucelose nestas freguesias. Pode-se porém apontar como mais uma prática de risco dentre os tantos já existentes em maior proporção neste tipo de explorações. Ganha especial relevância quando lembramos que também nas explorações em FCB havia maior percentagem de explorações que não atentavam para classificação sanitária dos animais que iriam adquirir. Será de esperar que também não o façam quando procederem ao cruzamento de seus animais com animais de outros rebanhos.

Salienta-se, e reprova-se, tanto a não eliminação correta dos materiais resultantes do parto e abortos como o baixo número (apenas 2) de explorações que isolam as fêmeas que abortaram. Todo o animal que aborta deve ser considerado como potencialmente infetado pelo que deve ser afastado do rebanho de maneira a impedir a transmissão. Da mesma maneira, todo o material resultante do parto é potencialmente infetante, pelo que deve ser incinerado ou enterrado, como nos dizem Corbel (2006) e Garrido-Abellan e colaboradores (2001). Em ambos os tipos de exploração assume-se o risco de dar aos cães os produtos do parto e abortos. Seja por iniciativa própria, seja por não terem controlo do trânsito dos cães dentro dos estábulos ou por não isolarem as fêmeas antes do parto, os cães têm livre acesso às placentas e abortos. Mesmo que não se reconheça o papel epidemiológico do cão como

vetor biológico, sabe-se da sua capacidade de funcionar como vetor mecânico, pelo que o acesso dos cães a este tipo de produtos é sempre um risco para o próprio rebanho e para os demais, caso o cão leve estes produtos para zonas de pastoreio (Garrido-Abellan *et al*, 2001, Ganiere, 2004). A correção deste problema é difícil porque exigiria principalmente o isolamento das fêmeas antes do parto. Contudo o problema poderia ser diminuído rapidamente caso os agricultores não dessem aos animais as placentas e abortos e vedassem o acesso dos cães aos estábulos.

Em suma, toda a época de parição deveria ser repensada, começando pelo prévio loteamento do rebanho antes das cobrições. Isso exige um planeamento inexistente nas explorações do concelho para já pelo que medidas como o isolamento de fêmeas em vésperas da parição, isolamento das fêmeas que abortam e higienização das maternidades serão um avanço possível e muito positivo nas explorações do concelho.

A categoria “Sanidade” também abriga práticas de risco tidas frequentemente quer por explorações em FSB, quer por explorações em FCB. Mais do que uma medida de prevenção de brucelose, isolar animais doentes ou suspeitos de doença é uma medida capaz de prevenir a disseminação de qualquer doença infetocontagiosa, pelo que seguramente é uma medida a aplicar. Confirmando as falhas de maneo nas explorações do concelho, uma baixa percentagem de explorações, seja de FCB ou de FSB, promovem o isolamento desses animais. Este isolamento pode ainda ser pouco satisfatório e ter o seu impacto positivo diminuído pela não desinfecção desses espaços aquando da saída dos animais doentes, por morte, cura ou refugio, como já anteriormente mencionado. É necessário dar ao agricultor toda a informação disponível acerca de prevenção da brucelose e dos prejuízos que a doença poderá causar bem como acerca da importância de isolar animais doentes ou suspeitos de doença para a prevenção de brucelose e de outras doenças para o convencer a fazê-lo.

O objetivo de conseguir rebanhos imunizados contra brucelose (i.e. vacinados com Rev- 1) é frustrado a cada época de parição já que parece que animais por vacinar são sempre incorporados no rebanho, não num objetivo de ter animais que servirão como sentinela mas sim por pura negligência dos agricultores. Assim, estas explorações permanecem fragilizadas já que os animais não vacinados, por contraírem mais facilmente a doença e por eliminarem bactérias em maior quantidade para o ambiente, representam um risco acrescido também para os animais vacinados. Também a eficácia da vacinação fica comprometida pois, como nos diz Garrido (1992), uma proteção adequada só é assegurada caso 80% do rebanho esteja vacinado. Não se considera como perigoso para o rebanho a presença dos animais imaturos sexualmente não vacinados destinados à venda.

Passando à categoria de “Alimentação e Pastagem”, analisamos primeiramente a utilização da água. Ordenou-se a água consoante a sua maior segurança biológica através do mais regular controlo químico e biológico e menor probabilidade de contaminação. Assim, a água da rede pública será sempre a melhor opção devido ao controlo químico e biológico feito com maior regularidade. Não é de esperar que a água seja uma fonte importante de contaminação, mas águas de poços, charcos e furos poderão ser mais facilmente contaminadas e certamente serão menos vezes analisadas, representando maior perigo latente, principalmente as águas de poços e charcos. Relativamente à origem da água utilizada na exploração, uma maioria (60%) evita as águas de furos e charcos e 51% delas utiliza apenas água de rede pública.

Caso diferente é a partilha das zonas de abeberamento quando em pastoreio. A partilha da água em si não é um risco, risco poderá ser a partilha do espaço de abeberamento. Assim, ribeiros e fontanários, por exemplo, são um risco pela possibilidade de existência de materiais contaminados na sua envolvência. Em caso de partilha destas zonas com vários rebanhos, um único animal contaminado poderá transmitir a doença aos vários outros rebanhos que partilham estas zonas de abeberamento. Uma percentagem muito alta de explorações assume partilhar zonas de abeberamento com outros ruminantes, quer de FCB quer de FSB. Este é um risco dificilmente minimizável já que os animais em pastoreio não podem ser impedidos de consumir água, sendo uma prática de risco inerente ao modo de criação extensivo em Alfândega da Fé.

Como seria de esperar, a maioria dos rebanhos partilha com outros os pastos e os caminhos para os pastos. Tal como na partilha das zonas de abeberamento isto é inerente ao modo de criação dos rebanhos em Alfândega da Fé. Lembre-se das elevadas percentagens de explorações que assumem a ocorrência de partos no pasto e as baixas percentagens de explorações que isolam animais doentes e fêmeas que abortam e facilmente se conclui que existe um risco grande de animais brucélicos estarem disseminando a bactéria nos pastos e caminhos partilhados por vários rebanhos. Também mais explorações em FCB partilham caminhos e pastos com outros ruminantes do que explorações em FSB.

A transumância em si não constitui uma prática de risco. Só passa a sê-lo caso os pastos utilizados em transumância sejam partilhados com outros rebanhos pelos mesmos motivos apontados no parágrafo anterior. Porém, por mais que todas as explorações que pratiquem transumância admitam que haja partilha destas áreas com outros rebanhos, a maior percentagem de explorações não pratica transumância, permitindo considerar que esta prática terá pequena importância epidemiológica se comparada com as outras tantas práticas de risco existente no manejo destas explorações em estudo.

Diversos autores como Corbel (2006), Garrido-Abellan e colaboradores (2001) e Megersa e colaboradores (2011) atentam para o perigo que representam práticas de risco como a partilha de áreas de pastoreio e caminhos e a transumância por possibilitarem o contato entre os animais do rebanho com outros ruminantes, animais selvagens e cães. Mesmo assim as práticas de risco analisadas nesta categoria são dificilmente elimináveis por serem inerentes ao regime de criação dos rebanhos que não será alterado. A eliminação dessas práticas de risco ou a diminuição da sua importância epidemiológica terá de ser conseguida fundamentalmente através de mudanças de manejo, principalmente o manejo reprodutivo e a nível da sanidade animal no próprio estábulo.

Analisamos os resultados da categoria “Informações Gerais”. Conhecer os sinais clínicos de brucelose será importante para detetar mais facilmente animais potencialmente infetados no rebanho. Apesar de mais da metade dos agricultores conhecerem os sinais da brucelose deve-se encarar estes números com alguma reserva por dois motivos: primeiro porque a maioria ignora os sinais clínicos que não o aborto; segundo porque mesmo sabendo que o aborto poderá indicar brucelose, apenas um dos agricultores inquiridos comunica a ocorrência de abortos às autoridades competentes, como é sua obrigação. A não declaração do aborto, além de uma infração às normas em vigor, corroborada com as altas percentagens de reintegração das fêmeas que abortaram, indicam que os agricultores não dão a atenção necessária aos abortos no rebanho, sinal clínico mais evidente (ainda que não patognomónico) de brucelose, que os produtores afirmam conhecer.

No que diz respeito ao impacto económico da brucelose, informação tão importante já que será o mais crucial para fazer produtores empenharem mais esforço e investirem na profilaxia da doença, pouco mais de metade dos agricultores admitem conhecer este impacto. Saliente-se a diferença de mais de 20 pontos percentuais entre produtores FCB e FSB, em favor dos últimos. Ainda que esta maioria de cientes surpreenda, já que seria de esperar que tal não se verificasse, mais uma vez estes valores devem ser encarados com reserva já que se suspeita que os únicos prejuízos contabilizados pelos produtores sejam os consequentes dos abortos, não incluindo gastos adicionais com recolhas sanguíneas, impedimento do livre comércio dos animais da exploração, etc., ou seja, tendo uma noção muito estreita do total prejuízo que a instalação da brucelose pode causar à saúde financeira da exploração. Este inclusive é um dos pontos que o PNEB 2012 pretende ver melhorado, a ciência do impacto económico que a brucelose causa, por saber que será vital para angariar maior cooperação da parte dos produtores para prevenir a doença.

Possivelmente auxiliando a explicar as várias falhas de manejo, no que se refere à prevenção da brucelose, está a ignorância dos agricultores relativamente à medidas de

prevenção para além da vacinação. A maioria das explorações, tanto em FSB quanto em FCB, assumem desconhecer outros meios de prevenção da brucelose além da vacinação. Destaca-se, contudo, que uma percentagem mais elevada de explorações em FSB do que em FCB conhece outros mecanismos de prevenção. Este resultado poderá indicar que os produtores apenas não fazem melhor por não serem bem instruídos. Porém, conhecendo o trabalho de veterinários no terreno, constata-se que muitos produtores simplesmente ignoram ordens e conselhos dados pelos mesmos. Talvez uma campanha forte de educação no sentido da prevenção da brucelose fizesse sentido mas não será certamente a solução definitiva para o problema da doença.

Relativamente à Febre de Malta, os valores não servirão para relacionar diretamente com a ocorrência de brucelose animal na exploração ou freguesia de origem/trabalho do produtor por dois motivos: porque a doença pode ter sido contraída em outro local que não seu próprio rebanho; porque a doença poderá ter sido contraída há anos atrás, quando a classificação sanitária do rebanho era outra e o estatuto de indemne/não indemne da freguesia também.

Por fim a categoria “Trânsito animal”. Como nos diz Ganiere (2004), o comércio de animais desempenha um papel importante na infeção de rebanhos indemnes. Não só mais explorações em FCB adquirem animais como o número de animais comprados no último ano foi maior. Isto vem de encontro com a expectativa, já que se admite que: a introdução de um animal brucélico é um dos maiores perigos para rebanhos livres de brucelose (Ganiere, 2004); muitas trocas comerciais são feitas ilegalmente, com existência de negociantes que vendem animais de proveniência desconhecida. Adquirir animais provenientes de outras explorações é um risco, fazê-lo sem se certificar que este animal provém de exploração classificada como B3 ou B4 é um risco muito maior. A maioria das explorações atentam para a classificação sanitária do rebanho antes de lhe comprar animais. Porém, uma percentagem considerável dos inquiridos, 22,58%, admitem que a classificação sanitária do rebanho não é uma preocupação. Sem surpresa, as explorações em FCB assumem mais frequentemente esta prática de risco, podendo ser mais um fator que influencia a existência de brucelose nestas freguesias.

A quarentena é utilizada para dar tempo aos animais introduzidos de manifestarem sinais clínicos da doença (Garrido-Abellan *et al*, 2001). A quarentena de animais recém-adquiridos está assim vivamente aconselhada apesar de não se poder nunca afirmar que será o incumprimento deste conselho a causa da existência de brucelose na população. Seria um objetivo conseguir que as explorações passassem a realizar a quarentena destes animais mas, talvez, primeiramente, será melhor garantir que os produtores que realizam a quarentena

o façam pelo período adequado de (pelo menos) 30 dias, como nos é dito por Garrido-Abellan e colaboradores (2001). Ainda relativamente aos animais recém-adquiridos, uma prova serológica poderá fazer a diferença entre a deteção precoce de um animal seropositivo e a disseminação de *Brucella* pelo estábulo e pastos, já que a realização destas provas possibilitará eliminar animais seropositivos o mais rapidamente possível. Tanto a quarentena quanto a realização de provas serológicas são mais frequentes entre explorações em FSB, ajudando a mantê-las mais seguras.

O parâmetro a seguir avaliado é sintomático das falhas gritantes de manejo na larga maioria de explorações de Alfândega da Fé. O fato da esmagadora maioria dos agricultores aceitar comprar animais adultos não vacinados, introduzindo-os em rebanhos onde a maior parte dos animais está vacinado, é uma falha preventiva enorme. Sabe-se tão pouco ser objetivo dos agricultores adicionar ao rebanho “animais sentinela”, pelo que introduzir animais não vacinados é indesculpável. Aqui não existe uma diferença significativa entre os dois tipos de exploração. A introdução de animais não vacinados corre lado a lado com a frequente perda da época de vacinação dos animais para recria, atrasando o objetivo estipulado de conseguir rebanhos com 100% de animais imunizados.

## 6 - Conclusão

O inquérito-piloto apresenta algumas limitações que deverão ser corrigidas. Primeiramente, deveria ser definido objetivamente parâmetros para proceder a avaliação do grau de higiene da exploração como “boa”, “regular”, ou “má”, de maneira a evitar flutuações entre a avaliação por diferentes inquiridores. Perguntas na categoria de “Informações Gerais” deveriam ter associadas alíneas de resposta curta para que o produtor pudesse confirmar a validade da sua resposta, por exemplo, citando formas de prevenção de brucelose ou os sinais clínicos de brucelose que conhece. Esta é a única forma de assegurar que o produtor conhece de fato a doença e poderá pontuar nestas questões. Sugere-se também que se retire a pergunta 5.4 (Quantos partos ocorreram nos pastos na última época de parição?) uma vez que poucos são os produtores que sabem precisar e não será possível saber quão fiáveis eles serão ao projetar a percentagem que respondem. Possíveis questões relevantes para compreender a epidemiologia da doença na região poderão ter sido ignoradas. Porém deve-se levar em conta que um inquérito para um estudo como este não poderia nunca ser muito extenso, correndo o risco de perdermos a boa vontade dos produtores e/ou não saberem os mesmos responder a algumas das questões, pelo que as questões do inquérito foram aquelas consideradas mais importantes e que seriam mais fáceis para obter uma resposta satisfatória.

O estudo ainda concretiza a noção existente do fraco manejo das explorações do concelho, evidenciado pelo elevado número de práticas de risco adotadas pelas explorações (23,1 em 33 práticas de risco avaliadas em média por exploração). Apesar de não ter sido realizada a análise estatística também torna claro que explorações situadas em freguesias com brucelose adotam maior número de práticas de risco do que as explorações situadas em freguesias sem brucelose. Evidencia ainda a possibilidade de mudanças imediatas serem conseguidas com maior empenho dos produtores e maior informação por parte das autoridades veterinárias competentes. Será necessário promover uma mudança de postura e mentalidade nos produtores da região. Acreditamos que ações de formação são importantes já que providenciar informação será a forma mais fácil de incentivar o produtor a reparar as falhas de manejo encontradas. Para conseguir esse incentivo será importante propor medidas praticáveis sem necessitar de grandes investimentos financeiros e que possam ser tomadas imediatamente, sem interferir com o modelo de criação dos animais da região. Devido à sua proximidade dos agricultores, os veterinários das OPP terão um papel importante na deteção dos práticas de risco e nas instruções para reparar as falhas de manejo.

Todavia compreendemos que apenas uma pequena fatia dos produtores aconselhados por veterinários e participantes de ações de formação irão de fato pôr em prática as medidas recomendadas, muito por fatores anteriormente enunciados aquando da

caracterização da área de estudo, como a fraca rentabilização da atividade ou a postura despreocupada tida com a mesma. Deverá então ser papel do Estado assegurar que as leis que já vigoram são efetivamente cumpridas, de maneira a salvaguardar os rebanhos indemnes. Deste modo, será papel do Estado combater o comércio informal de animais, eliminar rebanhos clandestinos, punir produtores que desrespeitem o sequestro e as medidas de profilaxia sanitária propostas por veterinários oficiais e que possuam animais para recria sexualmente maduros não vacinados.

Por fim, creio que este estudo ganha ainda maior relevância quando se conhece a realidade da produção de gado caprino e ovino na região de Trás-os-Montes, nomeadamente no distrito de Bragança. Quem, de fato, conhece esta realidade saberá que as conclusões e resultados deste estudo fatalmente serão notadas na vasta maioria das explorações da região muito devido à semelhança no manejo praticado e na mentalidade e aptidão dos produtores da região.

Apesar do combate à brucelose ter sido iniciado há décadas atrás, fatores de risco persistem ainda na totalidade das explorações da região, inerentes ao sistema de criação e ligados à falhas no manejo praticado pelos produtores. Como Portugal procura erradicar a doença em todo o território nacional, será fundamental seguir com apertada epidemiovigilância, manter as medidas de combate e endurecer a fiscalização dos rebanhos e do cumprimento das leis em vigor, já que o abrandamento destas medidas poderá ter consequências graves.

## Bibliografía

- Abeledo M.A., Beranza R., Chessani M.A., Herrera D.I., Martínez E.A., Martínez J.E., Mendoza M., Romero E.L. Aislamiento de *Brucella Melitensis* Biovar 1 en Leche de Cabras de la Comunidad de Tenextepec, Municipio de Perote, Veracruz, México. Rev. Salud Anim. Vol. 23 No. 2, 2001: 123-127.
- Adams L.G., Davis D., Ficht T., Kopec J., Templeton J., Williams J. *Brucella abortus* in captive Bison. Serology, Bacteriology, Pathogenesis and Transmission to Cattle. Journal of Wildlife Diseases, 1990: Vol 26 No. 3: 360-371.
- Alonso-Urmenete B., Aragón V., Blasco J.M., Díaz R., Díaz-Aparicio E., Marín C., Moriyón I., Pérez-Ortiz S. Evaluation of Serological Tests for Diagnosis of *Brucella melitensis* Infection of Goats. Journal of Clinical Microbiology, Maio 1994: Vol 32, No.5: 1159-1165.
- Anderson T.D., Cheville N.F., Meado P.V. Pathogenesis of Placentitis in the Goat Inoculated with *Brucella abortus*. 11. Ultrastructural Studies. Vet. Pathol. 1986; 23: 227-239.
- Alton Godfrey G. *Brucella melitensis*. In: Nielson Klaus, Duncan J Robert *Animal Brucellosis* 1990; 383-409.
- Anónimo. Ovine and Caprine Brucellosis: *Brucella melitensis*. The Center for Food Security and Public Health. Iowa State University, College of Veterinary Medicine. 2007.
- Anónimo. Brucellosis. The Center for Food Security and Public Health. Iowa State University, College of Veterinary Medicine. 2007.
- Aune K., Corso B., Rhyhan J., Roffe T., Russell R. Environmental Persistence of *Brucella abortus* in the Greater Yellowstone Area. The Journal of Wildlife Management 2011; 9999: 1-9.
- Banai M., Lang R., Lishner M., Rubinstein E. Brucellosis. International Journal of Antimicrobial Agents 5 1995; 203-208.
- Barberan M., Blasco J.M., Díaz R., Hernandez I.A., Jimenez de Bagues M., Marin C., Molina L., Moriyón I., Velasco J. Evaluation of Allergic and Serological Tests for Diagnosing *Brucella melitensis* Infection in Sheep. Journal of Clinical Microbiology, Agosto. 1994; Vol 32 No. 8: 1835-1840.
- Beer J. Enfermedades Infecciosas de los Animales Domesticos, Tomo II, Enfermedades Producidas por Bacterias y Hongos e Intoxicaciones. In: Editorial Acubia, 1981: 162-163.

- Benkirane A. Surveillance épidémiologique et prophylaxie de la brucellose des ruminants: l'exemple de la région Afrique du Nord et Proche-Orient. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz, 2001, 20 (3), 757-767.
- Benkirane A., Berrada J., Bouslikhane M., El Idrissi A.H., El Maadoudi M., Zerouali A. Comparison of the efficacy of *Brucella abortus* strain RB51 and *Brucella melitensis* Rev. 1 live vaccines against experimental infection with *Brucella melitensis* in pregnant ewes. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz, 2001, 20 (3), 741-747.
- Benkirane A., Blasco J.M., Dalrymple M.R., MacMillan A.P., MacDiarmid S.C., Murray J.G., Ragan V., Robinson A., Salman M., Van-Ham M. Guidelines for coordinated human and animal brucellosis surveillance. Animal Production and Health Division - FAO Agriculture Department. FAO Animal Production and Health Paper 2003: 156.
- Blasco, J. M. Control and eradication strategies for *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. Prilozi Makedonska akademija na naukite i umetnostite Oddelenie za biosloski i medicinski nauki. Contributions Macedonian Academy of Sciences and Arts Section of Biological and Medical Sciences, 2010; 31(1), 145-165.
- Blood D.C., Gay C.C., Hinchcliff K.W., Radostits O.M. Clínica Veterinária, Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos. In: Guanabara Koogan. 9ª edição, 2001: 798-800.
- Castro H.A., González F.R., Prat, M.I. Brucelosis: una revision práctica. Acta Bioquím Clín Latinoam 2005; 39 (2): 203-16.
- Corbel M.J. Brucellosis in humans and animals. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Organization for Animal Health, World Health Organization. 2006.
- Corbel M.J. Brucellosis: An Overview. 1st International Conference on Emerging Zoonoses Jerusalem, Israel. Vol. 3, No. 2, Abril-Junho 1997.
- Costa D., Neto F., Poeta P., Rodrigues J. Resposta imunitária à vacinação conjuntival com a estirpe Rev.1 de *Brucella melitensis* em ovinos e caprinos. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. (online) 2003; vol.55, n.2: 220-222 .
- Costa M., Paixão T., Santos R. The genus *Brucella* and clinical manifestations of brucellosis. Ciência Rural, Santa Maria, Outubro 2009; Vol.39, No.7: 2252-2260.
- Crespo León, F. Influencia de los Elementos y Factores Geográficos en la Epidemiologia de la Brucelosis del Ganado Ovino y Caprino. Papeles de

Geografia, 1994; 20, 189-209.

Decreto-Lei n.º 244/2000, de 27 de Setembro de 2000. Diário da República I Série. Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa.

Direcção Geral de Veterinária [DGV]. Manual de Procedimentos para a Classificação Sanitária dos Efectivos: No Âmbito dos Programas de Erradicação da Tuberculose, Brucelose e Leucose Enzoótica Bovinas e da Brucelose dos Pequenos Ruminantes. Direcção Geral de Veterinária [DGV], Ministério da Agricultura Pescas e Florestas. 2005.

Direcção Geral de Veterinária [DGV]. Programa de Erradicação da Brucelose dos Pequenos Ruminantes. Lisboa: Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas. 2012

Duran-Ferrer M., Garrido-Abellan F., MacMillan A., Minas A., Nicoletti P., Vecchi G. Brucellosis in Sheep and Goats (*Brucella melitensis*). European Commission – Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare. 2001.

Ferreira A. J. Doenças Infecto-contagiosas dos Animais Domésticos. In: Edição da Fundação Augusto Gulbenkian. 3ª edição, 1979: 170-177.

Fernandes M. Brucelose dos Pequenos Ruminantes: Estudo de Focos da Área Administrativa da Divisão de Intervenção de Vila Real. 2012.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Brucella melitensis* in the Eurasia and the Middle East. FAO technical meeting in collaboration with WHO and OIE Rome, May 2009.

Franco, M. P., Mulder, M., Gilman, R. H. & Smits, H. L. Human brucellosis. The Lancet Infectious Diseases, 2007; 7 (12), 775-786.

Ganiere J. La Brucellose Animale. Ecoles Nationales Veterinaires Française – Unités de Pathologie Infectieuses. 2004.

Garrido-Abellan, F., Duran-Ferrer, M., Macmillan, A., Minas, A., Nicoletti, P., Vecchi, G. Brucellosis in Sheep and Goat (*Brucella melitensis*). Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare. European Commission. 2001.

Godfroid, J., Cloeckaert, A., Liautard, J. P., Kohler, S., Fretin, D., Walravens, K., Garin Bastuji, B. & Letesson, J. J. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a reemerging zoonosis. Veterinary Research, 2005; 36 (3), 313-326.

Grilló, M. J., Barberán, M. & Blasco, J. M. Transmission of *Brucella melitensis* from sheep

- to lambs. *Veterinary Record*, 1997; 140 (23), 602-605.
- Gul S.T., Khan A. Epidemiology and Epizootology of Brucellosis: a Review. *Pakistan Vet. J.*, 2007; 27(3): 145-151.
- den Hartigh, A.B., Paixão T.A., Santos R.L., Tsolis R.M., Xavier M.N. Pathogenesis of *Brucella* spp.. *The Open Veterinary Science Journal*, 4, 2010: 109-118.
- Láu H.D. Brucelose: Uma Ameaça Para a Pecuária em Áreas de Fronteira Agrícola da Amazônia. Embrapa Amazônia Oriental. *Recomendações Básicas*, Julho 1997; 33.
- Lorente I., Martínez-Campos A., Pérez J., Ruiz J., Simarro E. Diagnosis of Brucellosis by Using Blood Cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, Setembro 1997; Vol. 35 No. 9: 2417–2418
- Mainar-Jaime, R. C., Vázquez-Boland, J. A. Associations of veterinary services and farmer characteristics with the prevalences of brucellosis and border disease in small ruminants in Spain. *Preventive Veterinary Medicine* 1999; 40 (3-4): 193- 205.
- Marín, C. M., Moreno, E., Moriyón, I., Díaz, R., Blasco, J. M. Performance of Competitive and Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assays, Gel Immunoprecipitation with Native Hapten Polysaccharide, and Standard Serological Tests in Diagnosis of Sheep Brucellosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 1999; 6 (2), 269-272.
- Mantur, B. G., Mangalgi, S. S., Mulimani, M. *Brucella melitensis*-a sexually transmissible agent? *Lancet*, 1996; 347 (9017), 1763.
- Martin-Mazuelos, E., Nogales, M., Florez, C., Gómez-Mateos, J., Lozano, F., Sanchez, A. Outbreak of *Brucella melitensis* among microbiology laboratory workers. *Journal of clinical microbiology*, 1994; 32 (8), 2035-2036.
- Martins M. Avaliação dos Fatores Limitantes à Obtenção de Estatuto de Área Indemne de Brucelose nos Pequenos Ruminantes no Sul da Beira Interior (Portugal). 2001.
- Maurin, M. La brucellose à l'aube du 21e siècle. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 2005; 35, 6-16.
- Megersa, B., Biffa, D., Niguse, F., Rufael, T., Asmare, K., Skjerve, E. Cattle brucellosis in traditional livestock husbandry practice in Southern and Eastern Ethiopia, and its zoonotic implication. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 2011; 53 (1), 24.
- Nicoletti, P. Brucellosis: past, present and future. *Prilozi*, 2010; XXXI(1), 21-32.
- Office International des Epizooties [OIE]. *OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, Vol. 2, 6th edition. Paris: Office International des Epizooties. 2009

Portaria nº 3/95, de 3 de Janeiro de 1995. Diário da república I Série. Ministério da Agricultura.

Ramirez-Pfeiffer, C., Nielsen, P., Smith, K., Marín-Ricalde, F., Rodríguez-Padilla, C., Gomez-Flores, R. Application of the Fluorescence Polarization Assay for Detection of Caprine Antibodies to *Brucella melitensis* in Areas of High Prevalence and Widespread Vaccination. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2007; 14 (3), 299-303.

Reviriego, F. J., Moreno, M. A., Domínguez, L. Risk factors for brucellosis seroprevalence of sheep and goat flocks in Spain. *Prev Vet Med*, 2000; 44 (3-4), 167-173.

Robinson, A. Guidelines for Coordinated Human and Animal Brucellosis Surveillance. Rome, Italy: FAO Animal Production and Health Paper 156. 2003.

Russell A.D., Koulikovskii A.V., Yarnych V.S. Guidelines on Disinfection in Animal Husbandry for Prevention and Control of Zoonotic Diseases. World Health Organization. 1984.

SANCO. Working Document on Eradication of Bovine, Sheep and Goats Brucellosis in the EU accepted by the "Bovine" and "sheep and Goats" Brucellosis subgroups of the Task Force on Monitoring animal disease eradication. 2009.

Vaz Y., Valentim R.C. Guia Sanitário para Criadores de Pequenos Ruminantes. Instituto Politécnico de Bragança. 2012: 25-35; 65-67.

Weynants, V., Gilson, D., Cloeckaert, A., Denoel, P. A., Tibor, A., Thiange, P., Limet, J. N., Letesson, J. J. Characterization of a monoclonal antibody specific for *Brucella* smooth lipopolysaccharide and development of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay to improve the serological diagnosis of brucellosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 1996; 3 (3), 309-314.

World Health Organization. The Development Of New/Improved Brucellosis Vaccines: Report Of WHO Meeting. Genebra, Suíça. 1997.

World Health Organization. Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis. Genebra, Suíça. 1986.

Young E.J. Principles and Practices of Clinical Bacteriology. In: Gillespie S., Hawkey P., eds. *Brucella* spp. 2ª ed. Wiltshire, England: Anthony Rowe Ltd, 2005: 265-268.

Na internet:

<http://www.the-icsp.org/subcoms/Brucella.htm>, em 02/03/2013

<http://ci.vbi.vt.edu/pathinfo/pathogens/melitensis.html>, em 08/03/2013

**Anexo I – Plano para erradicação da brucelose em rebanhos 2.1 e esquemas de controlo em rebanhos B3 e B4.**

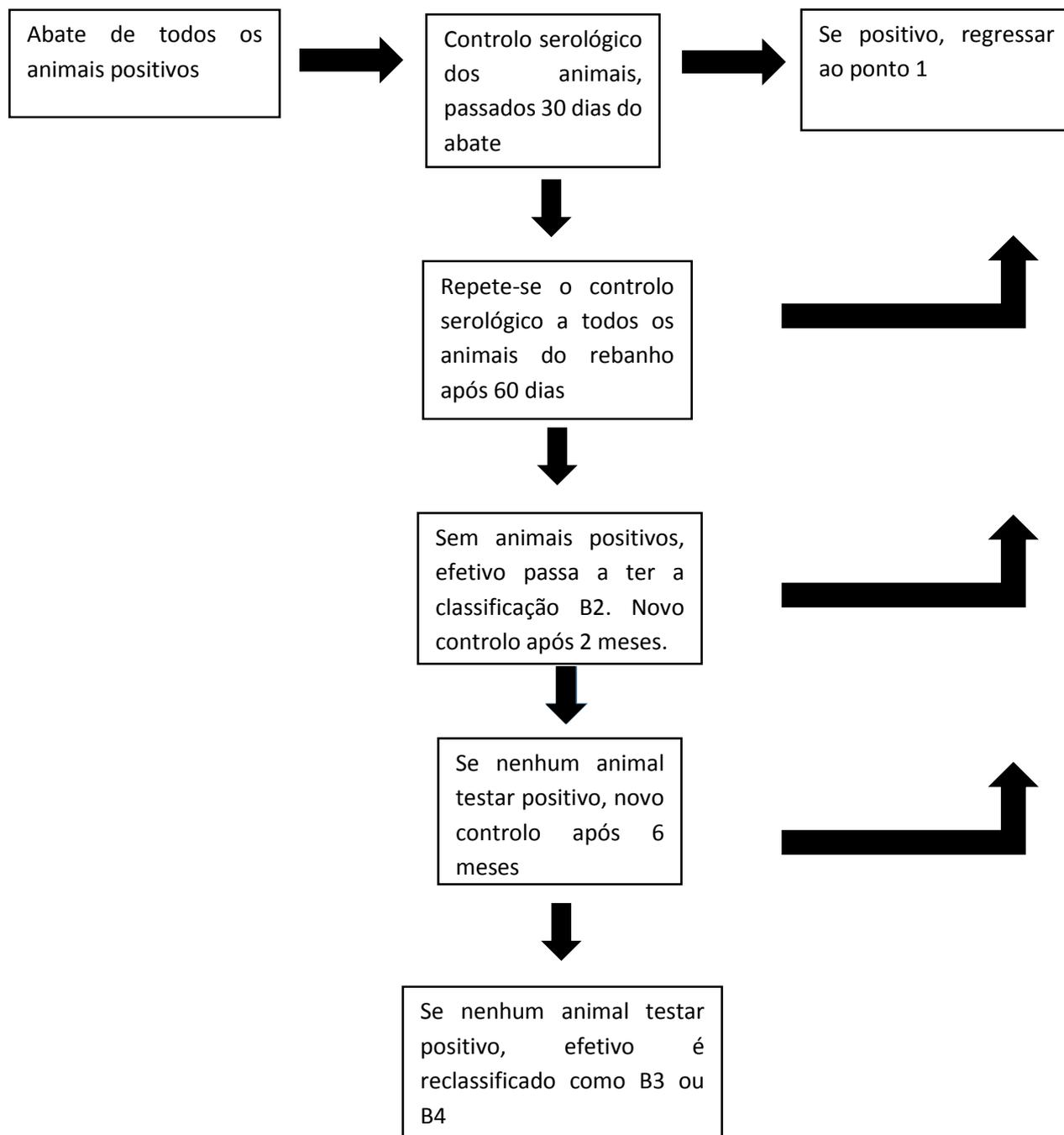


Figura 6 - Plano para erradicação da Brucelose em rebanhos classificados como B2.1

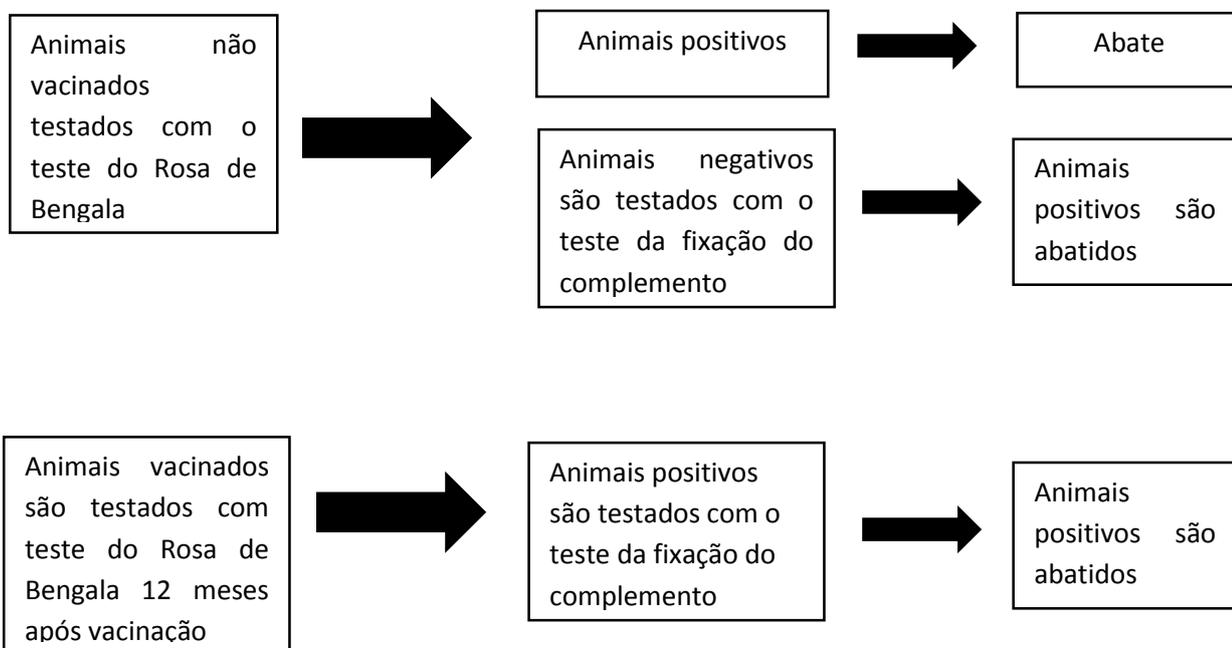
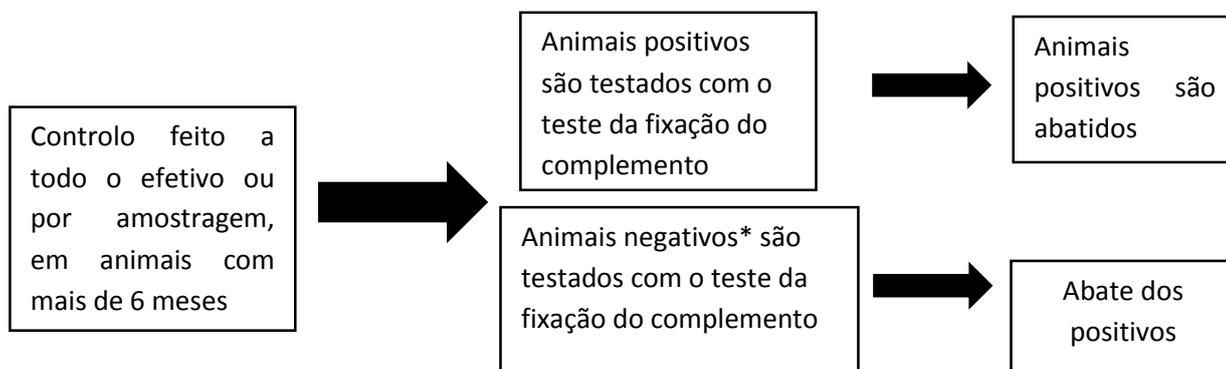


Figura 7 - Esquema de controlo em rebanhos classificados como B3



\*: nos efetivos em que mais de 5% das amostras apresentem reação positiva ao RB, ou, em que pelo menos um animal apresenta reação positiva à FC ou ao RB (neste último caso por determinação da DSVR – Direção de Serviços Veterinários das Regiões)

Figura 8 - Esquema de controlo em rebanhos classificados como B3 e B4.

## Anexo II – Inquérito-piloto

### 1- Identificação do proprietário e exploração

Nome: \_\_\_\_\_ Marca de exploração: \_\_\_\_\_

### 2 – Efetivo

2.1 – Animais existentes na exploração:

Ovinos       Caprinos       Ovinos e caprinos       + Bovinos

2.2 – Constituição atual do efetivo: Fêmeas: \_\_\_\_\_ Machos \_\_\_\_\_

2.3 – Classificação sanitária do efetivo relativamente a brucelose: \_\_\_\_\_

### 3 - Trânsito animal

3.1 – Entraram os últimos 12 meses animais de outras explorações?

Sim       Não

3.2 - Em média, quantos animais adquire, por ano? \_\_\_\_\_

3.3 - Certifica-se de que o animal adquirido é proveniente de exploração classificada como B3?

Sim       Não

3.4 - Realiza quarentena dos animais adquiridos?

Sempre       Ocasionalmente       Nunca

3.4.1 - Se sim, de quantos dias?

30 ou mais dias       Menos de 30 dias

3.5 - Realiza provas serológicas para despiste de brucelose aos animais recém-adquiridos?

Sim, sempre.       Sim, ocasionalmente       Não, nunca.

3.6 - Aquando da aquisição de animais adultos, exige que estejam vacinados contra brucelose?

Sim       Não

### 4 - Higiene

4.1 - Com que frequência limpa e desinfeta o estábulo?

Nunca       Anualmente       Até 6 vezes por ano

Entre 7 a 12 vezes por ano       Mais de 12 vezes por ano

4.2 - Qual o produto utilizado para a desinfecção? \_\_\_\_\_

4.3 - Condições de higiene do estábulo:

Boa       Regular       Má

4.4 – Promove a desinfecção de roupa e instrumentos que entrem em contato com materiais resultantes do parto?

Sim       Não

4.5 – Utiliza o mesmo vestuário na maternidade/locais de isolamento dos animais suspeito e nas demais áreas do estábulo?

Sim       Não

4.6 – Realiza a limpeza e desinfecção do local de isolamento de animais suspeitos após a saída desses animais?

Sim       Não

## 5 - Maneio reprodutivo

5.1 - Há isolamento dos animais antes dos partos?

Sim  Não, mas tem meios de o fazer.  Não e não tem meios de o fazer.

5.2 - Os animais são isolados por quanto tempo antes do parto?

Pelo menos uma semana antes do parto  Nunca

Apenas quando se atenta que o animal está para parir

5.2.1 – Onde são isolados os animais?  Outro edifício  Com os restantes animais

5.2.2 - Entre cada utilização, o que é feito nas maternidades?

Troca das camas e desinfeção  Apenas Desinfeção

Apenas troca das camas  Nada

5.3 – Local do parto:

Maternidade  Outro espaço do estábulo  Pasto

5.4 – Quantos partos ocorreram nas pastagens ao fim da última época de parição? \_\_\_\_\_ %

5.5 - Os animais são isolados após o parto? Quanto tempo?  Sim \_\_\_\_ dias  Não

5.6 – O que faz com fetos, abortos, nados mortos e secundinas?

( ) Enterro e/ou incineração ( ) Nenhuma ação especial

5.7 - Efetua troca de reprodutores com outros proprietários?  Sim  Não

5.8 – Fêmeas que abortaram são:  Isoladas das restantes  Reintegradas

## 6 - Sanidade

6.1 - Faz a separação de animais doentes ou suspeitos de doença?

Sim  Não, mas tem meios de o fazer.  Não e não tem meios de o fazer.

6.2 - Existem animais não vacinados (REV-1) no rebanho?  Sim  Não

6.3 - Os cães comem os produtos do parto e abortos?  Sim  Não

## 7- Alimentação e pastagem

7.1 - Qual a origem da água de bebida?  Rede pública  Furo  Poços/charcas

7.2 – Há partilha da zona de abeberamento com outros ruminantes?  Sim  Não

7.3 – Há partilha de áreas de pasto/caminhos com outros ruminantes?  Sim  Não

7.4 – Pratica transumância?  Sim  Não

7.4.1 – Há partilha com outros rebanhos, nas áreas de transumância?  Sim  Não

## 8 – Informações gerais

8.1 – Conhece quais são os sinais clínicos de brucelose?  Sim  Não

8.2 – Conhece o impacto económico causado pela doença?  Sim  Não

**8.3** – Conhece métodos de prevenção a brucelose para além da vacinação?

Sim       Não

**8.4** – Comunica à OPP quando ocorre qualquer aborto?  Sim  Não

**8.5** – Há algum caso de brucelose humana dentre os trabalhadores/familiares dos trabalhadores da exploração?

Sim       Não