

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Fatores de risco da (re-)incidência de brucelose em
pequenos ruminantes**

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Cristiana Gonçalves Castelo

Orientador: Professor Doutor João Carlos Caetano Simões



Janeiro, 2019

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Fatores de risco da (re-)incidência de brucelose em pequenos ruminantes

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Cristiana Gonçalves Castelo

Orientador: Professor Doutor João Carlos Caetano Simões

Composição do Júri:

Doutor Carlos Alberto e Silva Venâncio

Doutor Nuno Francisco Fonte Santa Alegria



Vila Real, 2019

“As doutrinas apresentadas nesta dissertação
são da exclusiva responsabilidade do autor.”

Agradecimentos

Começo por agradecer ao Prof. Doutor João Carlos Simões pela oportunidade de trabalhar num tema tão interessante e pela orientação dada ao longo de todo o percurso.

A todos os que trabalham na OPP Vinhais, um obrigado pela forma como me acolheram e fizeram sentir em casa. Um obrigado especial ao Ricardo Primo, pela amizade e por todos os conselhos transmitidos.

Aos meus pais por todo a amor, paciência e dedicação que sempre demonstraram.

Resumo

A brucelose dos pequenos ruminantes é uma zoonose com impacto em Portugal, traduzindo-se em perdas económicas significativas, tanto para os produtores como para o país. A região de Trás-os-Montes e particularmente o concelho de Vinhais continuam com valores de prevalência e incidência da doença superiores à média nacional. Este trabalho teve como objetivo determinar quais os principais fatores de risco responsáveis pela elevada prevalência e incidência da doença na região entre o período de 2014 e 2017. Foi realizado um inquérito epidemiológico a 44 explorações, 25 das quais identificadas como reincidentes e/ou de maior seroprevalência e as restantes 19 sem historial de brucelose pelo menos desde de 2006 (grupo controlo). De acordo com a análise logística multivariada ($P < 0.001$), a não reposição dos efetivos com animais vacinados com a vacina Rev 1 (*odds ratio* = 18.47; $P = 0.002$), a ocorrência de mais de 50% dos partos em pastos ou caminhos (*odds ratio* = 24.17; $P = 0.001$) e a ausência de explorações vizinhas indemnes de brucelose (*odds ratio* = 7.79; $P = 0.01$) foram determinantes para a perpetuação da doença no período em estudo. Conclui-se que a vacinação dos jovens animais e o controlo dos partos, e dos anexos placentários, em zonas comuns ou abertas são práticas a considerar prioritárias para a erradicação da brucelose nesta unidade epidemiológica.

Palavras-chave: Brucella; Caprinos; Erradicação de Brucelose; Ovinos; Seroprevalência

Abstract

Small ruminant brucellosis is a major zoonosis in Portugal, resulting in significant economic losses for both the producer and the country. The region of Trás-os-Montes and particularly the county of Vinhais remains with prevalence and incidence values higher than the national average. The aim of this study was to determine the main risk factors responsible for the high prevalence and incidence of the disease in this area. An epidemiological survey was carried out on 44 herds, 25 of which were identified as recurrent and/or higher seroprevalence between 2014-2017, and the remaining 19 without history of brucellosis at least since 2006 (control group). According to the multivariate logistic analysis ($P < 0.0001$), the non-replacement of the herds with animals vaccinated with Rev.1 vaccine (*odds ratio*= 18.47; $P= 0.002$), the occurrence of more than 50% of parturitions in common paths and pastures (*odds ratio*= 24.17; $P= 0.001$) and the absence of neighboring brucellosis-free herds (*odds ratio*= 7.79, $P= 0.01$) were determinant for the perpetuation of the disease in the study period. As conclusion, the vaccination of young animals and control of parturitions and placental annexes, in common or open areas are practices to be considered as priorities for the eradication of brucellosis in this epidemiological unit.

Keywords: Brucella; Eradication of brucellosis; Goat; Seroprevalence; Sheep

Índice de Tabelas

Tabela 1. Variáveis incluídas no modelo estatístico inicial.....	30
Tabela 2. Procedimentos em percentagem de rebanhos com e sem brucelose.....	31
Tabela 3. Odds ratio (OR) para os fatores de risco no rebanho.....	32

Lista de Siglas e Abreviaturas

DGAV	Direção Geral de Alimentação e Veterinária
DSAVR	Direção de Serviços de Alimentação e Veterinária
FC	Fixação de Complemento
IC 95%	Intervalo de Confiança de 95%
IFAP	Instituto Financiamento da Agricultura e Pescas
INIAV	Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária
NZD	Doenças zoonóticas negligenciadas (Neglected zoonotic diseases)
OPP	Organização de Produtores Pecuários
OR	Odd ratio
PISA	Programa informático de Saúde Animal
RB	Rosa Bengala
SNIRA	Sistema Nacional de Informação e Registo Animal
WHO	Organização Mundial de Saúde Animal. (World Organization for Animal Health)

Índice geral

Índice de Tabelas	VII
Lista de Siglas e Abreviaturas	VIII
Parte I - Revisão bibliográfica.....	1
1. Introdução	1
1.1. Taxonomia do género <i>Brucella</i>	2
1.2. Hospedeiros.....	3
2. Brucelose em pequenos ruminantes	3
2.1. Vias de transmissão.....	3
2.2. Infeções cruzadas entre espécies.....	4
2.3. Suscetibilidade dos hospedeiros.....	4
2.3.1. Idade.....	4
2.3.2. Espécie e raça	4
2.4. Fontes de infeção	5
2.5. Outros fatores	5
2.6. Patogenia em Animais	6
3. Características zoonóticas	7
3.1. Transmissão ao Homem	7
3.2. Doença no Homem	8
3.3. Risco ocupacional- Prevenção da brucelose no Homem	8
3.3.1. Produção pecuária	8
3.3.2. Processamento de produtos de origem animal	9
3.3.3. Laboratório.....	9
3.3.4. Consumo de produtos.....	10
4. Diagnóstico	11
4.1. Identificação do agente	11
4.2. Esfregaços corados	11
4.3. Cultura	12
4.4. Identificação.....	13
4.4.1. Identificação das estirpes vacinais	13
4.5. Testes serológicos	13
4.5.1. Rosa bengala	14
4.5.2. Fixação complemento	14

5.	Prevenção, controlo e erradicação da brucelose animal.....	15
6.	Vacinação	16
6.1.	Vacinação em pequenos ruminantes	16
6.1.1.	Vacinação com doses reduzidas de Rev. 1	17
6.1.2.	Vacinação conjuntival de Rev. 1	17
6.2.	Estratégias de vacinação	18
6.2.1.	Imunização para redução do rácio de infeção em rebanhos específicos.....	18
6.2.2.	Vacinação de jovens	19
6.2.3.	Eliminação de animais infetados por teste e abate para obtenção de rebanhos/regiões livres de brucelose.....	19
6.3.	Recomendações	19
7.	Vigilância.....	20
8.	Educação para a saúde.....	20
9.	Brucelose dos pequenos ruminantes em Portugal e no concelho de Vinhais	21
9.1.	Brucelose no concelho de Vinhais	22
9.3.	Programa especial de erradicação em Trás-os-Montes	23
9.3.1.	Manutenção da classificação.....	24
9.3.2.	Recuperação de classificação Indemne (B3) ou Oficialmente Indemne (B4).....	25
Parte II: Estudo de caso- Determinação dos fatores de risco para a (re-) incidência de brucelose em pequenos ruminantes no concelho de Vinhais		27
1.1.	Objetivos.....	27
1.2.	Materiais e métodos.....	27
1.2.1.	Caracterização da região e explorações e obtenção dos registos	27
1.2.2.	Determinação do número de amostras.....	28
1.2.3.	Inquéritos epidemiológicos.....	29
1.2.4.	Análise estatística.....	29
2.	Resultados e discussão.....	30
3.	Conclusões	33
Referências		34
ANEXOS		41
Anexo A. Análise descritiva e discussão relativa à brucelose no concelho de Vinhais entre 2010 e 2107.....		41
Outros Anexos		42

Parte I - Revisão bibliográfica

1. Introdução

As doenças zoonóticas negligenciadas (NZDs- Neglected zoonotic diseases) continuam entre as principais causas de mortalidade, pelo menos em países menos desenvolvidos. Esta negligência é, em parte, consequência da falta de dados concretos, resultando numa subestimação da sua relevância perante políticos e agências de financiamento. Olhar para estas doenças visando o reservatório animal apresenta um duplo benefício, em que por um lado se reduz o risco de infeção ao ser humano e por outro se melhoram os meios de subsistência pelo aumento da produtividade animal (Welburn et al., 2015).

O termo brucelose refere-se à infeção animal e/ou humana causada pelas diferentes espécies do género *Brucella*. A espécie *Brucella melitensis* foi isolada pela primeira vez por Bruce num soldado britânico em 1887, já o seu carácter zoonótico foi descrito por Zammit, 18 anos depois, quando isolou a bactéria a partir de leite de cabra. Esta espécie é responsável por cerca de 90% dos casos de brucelose no homem (Godfroid et al., 2005; Nicoletti, 2010). A bactéria é transmitida ao homem através do contacto direto com animais infetados e os seus fluidos corporais, pela ingestão de leite não pasteurizado contaminado e ainda pela inalação de aerossóis. É uma doença de risco ocupacional, mais comum em zonas rurais, devido ao consumo de leite cru e exposição a animais infetados.

É uma das zoonoses mais difundidas a nível mundial, com mais de 500 mil novos casos reportados anualmente em humanos. A incidência, distribuição geográfica e epidemiologia da brucelose no homem são complexas e em evolução. Estas alterações devem-se a variações tanto da espécie de bactéria presente na região como nas condições socioeconómicas, políticas, sanitárias e hábitos alimentares da população (Bosilkovski et al., 2018; Lazutkin et al., 2018). Apesar de o índice de mortalidade no homem ser baixo, esta é uma doença debilitante e frequentemente mal diagnosticada (como malária, febre tifoide ou doença venérea) o que por um lado diminui o rendimento do indivíduo e por outro leva a um acréscimo nos custos de diagnóstico e tratamento. Enquanto que em países industrializados existem protocolos de controlo e erradicação da doença, com vacinação, sorologia e abate dos animais positivos, países menos desenvolvidos podem não ter os recursos financeiros e

veterinários que permitam estas práticas (Welburn *et al.*, 2015).

1.1. Taxonomia do género *Brucella*

Brucella é um cocobacilo gram-negativo, pertencente à família *Brucellaceae*, ordem *Rhizobiales* e classe *Alphaproteobacteria* (WHO, 2016), onde constam um grupo grande e diversificado de bactérias gram-negativas, com grande variabilidade na capacidade metabólica, morfologia e ciclo de vida.

Estas bactérias habitam diversos nichos ecológicos, como a água e o solo, formando também associações intra e extra-celulares com eucariotas, artrópodes, plantas multicelulares e mamíferos. Estas interações vão da colonização peri-celular, passam pelo parasitismo facultativo até ao parasitismo obrigatório (Batut *et al.*, 2004). A adaptação de certas α -proteobactérias à vida intracelular dentro de um hospedeiro tem sido associada à redução do genoma, resultando na perda de genes que deixam de ser necessários neste ambiente. A *Brucella* constitui um exemplo de parasita intracelular facultativo, podendo sobreviver dentro e fora do hospedeiro (O' Callaghan *et al.*, 2011). Evidências genéticas e imunológicas indicam que todos os membros da espécie *Brucella* se encontram intimamente relacionados, no entanto, visando diferenças na preferência de hospedeiro, epidemiologia e variações genéticas, o Comitê Internacional de Sistemática de Procariotas classificou, em 2005, válida a nomenclatura atribuída em 1980, na lista de nomes de bactérias aprovados, onde eram distinguidas 6 espécies da bactéria *Brucella*: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis* e *B. canis*. As primeiras três espécies estão subdivididas em biovars, consoante propriedades específicas.

Posteriormente foram isoladas estirpes de *Brucella* em animais marinhos, cujas propriedades diferem das espécies já reconhecidas. Foi proposta a classificação em duas novas espécies: *B. ceti* e *B. pinnipedialis* (Foster, 2007). Outra espécie, *B. microti*, foi isolada em ratos silvestres (*Microtus arvalis*), em raposas e amostras de solo na Europa Central (Scholz, 2008). Foram ainda classificadas duas novas espécies, *B. inopinata* (Scholz, 2010) e *B. papionis* (Whatmore, 2014). Existem ainda casos reportados de outras estirpes isoladas em roedores, raposas e sapos, tendo estas sido classificadas como estirpes atípicas de *Brucella* (OIE, 2016).

1.2. Hospedeiros

As dez espécies atualmente classificadas do gênero *Brucella* e alguns dos seus biovares têm hospedeiros preferenciais, sendo *B. melitensis* a espécie com menos especificidade (Nicoletti, 2010).

As espécies mais virulentas para o homem são *B. abortus*, responsável pela brucelose bovina, *B. melitensis*, o principal agente etiológico na brucelose de pequenos ruminantes e *B. suis*, responsável pela brucelose em suínos. Qualquer uma destas espécies pode causar aborto no hospedeiro. *B. ovis* e *B. canis* causam epididimite no carneiro e brucelose no cão, respetivamente. *B. neotomae* foi apenas isolada em ratos do deserto. Diferentes estirpes de *Brucella* foram identificadas em espécies silváticas, entre as quais o cervo (*Cervus elaphus*), javali (*Sus scrofa*), raposa (*Vulpes vulpes*) e lebre (*Lepus europaeus*). Estas espécies raramente mantêm a infeção, no entanto, funcionam como reservatórios da doença para os animais domésticos. (Godfroid et al., 2005; Nicoletti, 2010)

2. Brucelose em pequenos ruminantes

2.1. Vias de transmissão

A epidemiologia da brucelose dos pequenos ruminantes varia consoante a espécie afetada. Em ovinos e caprinos, *B. melitensis* é quase sempre a espécie infetante. *B. ovis* também pode infetar ovinos, mas tem pouco significado relativamente à doença humana (Corbel, 2006).

A transmissão entre animais ocorre como resultado do grande número de organismos excretados para o meio ambiente. As vias de excreção mais importantes (e mais relevantes do ponto de vista epidemiológico) de *B. melitensis* são através da placenta, fluidos fetais e corrimentos vaginais excretados por fêmeas infetadas após o aborto ou o parto. A excreção também é comum a partir de secreções do úbere, do sémen e fezes (Maurin, 2005). Os pastos e os estábulos podem ficar contaminados, sendo que a elevada densidade animal promove a transmissão. A partilha de pastos e caminhos com rebanhos vizinhos, compra de animais com origem em explorações de estatuto não indemne, partilha de machos reprodutores e mistura de animais em mercados e feiras constituem também fatores de risco (Corbel, 2006).

2.2. Infecções cruzadas entre espécies

Em muitos países em que se utilizam sistemas extensivos ou transumância, os pequenos ruminantes são criados juntamente com bovinos. Nestes sistemas de produção é frequente ocorrerem infecções cruzadas, onde *B. melitensis* e menos frequentemente *B. suis* podem ser transmitidas aos bovinos. Ambas as espécies são particularmente perigosas para o homem devido à elevada virulência e grande número de bactérias excretadas (Corbel, 2006; Blasco, 2010).

A infecção por *B. melitensis* surgiu em bovinos como um problema de saúde pública em alguns países mediterrânicos como consequência do consumo de leite não pasteurizado, já que *B. melitensis* tem a capacidade de colonizar o úbere dos bovinos (Banai, 2002; Godfroid 2005). Segundo Godfroid (2005), a implementação de medidas de controlo da infecção em pequenos ruminantes pode ser suficiente para controlar a infecção em bovinos, por remoção da fonte de infecção. Também os cães são suscetíveis à infecção por *B. melitensis*, normalmente pela ingestão de materiais de aborto ou placentas de ruminante. Ao excretar a bactéria podem constituir uma fonte de infecção para o homem e gado (Corbel, 2006).

2.3. Suscetibilidade dos hospedeiros

2.3.1. Idade

Animais jovens podem ser infetados mas não demonstram sinais clínicos e, geralmente, apenas demonstram resposta sorológica fraca e transiente. Por outro lado, a suscetibilidade aumenta após a maturidade sexual, especialmente durante a gravidez (European Commission, 2001).

2.3.2. Espécie e raça

Durante anos a cabra foi considerada o principal hospedeiro de *B. melitensis*, especialmente na América Latina, onde ovinos, mesmo mantidos em contacto com caprinos, não são significativamente infetados. Noutras áreas a infecção de ovinos é mais importante. Esta diferença pode ser explicada por, em primeiro lugar, as raças ovinas leiteiras serem

mais suscetíveis que raças de carne (Corbel & Brintley-Morgan, 1984). Por outro lado, no Mediterrâneo as ovelhas são predominantes, geralmente mantidas em rebanhos grandes, em condições que favorecem a transmissão. Também o comportamento animal pode ser relevante, enquanto que ovelhas tendem a agregar-se no parto e durante a noite, cabras não o fazem (European Commission, 2001). No entanto, segundo Corbel (2006) o manejo dos animais é muito mais importante na determinação de fatores de risco.

2.4. Fontes de infecção

Patogenicamente, a infecção por *B. melitensis* em pequenos ruminantes é semelhante à infecção por *B. abortus* em bovinos (OIE, 1996). A principal via de transmissão aparenta ser através da membrana mucosa da orofaringe e trato respiratório superior e conjuntiva. Também as membranas mucosas o trato genital são vias de infecção (European Commission, 2001). Tanto fetos como os anexos fetais de fêmeas abortadas contaminam os estábulos, pastos, água, alimentos, etc., e são as principais fontes de infecção para outros animais e para o Homem, pois podem conter concentrações elevadíssimas de *Brucella* (10^{10} – 10^{13} bactérias/grama).

Os organismos *Brucella* são extremamente resistentes no meio exterior, sobretudo em meios aquáticos. A duração precisa do tempo de sobrevivência depende de muitas variáveis como a temperatura, pH, luz solar, e natureza do substrato mas, de forma geral, *B. melitensis* pode sobreviver até 29 dias no estrume e até 4 meses nas paredes e solo do estábulo. Fontes de água contaminadas, tanto por animais que estejam a excretar a bactéria como por água arrastada a partir de áreas contaminadas, podem infetar posteriormente outros animais. A transmissão à descendência durante partos naturais ocorre raramente em ovinos e caprinos (Crespo León, 1994; Corbel, 2006).

2.5. Outros fatores

A época do ano influencia o manejo e alimentação dos animais, onde o pastoreio com cruzamento de rebanhos ou passagem nos mesmos caminhos facilitam a transmissão da doença. Fatores como a pluvimetria e temperatura condicionam o desenvolvimento dos pastos e o seu estado nutritivo, o que, tem influencia na época de partos e, assim, de forma mais ou menos direta, no número de animais presentes em mercados e feiras bem como a

época de vacinação (jovens entre os 3-6 meses) (Crespo León, 1994).

Rebanhos de maior dimensão, normalmente associados a maior densidade animal e, portanto, contacto mais próximo entre animais, apresentam maior probabilidade de ter animais positivos (Kabagambe *et al.*, 2001; Al-Majali, 2005; Coelho *et al.*, 2007).

Também a composição do rebanho aparenta ser um fator a ter em conta, rebanhos mistos (caprinos e ovinos) apresentam valores de seroprevalência individual e no rebanho mais elevados que aqueles que apenas incluem uma das espécies (Kabagambe *et al.*, 2001; Ocholi *et al.*, 2004). O parto em locais escuros, lotados e fechados favorece a disseminação quando comparado com locais a céu aberto e ambiente seco (Corbel, 2006).

O principal fator de risco para a introdução da doença num rebanho é a compra/troca de animais infetados (especialmente trocas de machos jovens e sem respeito pelas restrições sanitárias) (Corbel, 2006).

A seroprevalência também pode aumentar com o número de animais sexualmente maduros e a idade do animal, como resultado da duração prolongada da resposta humoral nos animais infetados e exposição prolongada ao agente (Megersa *et al.*, 2001).

Mainar- Jaime e Vázquez- Boland (1999) referem a “disponibilidade dos serviços veterinários” como o principal fator protetor contra a brucelose. Segundo os mesmos, a existência de um serviço veterinário organizado é determinante para o controlo eficaz da doença, mesmo na presença de más práticas de manejo nas explorações.

2.6. Patogenia em Animais

A bactéria é intracelular facultativa, multiplicando-se no interior das células fagocíticas do hospedeiro. O mecanismo pelo qual *Brucella* sobrevive no interior da célula ainda não é totalmente conhecido, no entanto, esta permanece em células como monócitos e macrófagos pertencentes ao Sistema Retículo Endotelial (tais como linfonodos, fígado, baço e medula óssea.). Existem vários aspetos que dificultam os esforços no sentido do controlo da doença, entre os quais o período de incubação variável e ocorrência de infeções latentes. Enquanto que anticorpos humorais parecem ter algum papel na resistência à infeção, a imunidade mediada é o principal mecanismo de defesa contra a bactéria.

A infeção geralmente estabelece-se no trato reprodutivo dos animais, com sinais característicos, mas não patognomónicos. Placentite, parto prematuro ou aborto são

frequentes nas fêmeas. Ocorre também diminuição na produção de leite como resultado dos partos prematuros e infertilidade. As bactérias encontram-se em maior concentração nos tecidos associados à gestação, constituindo estes a maior fonte de infecção (Corbel, 2006; Blasco, 2010).

3. Características zoonóticas

A brucelose no homem está presente por todo o mundo, com regiões de maior endemicidade como o Mediterrâneo, Médio Oriente, América Latina e partes da Ásia (Corbel 1997; López-Merino, 1989). A incidência real de brucelose não é conhecida, porém estima-se que em zonas endémicas se encontre entre <0.01 até >200 por 100,000 pessoas. O homem é hospedeiro acidental.

Pelo menos quatro das seis espécies conhecidas como causadoras de brucelose em mamíferos terrestres podem ser responsáveis pela infecção no homem, sendo a exceção *B. ovis* e *B. neotomae*. A espécie mais patogénica é *B. melitensis*, seguindo-se *B. abortus* e *B. suis*, que também são relevantes. Há casos reportados de infecção no Homem por *B. canis*, no entanto esta é rara e exclusiva de áreas onde a doença é comum no cão. Também as espécies marinhas podem ser responsáveis pela infecção no Homem (Godfroid *et al.*, 2005).

A diferenciação entre espécies é importante uma vez que tanto a epidemiologia como a gravidade da doença são influenciadas pelo tipo de organismo presente (Corbel, 2006).

3.1. Transmissão ao Homem

A brucelose é uma doença de risco ocupacional, onde produtores, veterinários, trabalhadores de matadouro e técnicos de laboratório estão em maior risco. Hábitos alimentares, recursos financeiros e práticas de higiene são também fatores importantes (Gwida *et al.*, 2010).

A transmissão ao homem ocorre maioritariamente através de ingestão, inalação e contacto com animais doentes, consumo de produtos láteos não pasteurizados e carne mal cozinhada. Há ainda registo de transmissão homem-homem, esta pode ser via sexual, transplante de órgãos, transfusões de sangue e ainda através de amamentação, sendo que,

em termos epidemiológicos, esta via não é relevante (Godfroid *et al.*, 2005; Corbel, 2006).

3.2. Doença no Homem

No Homem, a doença geralmente apresenta um quadro agudo ou sub-agudo de febre intermitente, acompanhado de anorexia e prostração que, sem tratamento, pode persistir durante meses. As complicações mais frequentemente associadas à brucelose são de foro osteoarticular, ocorrendo em cerca de 40% dos casos. Sacroilíate, espondilite, bursite e osteomielite são algumas das alterações observadas.

A infeção por inalação de aerossóis está normalmente associada ao momento de abate de animais contaminados, onde alterações como broncopneumonia e efusão pleural são observadas. Enquanto que no sexo masculino orquite e epididimite, geralmente unilateral, são complicações frequentes, no sexo feminino, embora raro, há casos reportados de abscessos pélvicos e salpingite (Corbel, 2006).

A nível neurológico meningite e meningo-encefalite são as alterações mais comuns (Corbel, 2006). Segundo Pappas (2005) a causa de morte mais frequentemente associada à doença é a endocardite.

3.3. Risco ocupacional- Prevenção da brucelose no Homem

A maior fonte de infeção por *Brucella* é o contacto direto ou indireto com animais infetados e/ou os seus produtos, pelo que a prevenção deve basear-se na eliminação deste contacto. A forma mais eficaz de eliminar este contacto seria através da erradicação da doença nos animais, o que, principalmente em países em desenvolvimento, apresenta dificuldades tanto humanas como financeiras. É quase sempre mais económico e prático prevenir a doença do que tentar controlá-la ou eliminá-la (Corbel, 2006). Sendo a brucelose uma doença de risco ocupacional, os setores envolvidos devem adotar medidas de segurança.

3.3.1. Produção pecuária

Produtores, pastores, tosquiadores, veterinários, inseminadores, entre outros, têm contacto direto com animais infetados, pelo que a manipulação não higiénica de fetos e produtos do parto, contacto com estrume e exposição a um ambiente fortemente contaminado pode conduzir à infeção. Também as famílias de produtores podem estar expostas, tanto pela proximidade do estábulo como pela necessidade de trazer animais para o interior quando as condições são agrestes (Corbel, 2006; Wallach *et al.*, 1997).

A fim de prevenir a transmissão, a entrada de animais na exploração deve ser cuidadosamente selecionada, os animais devem ser provenientes de explorações livres de brucelose e alvo de um período de quarentena de pelo menos 30 dias. Um rastreio sorológico deve também ser realizado antes da entrada dos animais.

A excreção de *Brucella* atinge níveis máximos durante a época de partos. Placentas e materiais de aborto devem ser colocados num contentor e preferencialmente incinerados. Enterrar é outra opção, desde que com certa profundidade e afastado de cursos de água. Neste processo o produtor deve proteger-se com vestuário adequado e realizar lavagem e desinfeção da zona circundante aquela onde ocorreu o parto (iodóforos, hipoclorito ou desinfetante fenólico são substâncias recomendadas). A entrada e saída de veículos das explorações deve ser controlada e estes sujeitos a desinfeção. Idealmente, estábulos onde permaneceram animais infetados não devem albergar animais até quatro semanas após limpeza e desinfeção. O controlo de insetos e roedores deve também ser efetuado (Corbel, 2006).

3.3.2. Processamento de produtos de origem animal

Pequenos ruminantes e bovinos infetados com *B. melitensis* ou *B. abortus* e suínos contaminados com *B. suis* são particularmente perigosos em matadouro. Durante a fase de bacteriemia da doença a bactéria encontra-se fortemente difundida nos tecidos, especialmente glândula mamária, útero e testículos (Corbel, 2006).

Bovinos infetados com *B. melitensis*, especialmente durante o período de gravidez e aleitamento, podem excretar grande quantidade de *Brucella*, representando grande risco para os trabalhadores. Os trabalhadores devem ser mantidos sob vigilância médica e estar bem informados acerca dos riscos e medidas de proteção adequadas (Corbel, 2006).

3.3.3. Laboratório

Brucella pertence ao grupo de risco 3 da WHO por ser considerada de alto risco para quem trabalhe diretamente com ela mas de baixo risco para a comunidade geral. O risco depende da virulência da bactéria em questão, sendo *B. melitensis* e *B. suis* as mais perigosas para o Homem, e também da quantidade de bactéria presente (Corbel, 2006).

Amostras de sangue e material de biópsia para serologia ou bacteriologia raramente contêm número suficiente de bactérias para apresentarem risco significativo para o técnico laboratorial. Por outro lado, depois de se fazer cultura, o número de bactérias pode ser muito elevado, requerendo instalações e procedimentos de nível 3 em biossegurança. O mesmo se aplica quando se lida com produtos de parto onde membranas, tecidos fetais e fluidos podem apresentar uma concentração de $>10^9$ de *Brucella* por grama (Corbel, 2006).

A brucelose está documentada como uma das infeções mais frequentemente adquirida em laboratório. Cada laboratório deve ter implementado o procedimento a seguir no contacto com a bactéria, com ênfase no equipamento capaz de produzir aerossóis, desinfeção e manuseamento de materiais (Corbel, 2006).

3.3.4. Consumo de produtos

A maioria da população não tem contacto direto com animais, pelo que o maior risco de infeção é através do consumo de leite não pasteurizado e produtos lácteos. Carne também pode ser uma fonte de infeção, especialmente em culturas onde o consumo de carne crua ou mal cozinhada é comum (Corbel, 2006).

3.3.4.1. Leite e produtos lácteos

Leite de ovelha, cabra ou vaca contaminado com *B. melitensis* pode conter grande quantidade de bactérias, pelo que o seu consumo sem tratamento térmico, comum em certas áreas, pode levar à infeção. Queijos não curados, preparados a partir de leite fresco podem também apresentar concentrações especialmente elevadas e são uma fonte de infeção muito comum nos países Mediterrânicos e do Médio Oriente. Queijos de pasta dura, sujeitos a

fermentação láctica ou propiónica, são menos perigosos, no entanto o pH deve descer abaixo de 3.5 para garantir a morte da bactéria (Crepo León, 1994; Corbel, 2006).

3.3.4.2. Carne

O tecido muscular geralmente apresenta baixa concentração de *Brucella*. Por outro lado, rins, fígado, baço, úbere e testículos podem conter concentrações muito elevadas. Em culturas onde se valoriza o consumo destes produtos crus ou mal cozinhados o risco de infeção é elevado (Corbel, 2006).

4. Diagnóstico

4.1. Identificação do agente

O único método eficaz para o diagnóstico de brucelose em pequenos ruminantes é baseado no isolamento da bactéria (Alton *et al.*, 1988). Não existe um teste específico que permita a identificação inequívoca de *brucella*, assim, para a identificação definitiva é usada uma combinação de fatores de crescimento, métodos serológicos, bacteriológicos ou moleculares (Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis, 1986; Alton *et al.*, 1988).

As amostras suspeitas devem ser refrigeradas e transportadas para laboratório com a maior brevidade possível. Se o período entre a recolha e a chegada ao laboratório for superior a 12h o material, com exceção de esfregaços vaginais, deve ser congelado. Chegado ao laboratório, o material que não for para cultura imediatamente deve também ser congelado (Alton *et al.*, 1988). Quanto menos tempo decorrer entre a recolha e a análise mais provável é o isolamento da bactéria em amostras contaminadas (OIE, 2016).

4.2. Esfregaços corados

Brucella é resistente à descoloração por ácidos fracos e apresenta coloração vermelha utilizando o método de Ziehl-Neelsen modificado (Alton *et al.*, 1988). Com este método, esfregaços de órgãos ou fluidos biológicos previamente fixados por calor ou com etanol, cocobacilos de *Brucella* coram de vermelho contra um fundo azul. Este método tem baixa

sensibilidade em leite e produtos lácteos, onde a bactéria pode estar presente em pequena quantidade. Também a presença de células adiposas pode dificultar a interpretação dos resultados. É necessário ter em atenção que outros agentes como *Chlamydia abortus* e *Coxiella burnetii* podem ser confundidos com *Brucella* spp. (OIE, 2016).

4.3. Cultura

O isolamento da bactéria é um processo lento e dispendioso, mas que deve ser executado para confirmar a doença e determinar qual a espécie/biovar envolvido (OIE, 2016). *B. melitensis* não requer soro ou CO₂ para crescer e pode ser isolada em meios sólidos não standardizados, em condições aeróbicas a 37 °C. No entanto, meios não-específicos não são recomendados pois também favorecem o crescimento de contaminantes presentes nas amostras. O meio de Farrell, desenvolvido para o isolamento de *B. abortus* no leite (Alton, 1988) está também recomendado para o isolamento de *B. melitensis*. No entanto, a concentração de ácido nalidixico e bacitricina usadas neste meio podem ter efeito inibitório no crescimento de algumas estirpes de *B. melitensis*.

Por outro lado, a sensibilidade para o isolamento de *B. melitensis* em rebanho naturalmente infetados pode ser mais baixa que a obtida com o meio menos seletivo Tayer-Martin modificado. Assim, a sensibilidade para o diagnóstico bacteriológico aumenta com o uso simultâneo de ambos os métodos descritos (Alton et al., 1988). Em consequência, um novo meio seletivo, CITA, foi formulado. Este meio inibe a maioria dos contaminantes e permite o crescimento de todas as espécies de *Brucella*, é mais sensível que os anteriores e é atualmente considerado o meio de eleição para o isolamento da bactéria. Para que o diagnóstico seja o mais sensível possível o uso conjunto do meio de Farrell e meio de CITA é o ideal (De Miguel et al., 2001).

Para o diagnóstico de brucelose por observação de cultura, a escolha das amostras a utilizar normalmente depende dos sinais clínicos observados. As amostras mais valiosas incluem secreções vaginais, fetos abortados (conteúdo estomacal, baço e pulmão), membranas fetais, leite, sémen e fluido de artrites ou higromas. Em cadáveres os tecidos preferencialmente escolhidos para fazer cultura são os pertencentes ao sistema reticuloendotelial (ex: linfonodos da cabeça, linfonodos mamários, genitais e baço), útero grávido ou pós-parto e úbere. As colónias começam a desenvolver passado 3-4 dias mas as amostras não devem ser descartadas como negativas até 7-10 dias após realização da cultura (OIE, 2016).

4.4. Identificação

Todas as colónias que apresentem morfologia característica de *Brucella* devem ser examinadas em esfregaços corados. A identificação da bactéria pode ser feita recorrendo a uma combinação entre os seguintes testes: morfologia após coloração de Gram ou Stamp, observação direta da morfologia da colónia, características de crescimento, testes de oxidase e urease e teste de aglutinação em lâmina com soro policlonal anti-*Brucella*. As espécies e biovars podem depois ser determinadas através da lise por bacteriófagos ou métodos serológicos, bioquímicos e moleculares (OIE, 2016).

4.4.1. Identificação das estirpes vacinais

As estirpes vacinais *B. abortus* S19, *B. melitensis* Rev.1 e *B. abortus* RB51 podem ser identificadas usando técnicas de PCR específicas (Kang *et al.*, 2001; Lopez-Goñi *et al.*, 2011), ou pela observação das características de crescimento em cultura (OIE, 2016). A estirpe Rev. 1 de *B. melitensis* apresenta as propriedades típicas do biovar 1 de *B. melitensis* mas desenvolve colónias de menor tamanho em meios sólidos, não cresce na presença de fucsina básica, tionina (ambos a 20 µg/ml) ou benzilo-penicilina (3 µg/ml), mas cresce na presença de estreptomicina a 2,5 ou 5 µg/ml (Alton *et al.*, 1988).

4.5. Testes serológicos

O método mais eficiente e económico para diagnóstico da brucelose animal consiste no rastreio de todas as amostras, utilizando testes de diagnóstico rápidos e baratos com sensibilidade suficiente para detetar grande proporção dos animais infetados. As amostras positivas ao rastreio são depois testadas utilizando testes confirmatórios, mais específicos. (Corbel, 2006). Os testes de diagnóstico recomendados pelo Office International des Epizooties (OIE) para pequenos ruminantes são o teste de Rosa de Bengala (RB) e o teste de Fixação do Complemento (FC). O teste Indirect Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (i-ELISA) e o ensaio com fluorescência polarizada (FPA) também podem ser utilizados como testes de rastreio. Dada a inexistência de um teste com 100% de sensibilidade e de

especificidade, está recomendada a realização de testes em série ou em paralelo (SANCO, 2009). Existem dois testes mais comumente usados na prospeção de brucelose em rebanhos: RB e FC.

4.5.1. Rosa bengala

O teste de RB é um teste de aglutinação que usa antígeno e RB, a um pH de 3.65 ± 0.05 . O antígeno é preparado a partir de células de *B. abortus* S99 ou S1119-3, sujeitas a centrifugação e suspensão em solução salina de fenol estéril (0.5%). A cada 35 ml desta suspensão é adicionado 1ml de corante RB a 1% e a solução é agitada durante 2 horas a temperatura ambiente. É então filtrada e centrifugada, de forma a permitir a deposição das células coradas que são depois suspensas em diluente (21.1g de NaOH dissolvido em 353ml de solução salina de fenol estéril, com 95ml de ácido láctico e ajustada com solução salina de fenol estéril de forma a perfazer 1056ml). A solução volta a ser filtrada e é armazenada a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, no escuro. Para realizar o teste, o soro e o antígeno com corante são colocados a temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$) e são colocados 25-30 μl de cada numa placa. São depois misturados e colocados num agitador durante 4 minutos. A leitura é feita imediatamente após este período. O teste de RB é um teste muito sensível, podendo dar resultados falso-positivos, nomeadamente em animais vacinados. É então necessário um teste de confirmação (OIE, 2016).

4.5.2. Fixação complemento

O teste da FC é um teste complexo, que requer boas instalações e equipamento, bem como funcionários especializados. Existem vários métodos propostos para a realização do teste, sendo que o princípio deste é a quantificação (ICFTU/ml) do grau de hemólise obtido na amostra. Este teste é bastante específico, mas menos sensível que o RB e ELISA. Considera-se atualmente que um soro onde se observe um título igual ou superior a 20ICFU/ml deve ser considerado positivo. De acordo com a OIE e com a legislação comunitária, este teste é utilizado como teste confirmatório ao RBT (OIE, 2016).

5. Prevenção, controlo e erradicação da brucelose animal

A brucelose, tal como outras doenças veiculadas por alimentos, causa morbilidade considerável nas populações em muitas partes do mundo. Além do sofrimento humano, esta doença é responsável por substanciais perdas sócio-económicas (Corbel, 2006). As perdas económicas podem ser diretas, relacionadas com a mortalidade e morbilidade dos animais, diminuição da produção zootécnica, infertilidade e redução da vida económica dos animais e ainda indiretas, devido aos custos das indemnizações e aos entraves à movimentação animal. (Crespo León, 1994; Godfroid, 2005).

No Homem, as perdas relacionam-se com custos de assistência médica, tratamentos, hospitalizações e ainda com a redução na produtividade, por absentismo, perda de rendimento e de mão-de-obra (Corbel, 2006). Dado que o controlo da infeção no Homem depende quase exclusivamente do controlo da doença em animais, a brucelose é em grande parte de responsabilidade veterinária (Nicoletti, 2010).

Os programas sanitários a implementar devem incluir medidas sólidas de controlo, erradicação e vigilância e proficientes e adaptadas a alterações da natureza da doença relacionadas com utilização de diferentes sistemas de manejo e produção (Godfroid *et al.*, 2005). É aceite que, antes de estabelecer qualquer programa de controlo e erradicação de uma doença, é necessário existir um programa de vigilância, com dados de campo atualizados e corretos. Este sistema deve ser capaz de detetar precocemente qualquer alteração na incidência e prevalência, de forma a otimizar recursos e avaliar os resultados obtidos (Thrusfield 1995; WHO/MZCP 1998). A informação deve estar disponível não só para aqueles que estão responsáveis pela tomada de decisões mas também para os restantes intervenientes. No caso da brucelose, em que a perda de animais não é necessariamente evidente, manter o interesse do produtor é crucial para o sucesso do programa. O primeiro objetivo dos programas de vigilância e controlo deve ser a redução da infeção na população animal até se atingir um nível em que o impacto da doença na saúde do homem e na saúde e produção animal seja o mínimo (Kaplan, 1966; Gwida, 2010).

Para a erradicação da doença, os passos seguintes devem ser o teste e abate de animais positivos, seguido pela implementação de medidas de prevenção para impedir a reintrodução da doença (European Commission, 2001). O sucesso na erradicação da brucelose nos pequenos ruminantes depende, em primeira instância, da qualidade dos serviços veterinários e organizações administrativas envolvidas e não tanto em limitações das ferramentas disponíveis para diagnóstico e profilaxia. Alguns dos requisitos essenciais para o

sucesso de qualquer programa sanitário incluem a qualidade e organização dos serviços veterinários, recursos financeiros que permitam compensar os produtores por animais seropositivos abatidos e, desta forma, incentivar a sua colaboração (Blasco, 2010).

6. Vacinação

A vacinação é frequentemente o primeiro passo a tomar no controlo de doenças infecciosas. A maioria dos autores concorda que a vacinação é o método mais eficaz e prático na redução da incidência de brucelose, sendo muitas vezes o único método viável para reduzir a incidência em muitos países (European Commission, 2001; Nicoletti, 2010).

6.1. Vacinação em pequenos ruminantes

A vacina viva atenuada *B. melitensis* Rev. 1 é atualmente indicada como a melhor vacina disponível na profilaxia de brucelose em ovinos e caprinos. Foi estabelecido que grande proporção dos animais vacinados fica protegido contra a infeção (Elberg, 1959 citado por Garrido, 1992) e que, naqueles em que ocorre infeção, esta é frequentemente transitória. Desta forma, o período de excreção de *Brucella* é mais curto e o grau de contaminação ambiental é reduzido, conseqüentemente a transmissão dentro e entre rebanhos é reduzida de forma significativa (Garrido, 1992).

A duração da imunidade da vacina foi testada após vacinação de cabras entre os 4 e 12 meses de idade (Alton 1966, 1968). Estas foram posteriormente testadas aos 2 anos e meio e 4 anos e meio de idade. Os animais testados aos 4 anos e meio de idade foram tão resistentes como os testados aos 2 anos e meio, pelo que foi concluído que a imunidade dos animais vacinados pode ser considerada vitalícia. Posteriormente, um estudo semelhante, em que a vacinação foi feita aos 4 meses de idade, demonstrou também bons resultados na imunidade dos animais (Fensterbank, 1987).

Programas onde foi usada a aplicação da vacina na totalidade do rebanho demonstraram uma diminuição acentuada na prevalência de brucelose tanto em ovinos como em humanos (Elberg, 1981, 1996). Depois de reduzir a prevalência, uma forma mais eficaz de controlar a doença passa pela vacinação exclusiva de animais jovens e teste e abate dos animais positivos. Finalmente, um programa que apenas incluía teste e abate pode ser

conseguido (Garin-Bastuji, 1998). Devido à virulência residual da estirpe vacinal, esta pode induzir aborto e conduzir a respostas imunitárias persistentes, que podem interferir com os métodos de diagnóstico clássicos. Para minimizar os efeitos adversos foram feitos estudos que pretendiam encontrar a melhor via de administração (conjuntival ou subcutânea) e dose mais adequada.

6.1.1. Vacinação com doses reduzidas de Rev. 1

A vacinação de fêmeas gestantes com a dose total da vacina administrada por via subcutânea conduz a aborto em muitos dos animais, bem como a uma resposta imunitária prolongada. Uma dose reduzida de 10^3 - 10^6 CFU por via subcutânea foi usada em testes de campo, este método foi considerado efetivo no controlo da brucelose e como relativamente seguro em ovelhas e cabras gestantes (Kolar, 1984; Gasca *et al.*, 1985; Al Khalaf *et al.*, 1992; Sales-Henriques *et al.*, 1992; Kolar, 1995; Al-Shamakh, 1995; Uysal, 1995; Delgado *et al.*, 1995). No entanto, segundo Blasco (1997), o uso de doses reduzidas da vacina pode induzir excreção vaginal e aborto em fêmeas gestantes, após infeção natural.

6.1.2. Vacinação conjuntival de Rev. 1

6.1.2.1. Animais jovens

A administração de Rev. 1 por via conjuntival (0.5×10^9 - 2.0×10^9 CFU) confere proteção semelhante à induzida pela via subcutânea, no entanto, a resposta imunitária é significativamente reduzida. Desta forma, a vacinação por via conjuntival é compatível com programas de erradicação baseados no princípio de teste e abate dos animais positivos (Fensterbank *et al.*, 1985; Jiménez de Bagués *et al.*, 1992; Diaz-Aparicio *et al.*, 1994; Marín *et al.*, 1999).

6.1.2.2. Animais adultos

A indução do aborto quando se vacinam fêmeas gestantes significa que não há nenhuma estratégia inteiramente eficaz na vacinação em massa com Rev. 1. Contudo,

quando comparada com a via subcutânea, a via conjuntival resulta num menor número de abortos. A maioria dos abortos induzidos pela vacina ocorrem entre os 40-60 dias após vacinação, dependendo maioritariamente da fase de gravidez no momento da vacinação. A percentagem de ovelhas que sofrem aborto quando vacinadas no último mês de gravidez é significativamente mais baixo que quando vacinadas aos 2 meses de gestação (Jiménez de Bagués *et al.*, 1989). A redução da dose da vacina quando administrada por via conjuntival apresenta problemas semelhantes aqueles que ocorrem quando a via de administração é subcutânea (European Commission, 2001).

6.2. Estratégias de vacinação

6.2.1. Imunização para redução da incidência em rebanhos específicos

A vacinação em massa pode ser utilizada para aumentar a resistência de uma população contra a doença. Inicialmente as campanhas para o controlo de brucelose em pequenos ruminantes foram baseadas na vacinação de animais jovens com Rev. 1, contudo, em vários países onde animais são mantidos em regime extensivo e condições nómadas ou semi-nómadas esta estratégia falhou em reduzir a prevalência e incidência da doença (Kolar, 1995; Blasco, 1997).

A vacinação de todo o rebanho (jovens e adultos) num rebanho ou região é uma alternativa possível para o controlo da doença. Imunização em massa foi aplicada com sucesso em vários países com condições sócio-económicas diferentes. Segundo Blasco (2010), a imunização em massa é indicada quando a prevalência de animais infetados é elevada (mais de 10% de rebanhos infetados na unidade epidemiológica). A vacinação em massa ajuda a estabelecer, de forma rápida, um rebanho relativamente imune, reduz o número de abortos e a excreção da bactéria, diminuindo a contaminação ambiental e transmissão da doença (Kolar, 1995). Para ser eficaz, esta estratégia vacinal tem de ser mantida pelo menos durante uma geração. A vacinação em massa baseia-se no facto de a longevidade dos ovinos e caprinos domésticos ser de 5 a 6 anos, pelo que a vacinação confere imunidade vitalícia (Blasco, 1997).

Segundo Muñoz (2008), depois de aplicada a estratégia de vacinação massiva a toda a população da unidade epidemiológica, o programa deve continuar com a vacinação exclusiva dos jovens de substituição pelo menos 8 a 10 anos. Entre as limitações da estratégia

encontra-se a impossibilidade da vacinação de fêmeas gestantes e o acesso e disponibilidade da vacina (WHO,1998).

6.2.2. Vacinação de jovens

A vacinação de animais jovens é a estratégia de erradicação mais frequentemente recomendada, já que permite o controlo da doença e que os animais se mantenham imunizados e capazes de resistir a uma infeção causada pela reintrodução da doença na unidade epidemiológica. A vacinação de animais jovens (3-4 meses) combinada com o teste e abate de animais adultos seropositivos está recomendada quando a prevalência da doença é moderada (1-10%). Como desvantagem, especialmente em zonas onde se utilizem sistemas de produção extensiva, com partos durante todo o ano, a cobertura vacinal de toda a população raramente é conseguida. Esta estratégia implica a deslocação dos serviços veterinários várias vezes por ano, o que determina em grande parte o insucesso desta estratégia (Blasco, 2010).

6.2.3. Eliminação de animais infetados por teste e abate para obtenção de rebanhos/regiões livres de brucelose.

Quando a prevalência da doença na unidade epidemiológica é baixa (<1%), o teste e abate dos animais positivos pode ser a estratégia a seguir (Blasco, 2010). A validade dos testes de diagnóstico é limitada e a possibilidade de existirem falsos-negativos devido ao período de incubação, período de latência ou aos critérios laboratoriais usados deve ser considerada. Antes de pôr em prática esta estratégia é necessário garantir que a situação epidemiológica é favorável, que os recursos e instalações estão disponíveis, que estão disponíveis animais saudáveis para a re-população e que há condições para a manutenção do programa de vigilância adequado. A cooperação dos produtores deve estar assegurada (Nicoletti, 1993).

6.3. Recomendações

Segundo a OIE, 2016, a vacina *B. melitensis* Rev. 1 deve ser administrada por via subcutânea ou conjuntival e a dose recomendada encontra-se entre 0.5×10^9 - 2.0×10^9 . A vacinação por via subcutânea está associada a respostas serológicas mais prolongadas, interferindo com os testes diagnósticos. A via conjuntival, que produz resultados com eficácia semelhante é preferível. A vacina *B. melitensis* Rev. 1 pode causar infeção no homem, pelo que deve ser manuseada com cuidado (Blasco and Díaz, 1993).

7. Vigilância

Quando a brucelose é totalmente erradicada de uma unidade epidemiológica é impreterível a implementação de um sistema de vigilância. Este deverá ser capaz de detetar eventuais surtos ou reintrodução da doença, permitindo acionar medidas imediatas e a longo prazo, otimizar recursos e planear ações alternativas. A recolha ativa de informação é, segundo Blasco (2010), a forma mais eficaz de detetar precocemente surtos de doença. Esta inclui rastreios serológicos regulares de uma amostra de população, realização de inquéritos epidemiológicos e a pesquisa laboratorial de agentes causadores de aborto e outros sinais clínicos relevantes.

8. Educação para a saúde

Do ponto de vista de saúde pública, as principais fontes de infeção estão relacionadas com o consumo de alimentos ou com contacto direto com os animais. Combater este problema passa pela educação da população. Em países em desenvolvimento, onde a informação não chega e os meios de subsistência são escassos, a morbidade associada à doença tem especial importância. A educação da população deve estar incluída como parte integrante do programa de erradicação da doença e ter em consideração fatores como: cultura, tradições, estatuto social, ocupação profissional e nível de escolaridade. A maioria das populações onde a brucelose é endémica é iletrada ou parcialmente iletrada. Neste caso panfletos e jornais não são boas fontes de informação (Corbel, 2006).

Por outro lado, rádio e televisão são cada vez mais comuns, sendo estes uma boa forma de transmitir a informação. Posters e fotografias no local de trabalho são uma boa forma de manter presente para os trabalhadores os riscos a que estão sujeitos. Palestras devem ser preparadas consoante as crenças do público alvo, usando vocabulário de fácil compreensão.

Estes programas devem ser dirigidos aos diferentes grupos sociais e enfatizar a responsabilidade do indivíduo na preservação da sua saúde e da comunidade (Corbel, 2006).

9. Brucelose dos pequenos ruminantes em Portugal e no concelho de Vinhais

A brucelose é uma doença de declaração obrigatória, fazendo parte do quadro nosológico anexo ao Decreto-Lei n.º 39209, de 13 de maio de 1953. As ações de luta contra a brucelose dos pequenos ruminantes em Portugal, iniciaram-se desde essa data através de campanhas de controlo da brucelose em caprinos, abrangendo, essa luta, ainda, os ovinos coabitantes.

Em 1992 e na sequência da entrada de Portugal em 1986 na então Comunidade Europeia, é aprovado o programa de erradicação da brucelose dos pequenos ruminantes, por um período de três anos, sujeito posteriormente a aprovações anuais e que ainda se encontra em vigor, com as necessárias adaptações. A estratégia adotada por Portugal foi a erradicação, com base na classificação sanitária de efetivos e no aumento progressivo de áreas de classificação indemne de brucelose (DGAV, 2011).

A Região Norte, onde a produção de ovinos e caprinos é caracterizada por rebanhos de pequenas dimensões, representa 16% do total de pequenos ruminantes no país (DGAV, 2017). Os sistemas de produção são semi-extensivos, utilizando-se de forma generalizada o pastoreio comunal que muitas vezes aproveita áreas marginais. Dados disponíveis sobre a situação da brucelose na população humana em Trás-os-Montes em 1999, indicavam ser esta doença de grande importância, com cerca de 32,1% dos casos notificados em Portugal (219 casos). De facto, a nível nacional a taxa de notificações de brucelose era 0,7/10.000 habitantes e em Trás-os-Montes de 6,4/10.000 habitantes.

Em 2001 a elevada prevalência da doença em rebanhos e animais pertencentes à DSAVRN quando compara com outras regiões do país, conduziu à necessidade de se alterar a estratégia que vinha sendo seguida, tendo em vista a adoção de medidas de controlo da doença, pelo que foi efetuada uma proposta de vacinação massiva dos pequenos ruminantes com vacina Rev.1. A justificação para a necessidade de vacinação de adultos apoiou-se nas características do sistema de produção (sistemas semi-extensivos maioritariamente orientados para a produção de carne, manejo dos rebanhos a nível da aldeia, movimento

animal intenso), nas características da vacina Rev1 (uma vacina viva que induz uma boa imunidade, já extensamente utilizada noutros países comunitários e com bons resultados; uma via de aplicação (conjuntival) que permite a redução de títulos persistentes e excreção), e na percepção dos produtores e médicos veterinários de que a vacina poderia ser de grande valor no melhoramento da condição sanitária dos rebanhos, pelo aumento da proteção imunitária dos animais e pela diminuição de excreção do agente para o ambiente. Desde aquela data até dezembro de 2010 em toda a área de Trás-os-Montes, foram vacinados 506.863 pequenos ruminantes com Rev.1. Como resultado das medidas implementadas observou-se uma diminuição do número de animais reagentes, do número de animais abatidos e consequentemente do valor total pago nas indemnizações. Também o número de pessoas infetadas com brucelose na área da região de Trás-os-Montes diminuiu consideravelmente de 1998 a 2003, sendo particularmente evidente nos distritos de Bragança e Vila Real, principalmente a partir de 2001 (DGAV, 2011).

A partir de 2004, foi terminada a vacinação de adultos e iniciada a fase de transição para o plano de erradicação. Atualmente, a vacinação é realizada apenas em animais jovens entre os 3 e os 6 meses de idade, com a vacina Rev1, dose completa, via conjuntival, em pelo menos todos os rebanhos não indemnes de brucelose. A identificação dos animais vacinados é crucial para o sucesso de um programa de erradicação. Segundo o Decreto Lei Nº 142/2006 de 27 de Julho 2006 e respetivas adendas é obrigatória a colocação de um brinco de cor verde na orelha esquerda do animal e um bolo reticular com o mesmo número de identificação presente no brinco. Esta informação é depois inserida na base de dados PISA e SNIRA e permite seguir intervenções realizadas e o trajeto do animal. Adicionalmente, pode ser feita uma tatuagem com letras do concelho, o ano e letra correspondente ao mês de vacinação no pavilhão auricular esquerdo ou virilha esquerda (DGAV, 2017).

Nos últimos anos a prevalência de rebanhos positivos a nível nacional tem decrescido, sendo a Região Norte a única onde a prevalência se encontra acima de 1%. Em 2016, 325 rebanhos tiveram pelo menos um animal positivo. Após abate dos animais positivos e envio de amostras para bacteriologia, 31.4% (184/586) foram positivos para *B. melitensis* e destes, 72% pertenciam à Região Norte (DGAV, 2017).

9.1. Brucelose no concelho de Vinhais

Vinhais é uma vila portuguesa, pertencente ao Distrito de Bragança, Região Norte e

sub-região do Alto Trás-os-Montes. É sede de um município com 694,76 km² de área e cerca de 10 000 habitantes, subdividido em 26 freguesias.

A produção de pequenos ruminantes na região constitui uma importante atividade económica local e ajuda na prevenção do êxodo rural (DGAV, 2017). Os pequenos ruminantes têm maioritariamente aptidão para carne e são explorados em regime extensivo ou semi-extensivo. As explorações raramente estão isoladas e algumas destas são mesmo pastoreadas em conjunto. A população rural desta região é constituída, na sua maioria, por pessoas de idade avançada, iletradas, a quem pode ser difícil transmitir a importância do cumprimento de programa de erradicação (Gonçalves, 1993; Coelho, 2007).

Gonçalves (1993) constatou que entre 1885 e 1989 os fatores epidemiológicos mais frequentemente relacionados com explorações positivas na região de Trás-os-Montes foram a falta de destruição de materiais do parto e aborto, a manutenção de animais positivos nas explorações (por resistência dos produtores aos abates sanitários e atraso no levantamento dos animais), falta de controlo da movimentação animal, uso de pastos e fontes de água comuns e condições sanitárias deficientes. Um estudo mais recente, realizado por Coelho (2007) apresentou como principais fatores de risco a introdução de animais provenientes de explorações não indemnes ou de estatuto desconhecido, a insuficiente remoção de estrume e limpeza do estábulo, falta de limpeza dos bebedouros e a grande dimensão dos rebanhos (>116 animais).

A nível nacional, de acordo com dados oficiais, entre o ano de 2010 e 2017, a prevalência média de brucelose em rebanhos e animais foi de 0.2% e 0.039%, respetivamente. No entanto, no concelho de Vinhais esta foi de 5% em rebanho e 0.3% em animais de acordo com os dados obtidos na PISA.net e DGAV.

9.3. Programa especial de erradicação em Trás-os-Montes

A região de Trás-os-Montes, Algarve, algumas partes da região Centro, Lisboa e Vale do Tejo fazem parte de um programa especial em que, devido à maior prevalência da doença, juntamente com outras medidas especiais, é feita vacinação de animais jovens com a vacina Rev. 1. Foram criadas 5 DSAVR (Direção de Serviços de Alimentação e Veterinária Regionais), descentralizadas da DGAV (Direção Geral Agricultura e Veterinária), que ficam responsáveis pela implementação de medidas a aplicar na área, atribuição dos estatutos,

implementação das restrições e supervisão dos serviços das OPP (Organização de Produtores Pecuários). Em Trás-os-Montes, onde o sistema de produção é extensivo e há partilha de caminhos e pastagens entre explorações, a vacinação tem como objetivo a melhoria da saúde dos rebanhos, pelo aumento da imunidade, e ainda a diminuição da excreção do agente no ambiente.

De acordo com a diretiva 91/68/ECC, Nº 244-2000, as classificações sanitárias atribuídas no âmbito de Plano de Erradicação da Brucelose dos pequenos ruminantes são as seguintes:

- B4- oficialmente indemne;
- B4S- oficialmente indemne suspensa;
- B3- indemne;
- B3S- indemne suspensa;
- B2- não indemne;
- B2.1- efetivo infetado.

O diagnóstico da brucelose é baseado nos testes de RB, como prova de rastreio e FC, como prova de confirmação.

Em efetivos B3 e B4 um animal positivo é aquele que apresente um resultado positivo ao RB e FC. No entanto, quando um animal é positivo ao RB é realizada FC a todos os restantes RB negativos e, de acordo com o resultado, são considerados positivos aqueles que forem FC positivos. Em efetivos B3S e B4S, um animal positivo é aquele que apresente resultado positivo à FC na reinspeção, quer seja FC positivo e RB positivo, quer seja FC positivo e RB negativo. Por fim, em efetivos B2 e B2.1, um animal positivo é aquele que apresente qualquer resultado positivo a RB ou a FC.

9.3.1. Manutenção da classificação

A manutenção de classificação B3 ou B4 de um efetivo requer que todos os animais da exploração com mais de 6 meses de idade (18 meses após vacinação nos rebanhos B3) sejam sujeitos ao saneamento prescrito. A entrada de animais em explorações B3 ou B4 deve

ser feita com animais de explorações B3 ou B4, sendo que para entrar numa exploração B4 devem ser animais não vacinados ou vacinados há mais de 2 anos. A classificação destes efetivos pode ser suspensa sempre que não se cumpram as normas do programa sanitário, nomeadamente:

- Ultrapassar o prazo anual de saneamento regular;
- Contacto com um efetivo infetado ou com classificação sanitária suspensa;
- Presença de sinais clínicos suspeitos: É obrigatória a notificação de todos os abortos ocorridos em fêmeas da espécie ovina e caprina. O produtor deve comunicar ao Médico Veterinário responsável, que encaminhará para a Divisão de Alimentação e Veterinária (DAV). O material do aborto deve ser encaminhado para laboratório e ser alvo de diagnóstico bacteriológico com tipificação do agente. O Médico Veterinário da OPP deve realizar um rastreio serológico a todo o efetivo no prazo máximo de 30 dias;
- Qualquer outro motivo que possa ser relevante no âmbito do Programa de Erradicação da Brucelose nos pequenos ruminantes.

9.3.2. Recuperação de classificação Indemne (B3) ou Oficialmente Indemne (B4)

Para a subida de classificação de uma exploração B3S ou B4S é necessário que as reinspeções efetuadas a todos os animais com mais de 6 meses de idade (30-90 dias após abate dos positivos e 60 dias após o rastreio anterior) não apresentem qualquer resultado positivo. Qualquer resultado positivo no isolamento do agente nos exames bacteriológicos *post mortem* inviabiliza a retirada da suspensão, descendo a classificação sanitária da exploração para B2.1.

No caso de efetivos com classificação B2.1 o estatuto B3/B4 é necessário que:

- Todos os animais da exploração com mais de 6 meses (ou 18 meses após vacinação dos jovens), tenham resultado negativo na reinspeção efetuada 30 dias após retirada do último animal com reação positiva;
- 60 dias após a última reinspeção negativa é feita uma nova prova. Caso não haja resultados positivos a exploração recupera a classificação B2;
- Após a classificação como B2 ser atribuída devem ser realizadas 2 novas provas, cada uma 90 dias após a última reinspeção sem resultados positivos;

- Todos os animais devem estar isentos de sinais clínicos de brucelose;
- As instalações devem ser completamente limpas e desinfetadas;
- As condições para a introdução de animais tenham sido respeitadas.

Todos os animais com resultados positivos nas condições acima estabelecidas são sujeitos a abate sanitário e o Médico Veterinário responsável do matadouro fica responsável pelo envio amostras de tecidos para bacteriologia no laboratório de referência INIAV (Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária). Em explorações de estatuto B2.1, onde a infeção já foi estabelecida, não é necessário o envio de amostras (DGAV, 2018).

Se assim se justificar, nesta região é possível a criação de protocolos entre a DSAVR e a OPP para a vacinação massiva dos rebanhos. Nestes casos, os animais são testados 24 meses após vacinação e qualquer reação positiva no teste RB é seguida pela realização do teste de FC (DGAV, 2013).

Parte II: Estudo de caso- Determinação dos fatores de risco para a (re-) incidência de brucelose em pequenos ruminantes no concelho de Vinhais

1.1. Objetivos

Este estudo epidemiológico teve como principal objetivo determinar os fatores de risco da (re-) incidência de brucelose em explorações de pequenos ruminantes no concelho de Vinhais entre 2014 e 2017.

Adicionalmente, encontra-se em anexo, a apresentação de dados e resultados da sua análise descritiva relativos a 2010-2017, assim como a sua discussão. Estes dados foram obtidos no âmbito dos trabalhos preliminares necessários ao delineamento do estudo principal.

1.2. Materiais e métodos

1.2.1. Caracterização da região e explorações e obtenção dos registos

Os dados analisados foram obtidos a partir do Programa Informático de Saúde Animal (PISA.net), a partir do portal do IFAP, na plataforma correspondente ao Sistema Nacional de Informação e Registo Animal (SNIRA) e ainda através da realização de inquéritos epidemiológicos.

A base de dados PISA.net, através do Programa de Erradicação de Brucelose, permitiu obter informação acerca do número de explorações com registo de animais positivos, número total de animais positivos e correspondente identificação auricular. Através desta identificação foi possível caracterizar cada animal relativamente à espécie (ovino ou caprino), sexo, data de nascimento, data de vacinação e idade com que foi considerado serologicamente positivo. Através do Portal do IFAP, na plataforma do SNIRA foram obtidos dados relativos à movimentação animal das explorações acima referidas, tendo sido registadas todas as entradas e saídas da exploração, entre 2014 e 2017, com dados relativos ao número de guias emitidas, proveniência/ destino dos animais e número de animais movimentados.

Um animal positivo à brucelose apresenta um resultado positivo no teste de RB e um índice de FC >20 IU/ml em rebanhos indemnes e não indemnes ou um animal positivo a qualquer um dos testes anteriores, se presente num rebanho com estatuto sanitário de B2

(rebanho infetado com último teste serológico sem resultados positivos) ou B2.1 (rebanho infetado). Um animal é considerado como infetado com brucelose se houve isolamento da bactéria ou se teve um resultado positivo no RBT e/ou CFT, quando presente num rebanho B2 ou B2.1.

Entre os anos 2014-2017, segundo dados do programa informático PISA.net, foram vacinados com Rev. 1 um total de 7126 jovens (1202 em 2014, 1517 em 2015, 1308 em 2016 e 3099 em 2017). Durante este período, 234 animais foram serologicamente positivos (208 ovinos e 26 caprinos), dos quais 2.56% (6/234) eram machos de raça ovina.

A incidência anual no rebanho foi, em média, de 6.85% (CI % = 1.94-11.77, n=4). De acordo com a fórmula de Battistini (1997) $[E=(I-XI)/SD]$, onde XI= 6.85% e SD=2.68, esta região permanece endémica para a brucelose nos 4 anos de estudo ($-1.96 < E < 1.96$). Houve isolamento da bactéria em 3.85% (9/234) dos animais seropositivos e sujeitos a abate sanitário.

1.2.2. Determinação do número de amostras

Inicialmente foram selecionados rebanhos com animais positivos nos testes serológicos em pelo menos 2 anos, seguidos ou não, entre 2014-2017 (n=18). No entanto, o aumento da prevalência e incidência da doença em 2017 (Gráfico 1 em Anexos), quando comparada com anos anteriores, justificou o estudo de rebanhos com mais de 3 animais positivos neste ano (n=7). Dos 25 rebanhos selecionados para a realização de um inquérito epidemiológico, 5 eram rebanhos mistos (ovinos-caprinos) e os restantes compostos apenas por ovinos.

Para determinar o tamanho do grupo de controlo a fórmula $[n=Z^2 \times p \times (1-p) / e^2]$, onde Z=1.645 (nível de confiança de 90%) e e= 0.05 (intervalo de confiança de 95%) foi ajustada para populações finitas por $[n (adj) = (N \times n) / (N + n)]$, onde N= 252 (Thrusfield, 2005). No final, o número de rebanhos positivos foi removido. O grupo de controlo incorporou 19 rebanhos com dimensão semelhante aos rebanhos seropositivos, selecionados na mesma área epidemiológica que estes e com estatuto livre de brucelose pelo menos desde 2006. Neste caso, 7 rebanhos eram mistos e 12 compostos apenas por ovinos.

A dimensão dos rebanhos foi, em média, de 125.0 animais (CI % 75.8-156.3) no grupo dos rebanhos seropositivos e de 102.3 animais (CI % 72.7-132.0) no grupo de controlo, sem diferenças estatísticas entre ambos (P= 0.27; Van der Waerden test). Todos os rebanhos usam o pastoreio como sistema de produção. A condição geral dos rebanhos e suas

instalações foram observadas, o que permitiu identificar os potenciais fatores de risco presentes para a elaboração do modelo estatístico inicial. Algumas das práticas aconselhadas pelos autores, como o estabelecimento de um período de quarentena na introdução de novos animais, práticas reprodutivas e transumância não foram tidos em consideração devido à semelhança entre todos os rebanhos.

1.2.3. Inquéritos Epidemiológicos

Os inquéritos epidemiológicos foram formatados para responder às principais questões relativas às práticas do produtor, numa tentativa de averiguar quais os maiores fatores de risco presentes na exploração. De acordo com dados oficiais, neste concelho, entre 2014 e 2017 foram testados, em média, 252 rebanhos e 16,830 animais por ano.

As variáveis foram divididas em dois grupos principais, o primeiro respeitante à gestão rebanho e movimentação animal e o segundo relativo ao manejo dos partos. As variáveis e método de recolha de informação constam na Tabela 1.

1.2.4. Análise estatística

Foi construído um modelo logístico multivariável recorrendo ao método de Hosmer and Lemeshow (Hosmer and Lemeshow, 1989). Numa fase inicial as 11 variáveis do estudo, codificadas como categóricas (0 ou 1), foram testadas para associações univariadas (Tabela 1). As variáveis que, quando testadas para associações univariadas tiveram um valor de $P < 0.25$ foram incluídas num modelo final. Variáveis não significativas ao nível de 0.05 em testes de razão de confiança foram sucessivamente removidas e o modelo final comparado com o anterior. Finalmente, as variáveis significativas foram consideradas a um nível de 0.05 para o test de Wald e as possibilidades (OR- Odds ratio) foram calculadas. O programa usado para a avaliação estatística foi o JMP11.

Tabela 1: Variáveis incluídas no modelo inicial.

Variáveis consideradas	Método de recolha de informação
Maneio do rebanho e movimentação animal	
Rebanhos de ovinos ou rebanhos mistos (ovinos e caprinos)	Visual e dados oficiais
Explorações vizinhas livres de brucelose	Dados oficiais
Animais de substituição criados na exploração	Inquérito epidemiológico e dados oficiais
Animais de substituição vacinados com Rev.1	Inquérito epidemiológico e dados oficiais
Desinfecção do rebanho após retirada do estrume	Inquérito epidemiológico
Separação dos animais doentes	Inquérito epidemiológico
Maneio do parto	
Remoção do estrume antes da época de partos	Inquérito epidemiológico
Separação das fêmeas no parto	Inquérito epidemiológico
Ocorrência de <50% dos partos em pastos ou caminhos	Inquérito epidemiológico
Remoção e destruição da placenta	Inquérito epidemiológico
Destruição de fetos não viáveis	Inquérito epidemiológico

2. Resultados e discussão

De acordo com o modelo final, três fatores de risco foram distinguidos (Tabela 2). A ausência de explorações vizinhas livres de brucelose, a reposição animal com fêmeas não vacinadas com Rev. 1 e a ocorrência de > 50% dos partos em pastos e caminhos estão associados com a recorrência ou maior incidência de brucelose nos rebanhos estudados (Tabela 3).

Tabela 2: Procedimentos em percentagem de rebanhos com e sem brucelose (modelo final, DF = 3; -LogLikelihood = 21.28; P < 0.001; goodness of fit, P > 0.05).

Procedimentos		Rebanho		Valor de P*
		Seropositivo % (n)	Indemne % (n)	
Explorações vizinhas livres de brucelose	Sim	40.0 (10)	84.2 (16)	0.03 (4.87)
	Não	60.0 (15)	15.8 (3)	
Animais de substituição não vacinados	Sim	20.0 (5)	47.4 (9)	0.02 (5.92)
	Não	80.0 (20)	52.6 (10)	
<50% dos partos em pastos ou caminhos	Sim	40.0 (10)	84.2 (16)	0.01 (6.28)
	Não	60.0 (15)	15.8 (3)	

* Valor de P (Wald ChiSquare para DF=1)

Segundo os resultados obtidos, rebanhos que nas imediações não têm explorações indemnes apresentaram maior probabilidade de ser recorrentes à brucelose. (OR = 7.79; IC 95%: 1.49-65.06), o que sugere que existe transmissão da *brucella* entre explorações de forma geográfica. Também o grande número de partos a ocorrer em pastos e caminhos está associado com a prevalência e maior incidência de brucelose no rebanho. Estes dados sugerem a grande importância que o meio ambiente desempenha na prevalência e incidência de brucelose. Outros fatores de risco como o pastoreio (OR = 299; IC 95%: 0.9-100-830.0; Reviriego *et al.*, 2000) ou não (OR = 0.22; IC 95%: 0.09-0.57; Oseguera Montiel *et al.*, 2013) em pastos comuns, a presença de cães e/ou roedores na exploração (OR = 5.12%; IC 95%: 1.04-25.21; Te-Chaniyom *et al.*, 2016) e o fornecimento de placentas e materiais do parto aos cães (OR= 8.0; IC 95%: 3.5-18.1; Musallam *et al.*, 2015) foram observados.

Tabela 3: Odds ratio (OR) para os fatores de risco no rebanho.

Fatores de risco		OR e OR inversa	Intervalo confiança 95%	Valor de P
Explorações vizinhas livres de brucelose	Sim	0.13	0.015-0.67	0.01
	Não	7.79	1.49-65.06	
Animais de substituição não vacinados	Sim	0.05	0.002-0.39	0.002
	Não	18.47	2.54-408.21	
<50% dos partos em pastos ou caminhos	Sim	0.04	0.002-0.33	0.001
	Não	24.17	3.0-606.54	

A maior concentração de *B. melitensis* em rebanhos endêmicos está presente imediatamente após o parto de fêmeas infetadas, através do feto não viável (aborto), placenta e secreções do parto. Como a bactéria pode sobreviver durante meses se as condições forem adequadas, o manejo dos partos é um ponto fulcral na erradicação da brucelose. A separação de fêmeas abortadas (OR = 0.19; 95%CI: 0.08-0.46; Musallan *et al.*, 2015), práticas de limpeza e desinfecção (Reviriego *et al.*, 2000; Musallan *et al.*, 2015), limpeza de bebedouros (ausência: OR = 3.05; IC 95%: 1.62-5.74; Coelho *et al.*, 2007), remoção do estrume e limpeza dos estábulos (ausência: OR= 2.87; IC 95%: 1.04-7.93; Coelho *et al.*, 2007) são também fatores chave para a eliminação da bactéria.

Outro dado relevante no estudo foi que explorações que fazem substituição de animais substituição de animais com fêmeas não vacinadas com a vacina Rev.1 apresentaram 18.47 (IC 95%: 2.54-408.21) maior probabilidade de serem prevalentes à brucelose. Este dado reflete a falta de imunização e maior suscetibilidade de infecção dos animais não vacinados quando confrontados com a bactéria, seja no ambiente ou pelo contacto animal. A introdução no rebanho de animais infetados é outra dificuldade à erradicação da doença. A entrada de animais infetados na exploração multiplica de 5.25 (IC 95%: 1.46-18.88; Bamaiyi *et al.*, 2014) a 5.80 (IC 95%: 2.5-13.6; Musallam *et al.*, 2015) a probabilidade de detecção de animais seropositivos no rebanho. A existência de um período de quarentena após entrada dos animais na exploração ajuda a suavizar esta probabilidade (OR= 0.16; IC 95%: 0.05-0.47; Musallam *et al.*, 2015).

3. Conclusões

No presente trabalho, pode-se concluir que a vacinação dos animais de reposição é um fator destacado no controlo da disseminação e manutenção de brucelose nos efetivos.

Também se observou, que a ocorrência maioritária de partos em zonas abertas e comuns tem um papel negativo significativo para a transmissão da *Brucella*.

Desta forma, sugere-se a manutenção da vacinação em jovens animais e um maior controlo das fêmeas parturientes e dos produtos dos partos, nomeadamente do conteúdo uterino e dos nado-mortos.

Referências

1. Al-Khalaf, S.A., Mohamad, B.T., Nicoletti, P., (1992). Control of brucellosis in Kuwait by vaccination of cattle, sheep and goats with *Brucella abortus* strain 19 or *Brucella melitensis* strain Rev.1. Trop. Anim. Health Prod., 24, 45-49
2. Al- Manaji AM., (2005). Seroepidemiology of caprine brucellosis in Jordan. Small Rumin Res 58, 13-18
3. Al-Sharmakh, I.H., (1995). A brief review of the national project for the control of brucellosis in the Kingdom of Saudi Arabia. FAO/WHO/OIE Round Table, on the use of Rev.1 vaccine in small ruminants and cattle. CNVA Alfort, France, September 1995.
4. Alton, G.G., (1968). Further studies on the duration of immunity produced in goats by the Rev.1 *Brucella melitensis* vaccine. J. Comp. Pathol., 78, 173-178.
5. Alton, G.G., (1966). Duration of the immunity produced in goats by Rev.1 *Brucella melitensis* vaccine. J. Comp. Pathol., 76, 241-253.
6. Alton, G.G., Jones, L.M., Angus, R.D., Verger, J., M (1988). Techniques for the brucellosis laboratory. INRA, Paris.
7. Banai, M. (2002). Control of small ruminant brucellosis by use of *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine: laboratory aspects and field observations. *Veterinary Microbiology*, 90 (1- 4), 497-519.
8. Battistini M.L., Giovannini A., Tamba M., Caporale V., (1997). Application of a geographical information system to the epidemiological surveillance of notifiable diseases. Proceeding of the VIII^o ISVEE, Paris, 1997. *Epidémiologie Santé Animale*, 31-32: 12.C.46.
9. Batut, J., Andersson, Siv. G.E., O'Callaghan D., (2004). The evolution of chronic infection strategies in the α -proteobacteria. *Nature reviews Microbiology*, 2:12, 933-945.
10. Blasco, J. M. (2010). 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, 31(1), 145-165.

11. Blasco, J.M., (1997). Advantages and inconvenience of *B. melitensis* Rev.1 vaccine for the prophylaxis of brucellosis in small ruminants. WHO meeting on development of new/ improved brucellosis vaccine. Geneva. December 11-12.
12. Bosilkovski, M., Stojanov, A., Stevanovic, M., Karadzovski, Z., Krstevski, K., (2018). Impact of measures to control brucellosis on disease characteristics in humans: experience from an endemic region in the Balkans. *Infectious Diseases*. 50: 5, 340-345
13. Coelho A.M., Coelho A.C., Roboredo M., Rodrigues J., (2007). A case-control study risk factors for brucellosis seropositivity in Portuguese small ruminants herds. *Prev Vet Med* 82, 291-301.
14. Corbel, M. J. (2006). *Brucellosis in humans and animals*. Geneva, Switzerland: WHO, FAO, OIE. World Health Organization, Global Alert and Response Publications.
15. Corbel, M.J., (1997). Brucellosis: an overview. *Emerg. Infect. Dis.*, 3, 213-221.
16. Corbel, M.J., Brinley-Morgan, W.J., (1984). Genus *Brucella* Meyer and Shaw 1920, 173AL, In Krieg, N.R., Holt, J.G.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol.1, Williams & Wilkins, Baltimore-London, 377-388.
17. Crespo León, F. (1994). Influencia de los Elementos y Factores Geográficos en la Epidemiología de la Brucelosis del Ganado Ovino y Caprino. *Papeles de Geografía*, 20, 189-209.
18. De Miguel M.J., Marín C.M., Muñoz P.M., Dieste L., Grilló M.J. & Blasco J.M. (2011). Development of a selective culture medium for primary isolation of the main *Brucella* species. *J. Clin. Microbiol.*, 49, 1458-1463.
19. Direção Geral de Veterinária [DGV]. (2011). Brucelose dos Pequenos Ruminantes: Programa de Erradicação para o ano 2012- Direção de Serviços de Veterinária da Região do Norte.
20. Direção Geral de Veterinária [DGV]. (2013). Brucelose dos Pequenos Ruminantes: Programa Especial de Controlo e Erradicação para o ano 2013 em Trás-os-Montes. Lisboa: Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas.
21. Direção Geral de Veterinária [DGV]. (2017). Brucelose dos Pequenos Ruminantes: Programa de Erradicação para o ano 2018- Direção de Serviços de Veterinária da Região do Norte.

22. Direção Geral de Veterinária [DGV]. (2018). Procedimentos para a classificação sanitária de efetivos- Nota explicativa.
23. Delgado, S., Cármenes, P., Fernández, M., (1995). Seroprevalence and lack of abortions after vaccination of Churra sheep with reduced dose of Rev.1 *Brucella melitensis* by subcutaneous or conjunctival routes. *Prev. Vet. Med.*, 23, 153-161.
24. Díaz-Aparicio, E., Marín, C., Alonso, B., Aragón, V., Perez, S., Pardo, M., Blasco, J.M., Díaz, R. Moriyón, I., (1994). Evaluation of serological tests for diagnosis of *B. melitensis* infection of goats. *J. Clin. Microbiol.*, 32, 1159-1165
25. Elberg, S.S., (1981). Rev. 1 *Brucella melitensis* vaccine. Part II: 1968-1980. *Vet. Bull.*, 51, 67-73.
26. Elberg, S.S., (1996). Rev. 1 *Brucella melitensis* vaccine. Part III: 1981-1995. *Vet. Bull.*, 66, 1193-1200.
27. European Commission. Brucellosis in sheep and goats (*Brucella Melitensis*). (2001) SANCO.C.2/AH/R23/2001. Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare.
28. Facciola, A., Palamara, A.M., D'Andrea, G., Marano, F., Magliarditi, D., Puglisi, G., Picerno, I., Pietro, A., Visalli, G., (2018). Brucellosis is a public health problem in southern Italy: Burden and epidemiological trend of human and animal disease. *Journal of Infection and Public Health*, 1-6.
29. Fensterbank, R., (1987). Brucellose des bovins, ovins et caprins: diagnostic, prophylaxie, vaccination. In: *Brucellose des bovins, ovins et caprins*, Série Technique N° 6, OIE, Paris, 9-36
30. Fensterbank, R., (1985). Allergic diagnosis of Brucellosis. In: *Brucella Melitensis* (Plommet, M., Verger, J.M., eds). Martinus Nijhoff Publ., Dordrecht, 167-172.
31. Fonseca, A. P. (2011). Situação e perspectivas do controlo da brucelose dos ovinos e caprinos em Portugal. In *Congresso Ciências Veterinárias 2011: Livro de Resumos, INRB IP / L-INIA Fonte Boa, Vale de Santarém*, (pp.69). Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias.
32. Garin-Batuji, B., Blasco, J. M., Grayon, M., Veger, J. M. (1998). *Brucella melitensis* infection in sheep: present and future. *Vet. Res.*, 29, 255-274.

33. Garrido, F., (1992). Rev.1 and B-19 vaccine control in Spain. Observations on the handling and effectiveness of Rev. 1 vaccine and the immune response. In "Prevention of Brucellosis in the Mediterranean countries" (Plommet, M.,ed.). Pudoc Scientific Publishers, Wageningen. 223-231.

34. Gasca, A., Jiménez, J.M., Díaz, L., (1985). Experiencias sobre vacunación antibrucelar de cabras adultas con la cepa Rev. 1. Diputación Provincial de Cádiz.

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

36. Gonçalves, L. (1993). Brucelose. Contribuição para o Estudo da Zoonose na Região Agrária de Trás-os-Montes (Bragança, Vila Real e Viseu). Tese de Mestrado em Extensão e Desenvolvimento Rural. Vila Real: UTAD.

37. Gwida, M.,Al Dahouk, S., Melzer, F., Rösler, U., Neubauer, H., Tomaso, H., (2010). Brucellosis – Regionally Emerging Zoonotic Disease?. *Coatian Medical Journal*. 51: 4, 289-295.

38. Hosmer, D.W.; Lemeshow, S., (1989). *Applied logistic regression*. New York, USA: Wiley.

39. Jiménez de Bagués, M.P., Marín, C.M., Barberán, M., Blasco, J.M., (1989). Responses of ewes to *B.melitensis* Rev.1 vaccine administered by subcutaneous or conjunctival routes at different stages of pregnancy. *Ann. Rech. Vét.*, 20, 205-213

40. Jiménez de Bagués, M.P., Marín, C.M., Blasco, J.M., Moriyón, I., Gamazo, C., (1992). An ELISA with *Brucella* lipopolysaccharide antigen for the diagnosis of *B. melitensis* infection in sheep and for the evaluation of serological responses following subcutaneous or conjunctival *B. melitensis* Rev.1 vaccination. *Vet. Microbiol.*, 30, 233-241.

41. Kabagambe E.K., Elzer P.H., Geaghan J.P., Opuda-Asibo J., Scholl D.T., Miller J.E., (2001). Risk factors for *Brucella* seropositivity in goat herds in Eastern and Western Uganda. *Prev Vet Med* 52, 91-108.

42. Kaplan, M., (1966). The problems of choice between control and eradication. Joint WHO/FAO Expert Committee Zoonoses, Geneva, Dec. 6-12

43. Kolar, J., (1984). Diagnosis and control of brucellosis in small ruminants. *Prev. Vet. Med.*, 2, 215.
44. Kong S.I., Her M., Kim J.W., Kim J.Y., Ko K.Y., Ha Y.M. Jung S.C., (2011). Advanced multiplex PCR assay for differentiation of *Brucella* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77, 6726-6728.
45. Kolar, J., (1995). Some experience from brucellosis control with Rev.1 vaccine in a heavily infected country- Mongolia. FAO/WHO/OIE Round Table on the use of Rev.1 vaccine in Small Ruminants and Cattle. CNEVA, Alfort, France, September 21-22.
46. Lazutkin, A., Korem, M., Weinberger, J.M., Eliashar, R., Hirshoren, N. (2018). Otolaryngology/head and neck region manifestations of *Brucella*, 1-4.
47. López-Goñi J., García-Yoldi D., Marín C.M., De Miguel M.J., Barquero- Calvo E., Guzmán-Verri C., Albert D., Garin-Bastuji B. (2011). New Bruce-ladder multiplex PCR assay for the biovar typing of *Brucella suis* and the discrimination of *Brucella suis* and *Brucella canis*. *Vet. Microbiol.*, 154, 152-155
48. López-Merino, A., (1989). Brucellosis in Latin America. In: "Brucellosis: Clinical and laboratory aspects of human infection". (Young, E.J., and Corbel, J.M., eds). CRC Press, Boca Raton. 151-161.
49. Mainar-Jaime, R. C. & Vázquez-Boland, J. A. (1999). Associations of veterinary services and farmer characteristics with the prevalences of brucellosis and border disease in small ruminants in Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, 40 (3-4), 193-205.
50. Marín, C.M., Moreno, E., Moriyón, I., Díaz, R., Blasco, J., (1999). Performance of competitive and indirect ELISAs, gel immunoprecipitation with Native Hapten Polysaccharide and standard serological tests in diagnosis of sheep brucellosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 6, 269-272.
51. Maurin, M. (2005). La brucellose à l'aube du 21e siècle. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 35, 6-16.
52. Megersa, B., Biffa, D., Niguse, F., Rufael, T., Asmare, K. & Skjerve, E. (2011). Cattle brucellosis in traditional livestock husbandry practice in Southern and Eastern Ethiopia, and its zoonotic implication. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 53 (1), 24.

53. Muñoz, P.-M., de Miguel, M.-J., Grilló, M.-J., Marín, C.-M., Barberán, M. & Blasco, J.-M. (2008). Immunopathological responses and kinetics of *Brucella melitensis* Rev 1 infection after subcutaneous or conjunctival vaccination in rams. *Vaccine*, 26 (21), 2562- 2569.

54. Musallan, I.I., Abo-Shehada, M., Omar, M., Guitian, J., (2015). Cross-sectional study of brucellosis in Jordan: Prevalence, risk factors and spatial distribution in small ruminants and cattle. *Preventive Veterinary Medicine*, 118(4): 387-396.

55. Neto, F. & Vaz, Y. (2002). Conjunctival REV 1 vaccination of adult sheep and goats in Trás-os-Montes, Portugal. *Épidémiologie et Santé Animale*, 42, 99-107.

56. Nicoletti, P., (2010). Brucellosis: Past, Present and Future. *Prilozi*, XXXI(1), 21-32.

57. Nicoletti, P., (1993). The eradication of Brucellosis in Animals. *Saudi Med. J.*, 14: 4, 288-292.

58. Ocholi R.A., Kwaga J.K.P., Ajogi I., Bale J.O., (2004). Phenotypic characterization of *Brucella* strains isolated from live-stock in Nigeria. *Vet. Microbiol* 103, 47-53.

59. O' Callaghan D., Whatmore A.M., (2011). *Brucella* genomics as we enter the multi-genome era. *Briefings in functional genomics*, 10: 6, 334-341.

60. OIE., (2018). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2018*. 2.1.4. Version adopted in May 2016.

61. O.I.E., (1996). *Manual of Standards for Diagnostic tests and Vaccines*. Third edition., Office International of Epizooties 1997. Paris, France. Caprine and ovine brucellosis, pp 350-36
- Welburn, S. C., Beange, I., Ducrottoy, M. J., & Okello, A. L. (2015). The neglected zoonoses-the case for integrated control and advocacy. *Clinical Microbiology and Infection*, 21(5), 433–443. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.04.011>.

62. Oseguera Montiel, D., Frankena K., Udo H., Keilbach Baer N.M., Van der Zijpp, A., (2013). Prevalence and risk factors for brucellosis in goats in areas of Mexico with and without brucellosis control campaign. *Tropical Animal Health and Production*, 45 (6): 1383-1389.

63. Pappas, G., Akritidis, N., Bosilkovski, M., Tsianos, E., (2005) Brucellosis. *N Engl J Med*,

352: 2325-2336.

64. Reviriego, F.J., Moreno, M.A., Domínguez, L., (2000). Risk factors for brucellosis seroprevalence of sheep and goat flocks in Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, 44 (3-4): 167-173
65. Sales Henriques, H., Hueston, W.D., Hoblet, K.H. and Shulaw, W.P., (1992). Field trials evaluating the safety and serologic reactions of reduced dose *Brucella melitensis* Rev.1 vaccination in adult sheep. *Prev.Vet.Med.*, 13: 205-215
66. SANCO. (2009). Working Document on Eradication of Bovine, Sheep and Goats Bruellosis in the EU accepted by the "Bovine" and "sheep and Goats" Brucellosis subgroups of the Task Force on Monitoring animal disease eradication.
67. Te-Chaniyon T., Geater, A.F., Kongkaew, W., Chethanond, U., Chongsuvivatwong, V., 2016. Goat farm management and *Brucella* serological test among goat keepers and livestock officers, 2011-2012, Nakhon Si Thammarat Province, southern Thailand. *One Health*, 2:126-130.
68. Thrustfield, M., (1995). *Veterinary Epidemiology*. Blackwell Scientific. United Kingdom.
69. Uysal, Y., (1995). Field experience with Rev.1 vaccine in Turkey. FAO/WHO/OIE Round Table on the use of Rev.1 vaccine in small ruminant and cattle. CNVA Alfort, France, September 1995.
70. Wallach, J. C., Samartino, L. E., Efron, A. & Baldi, P. C. (1997). Human infection by *Brucella melitensis*: an outbreak attributed to contact with infected goats. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 19 (4), 315-321.
71. Welburn, S. C., Beange, I., Ducrotoy, M. J., & Okello, A. L. (2015). The neglected zoonoses-the case for integrated control and advocacy. *Clinical Microbiology and Infection*, 21(5), 433–443. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.04.011>
72. WHO, (1986). Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis. Technical Report 740, WHO, Geneva, pp. 86-88.
73. WHO/MZCP, (1998). Human and Animal Brucellosis. Report of a WHO/MZCP workshop. Damascus, Syrian Arab Republic, 4-5 May.

ANEXOS

Anexo A. Análise descritiva e discussão relativa à brucelose no concelho de Vinhais entre 2010 e 2107.

O concelho de Vinhais é uma zona problemática relativamente à brucelose, com prevalência e incidência da doença muito superior à média nacional (Gráfico 2 e 3 em Anexos). As condições de manejo, adversidades geo-climáticas e situação sócio-económica de alguns produtores podem justificar a dificuldade na erradicação. A ocorrência de partos durante todo o ano dificulta a tarefa dos serviços veterinários, que têm que se deslocar várias vezes à exploração para cumprir os prazos de vacinação em jovens, sem, no entanto, ter garantias de que todos os jovens são vacinados. Também o momento da vacinação, que pode ser feita entre o 3-6 mês de vida do animal, pode ser problemática. Entre os anos 2000 e 2017, no concelho de Vinhais, foram sujeitos a abate sanitário 389 pequenos ruminantes, dos quais, em 17,4% (65/389; IC95%: 13,5-21,3%) foi isolada *B. melitensis*. Foi isolada a estirpe vacinal *B. melitensis* Rev.1 em 6 destes animais. 3 destes (ovinos), vacinados perto dos 6 meses, foram serologicamente positivos no primeiro rastreio após vacinação. Estes dados sugerem a possível replicação da estirpe vacinal, acantonando-se a *brucella* nos órgãos reprodutores ou um intervalo insuficiente entre a vacinação e o rastreio serológico. A idade média no momento da vacinação foi de 147.3 dias (Histograma 1 em Anexos) sendo esta proximidade à puberdade um fator de risco na medida em que a elevada concentração de eritritol no útero gestante potencia o crescimento e disseminação de *brucella*. A mesma estirpe foi identificada noutros 3 animais (2 ovinos e 1 caprino), 1 deles nunca vacinado. Aqui, é possível que tenha ocorrido transmissão entre animais ou contaminação no momento da vacinação uma vez que os jovens não são separados depois de vacinados. A separação dos animais no momento da vacinação e a utilização cuidada da vacina por parte do Médico Veterinário pode ajudar a prevenir estes casos. A entrada e saída de carros de transporte de animais, carros de serviço veterinário e outros, pode também ser responsável pela disseminação da bactéria, pelo que a existência de pedilúvios e rodolúvios seria uma boa medida a implementar nas explorações. O tempo de espera entre a seropositividade do animal e a sua retirada da exploração é bastante prolongado na região, entre 1 a 2 meses. Uma aceleração deste processo e/ou permitir ao produtor isolar o animal positivo é importante, principalmente no caso de fêmeas gestantes, em que a sua permanência e parto na exploração contribui para a contaminação e infeção de outros animais. Também o uso de desinfetante, obrigatório após retirada de animais positivos da exploração, pode não ser eficaz. Legislação mais apertada, com obrigatoriedade no uso das substâncias ativas comprovadas como mais eficazes seria uma opção mais segura. Ainda sobre legislação, com

o Despacho nº 3844/ 2017 de 8 de Maio de 2017 deixou de ser obrigatória a recolha de cadáveres em zonas remotas, entre as quais Vinhais. Esta medida foi justificada com os custos inerentes à deslocação e oferece como alternativa o enterro dos animais. Ora, fica a cargo do produtor a opção de enterrar ou não e sob que condições o faz, o que pode desencadear um problema de saúde pública. Outro tópico a considerar é a notificação dos abortos ocorridos na exploração que, mesmo sendo obrigatória por lei, não parece ser cumprida. Aqui é importante salientar o quão importante é manter os produtores informados e interessados, num assunto que é do seu maior interesse. Por fim, a restrição do trânsito animal, que deve ser de 21 dias após vacinação de jovens, podia ser prevenida caso houvesse uma comunicação mais direta entre o programa informático PISA.net e SNIRA. Esta medida seria também interessante para as OPP's, que se vêm obrigadas a inserir os dados de identificação dos animais em ambas as plataformas.

Outros Anexos

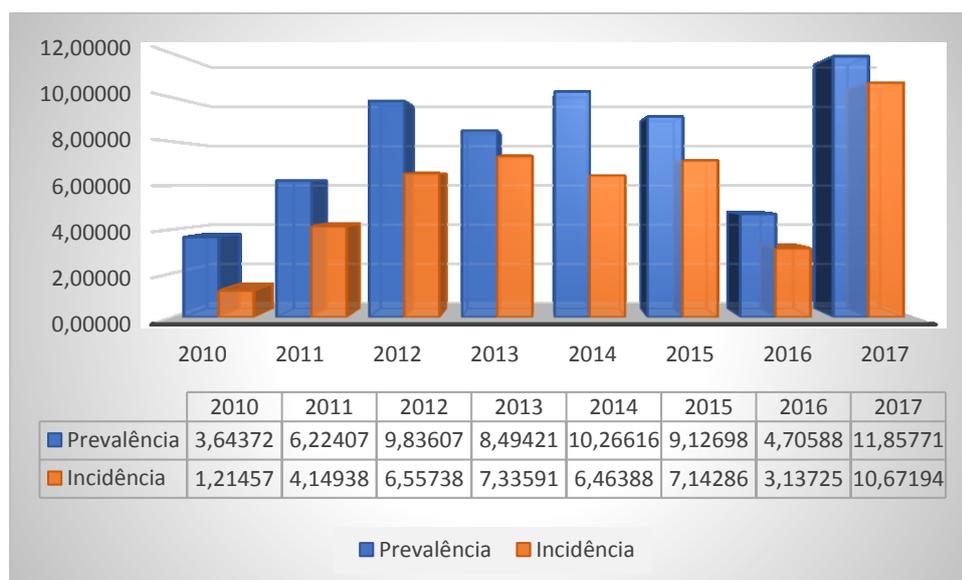
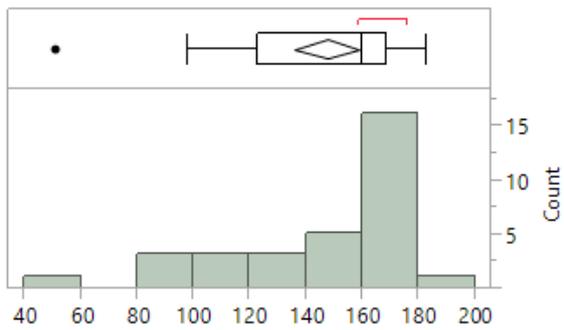


Gráfico 1: Prevalência e Incidência de brucelose (%) nos rebanhos entre o ano 2010 e 2017, no concelho de Vinhais.



Histograma 1: Idade média de vacinação (n=32, IC95%: 136,01-158,62)



Gráfico 2: Prevalência de brucelose (%) em explorações a nível nacional, da DVVRN e no concelho de Vinhais. (dados obtidos a partir do portal da DGAV e PISA)

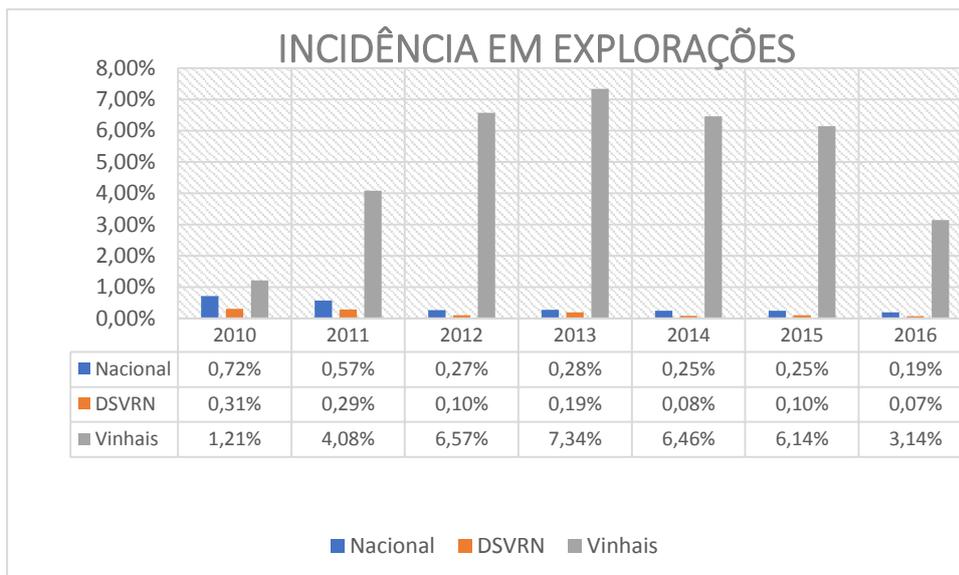


Gráfico 3: Incidência de brucelose (%) em explorações a nível nacional, da DVVRN e no concelho de Vinhais. (dados obtidos a partir do portal da DGAV e PISA)

