



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARIA DO CARMO PESSÔA SILVA.

**EPIDEMIOLOGIA E FATORES DE RISCO DE TUBERCULOSE BOVINA NO
ESTADO DO PARANÁ.**

LONDRINA
2012

MARIA DO CARMO PESSÔA SILVA

**EPIDEMIOLOGIA E FATORES DE RISCO DE TUBERCULOSE BOVINA NO
ESTADO DO PARANÁ.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciência Animal.

Área de Concentração: Sanidade Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ernst Ekehardt Müller.

Coorientador: Prof. Dr. Vítor Salvador Picão Gonçalves

Londrina
2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S586p Silva, Maria do Carmo Pessôa.
Epidemiologia e fatores de risco da tuberculose bovina no Paraná. Maria do Carmo Pessôa Silva. – Londrina, 2012.
84 f.: il.

Orientador: Ernst Eckhardt Müller
Co orientador: Vítor Salvador Picão Gonçalves
Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, 2012.
Inclui bibliografia

1. Tuberculose bovina – Teses. 2. Prevalência - Tuberculose – Teses. 3. Estudos observacionais – Teses. I. Müller, Ernst Eckhardt. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal. IV. Título.

CDU: 619:636.2

MARIA DO CARMO PESSÔA SILVA

EPIDEMIOLOGIA E FATORES DE RISCO DA TUBERCULOSE BOVINA NO ESTADO DO PARANÁ.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciência Animal.

Área de Concentração: Sanidade Animal.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ernst Eckhardt Müller
UEL – Londrina - PR
(orientador)

Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto
USP - São Paulo - SP

Prof. Dr. Marcos Bryan Heinemann
UFMG – Belo Horizonte - MG

Prof^a. Dr^a. Roberta Lemos Freire
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. Amaury Alcindo Alfieri
UEL – Londrina - PR

Londrina, 18 de dezembro de 2012.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Müller pela orientação, pela amizade e pela praticidade que conduz a pesquisa científica.

Ao Prof. Vítor não só pela orientação, mas sobretudo pela sua amizade e confiança ao me propor este desafio.

A colega Luciene Garcia Pretto Giordano, pela grande ajuda nas revisões.

Ao TECPAR pela doação dos alergenos.

A SEAB-PR e ao MAPA pelo apoio financeiro.

Ao DDA do MAPA pela indicação para o *Curso de Análisis de Riesgo en Salud Animal*.

A USP e UnB pelo apoio técnico.

Aos colegas médicos veterinários da SEAB/ADAPAR que participaram do estudo, e a todos aqueles que o dificultaram, e exatamente por este motivo, serviram-me de desafio a ser superado.

Muito obrigada.

“Sim, sei bem
Que nunca serei alguém.
Sei de sobra
Que nunca terei uma obra.
Sei, enfim,
Que nunca saberei de mim.
Sim, mas agora,
Enquanto dura esta hora,
Este luar, estes ramos,
Esta paz em que estamos,
Deixem-me crer
O que nunca poderei ser.”

(“Sim”)
(FERNANDO PESSOA)

SILVA, Maria do Carmo Pessôa. **Epidemiologia e fatores de risco de tuberculose bovina no Estado do Paraná**. 2012. 84f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

RESUMO

A tuberculose bovina é uma zoonose de ampla distribuição geográfica no mundo. O controle da doença requer identificação de animais infectados por meio de testes de tuberculinização seguida da eliminação destes animais e por este motivo, tornam seu uso rotineiro complexo. Considerando a importância do tema na saúde pública e na produção pecuária, foram pesquisadas, por meio de um estudo epidemiológico seccional, as prevalências em rebanhos de bovinos e em animais adultos em fase de reprodução, assim como os fatores de risco associados à presença da tuberculose nos rebanhos do Estado do Paraná. O Estado foi estratificado em sete regiões e a seleção da amostra foi feita em duas etapas, nas quais foram selecionadas 1.419 propriedades com criação de bovinos e testados 16.045 animais. A prova utilizada foi a tuberculinização intradérmica cervical comparada. A prevalência em propriedades e em animais no Estado do Paraná foi estimada em 2,15% [IC 95%: 1,31–3,00] e 0,42% [IC 95%: 0,04–0,81] respectivamente. As prevalências estimadas em propriedades e em animais, por estrato amostral foram respectivamente: no estrato 1 (Noroeste) 3,69% [IC 95%: 1,60–7,13] e 1,08% [IC 95%: 0,00 – 2,59]; no estrato 2 (Centro-Oeste-Norte) 3,48% [IC 95%: 1,41-7,04] e 0,43% [IC 95%: 0,00 – 0,87]; no estrato 3 (Norte Pioneiro) 1,96% [IC 95%: 0,54-4,94] e 0,17% [IC 95%: 0,00-0,40]; no estrato 4 (Centro-Sul) 3,89% [IC 95%: 1,58-7,85] e 0,29% [IC 95%: 0,01-0,57]; no estrato 5 (Oeste) 0,00 [IC 95%: 0,00 – 1,83] e 0,00 [IC 95%: 0,00 – 0,00]; no estrato 6 (Leste-Sul) 1,03% [IC 95%: 0,12-3,67] e 0,20% [IC 95%: 0,00-0,54]; no estrato 7 (Sudoeste) 2,24% [IC 95%: 0,73-5,15] e 0,22% [IC 95%: 0,01-0,43]. O modelo de regressão logística identificou como fatores de risco associados à presença de tuberculose bovina, rebanho adulto com mais de 22 bovinos e a existência de ordenha mecanizada na propriedade. Os resultados demonstram que a tuberculose bovina tem prevalência baixa na maioria das regiões do Estado do Paraná e sugerem que o risco da presença da doença aumenta em rebanhos leiteiros maiores e com ordenha mecânica.

Palavras chave: Prevalência. *Mycobacterium bovis*. Estratégias de controle. Tuberculinização intradérmica.

SILVA, Maria do Carmo Pessôa. **Epidemiology and risk factors of bovine tuberculosis in Paraná State - BRAZIL**. 2012. 84 f. Thesis (Doctorate Degree in Animal Science) – State University of Londrina, Londrina, 2012.

ABSTRACT

Bovine tuberculosis is a zoonosis of widely distributed in the world. Its control is based on the identification of infected animals using skin tests followed by culling of test-positive animals. The public health and livestock production importance of bovine tuberculosis justified the undertaking of a cross-sectional sample survey with a view to estimate the prevalence of infected herds and breeding animals. In addition, the risk factors associated with the presence of bovine tuberculosis was investigated in Paraná State, Brazil. The state was stratified into seven regions. The two-stage sampling included 1,419 herds and 16,045 breeding animals, which were diagnosed with the comparative cervical tuberculin test. The prevalence in herds and in breeding animals of Paraná, was estimated at 2.15% [95% CI: 1.31 to 3.00] and 0.42% [95% CI: 0.04 to 0.81] respectively. The prevalence in farms and animals, by sampling stratum were respectively: in stratum 1 (Northwest) 3.69% [95% CI: 1.60 to 7.13] and 1.08% [95% CI: 0.00 to 2.59]; in stratum 2 (Midwest-North) 3.48% [95% CI: 1.41 to 7.04] and 0.43% [95% CI: 0.00 - 0.87]; in stratum 3 (pioneer North) 1.96% [95% CI: 0.54 to 4.94] and 0.17% [95% CI: 0.00 to 0.40]; in stratum 4 (Mid-South) 3.89% [95% CI: 1.58 to 7.85] and 0.29% [95% CI: 0.01 to 0.57]; in stratum 5 (West) 0.00 [95% CI: 0.00 to 1.83] and 0.00 [95% CI: 0.00 - 0.00]; in stratum 6 (South-East) 1.03% [95% CI: 0.12 - 3.67] and 0.20% [95% CI: 0.00 to 0.54]; the stratum 7 (Southwest) 2.24% [95% CI: 0.73 to 5.15] and 0.22% [95% CI: 0.01 to 0.43]. The multiple logistic regression model identified that the risk of a herd being positive to bovine tuberculosis increases with the number of breeding animals, as a measure of herd size. The existence of mechanized milking systems is also associated with the risk of bovine tuberculosis. The results demonstrate that the prevalence of bovine tuberculosis is low in most regions of Paraná and suggest that the disease risk is greater for larger dairy herds with mechanized milking systems .

Keywords: Prevalence. *Mycobacterium bovis*. Control strategies. Intradermal tuberculin.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1** - Mapa da União Europeia - UE com estados membros (ou regiões) de acordo com a condição sanitária oficial da tuberculose bovina em 30 de setembro de 2005 34
- Figura 2** - Mapa da evolução da situação da tuberculose por áreas da Austrália. (A) Situação em 1979, (B) Situação em 1989, (C) Situação em 1992..... 35
- Figura 3** - Prevalência de positividade às provas de tuberculinização intradérmica em bovinos, em países da América Latina 39
- Figura 4** - Mapa do Chile com regiões administrativas e Zonas do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Tuberculose Bovina..... 43

EPIDEMIOLOGIA E FATORES DE RISCO DA TUBERCULOSE BOVINA NO PARANÁ.

- Figura 1** - Estado do Paraná-Brasil e divisão dos estratos amostrais 63
- Figura 2** - Distribuição espacial das propriedades amostradas 66
- Figura 3** - Curva ROC do modelo logístico apresentado na Tabela 3..... 71

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1 - Casos de tuberculose humana por <i>M. bovis</i> em diferentes países, por período	15
Tabela 2 - Categorias de classificação sanitária, de acordo com as prevalências da tuberculose bovina nos Estados Unidos, 2006.....	38

EPIDEMIOLOGIA E FATORES DE RISCO DE TUBERCULOSE BOVINA NO ESTADO DO PARANÁ.

Tabela 1 - Tamanho de rebanho, quantidade de animais a serem amostrados e quantidade mínima de animais positivos para classificar a propriedade como foco.....	64
Tabela 2 - Dados censitários e prevalência de focos de tuberculose bovina, por estrato/região e para o Estado do Paraná-Brasil.....	68
Tabela 3 - Dados censitários e prevalência de casos de tuberculose bovina, por estrato/região e para o Estado do Paraná-Brasil.....	69
Tabela 4 - Prevalência de focos de tuberculose bovina por tipo de exploração para o Estado do Paraná-Brasil	69
Tabela 5 - Resultados da análise univariada dos possíveis fatores de risco de tuberculose em rebanhos de bovinos com atividade reprodutiva no Estado do Paraná-Brasil	70
Tabela 6 - Modelo final de regressão logística múltipla de fatores de risco (<i>odds ratio</i>) para tuberculose em rebanhos com atividade reprodutiva no Estado do Paraná-Brasil	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADAPAR	Agência de Defesa Agropecuária do Paraná.
AIDS	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
BAAR	Bacilos Alcool Ácido Resistente
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EEC	Comunidade Econômica Europeia
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
GPS	Global Position System
IC	Intervalo de Confiança
LANAGRO	Laboratório Nacional Agropecuário
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MIRU-VNTR	Mycobacterial Interspersed Repetitive Units-Variable Number Tandem
NRAMP1	Natural-Resistance-Associated Macrophage Protein 1
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	Odds Ratio
PRA-PCR	Restriction Enzyme Pattern Analysis
PCR	Polymerase Chain Reaction
PNCEBT	Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose.
PPD	Purified Protein Derivative
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SEAB- PR	Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento do Paraná
SSCA	Single Strand Conformational Analysis
TCC	Teste Cervical Comparativo
TCS	Teste Cervical Simples
Teste IFN- γ	Teste de Interferon Gama
TPF	Testes de Polarização Fluorescente
TPC	Teste da Prega Caudal
UE	União Europeia
UnB	Universidade de Brasília
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1 REVISÃO DE LITERATURA	11
1.1 DEFINIÇÃO	11
1.2 ETIOLOGIA	11
1.3 IMPORTÂNCIA	12
1.4 EPIDEMIOLOGIA.....	16
1.5 DIAGNÓSTICO.....	23
1.6 ESTRATÉGIAS E PROGRAMAS DE CONTROLE E ERRADICAÇÃO	31
1.7 REFERÊNCIAS	46
2 OBJETIVOS	59
2.1 OBJETIVO GERAL.....	59
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	59
3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	60
3.1 Epidemiologia E Fatores De Risco Da Tuberculose Bovina No Paraná.....	60
RESUMO.....	61
INTRODUÇÃO	61
MATERIAL E MÉTODOS	62
RESULTADOS	66
PERFIL DA AMOSTRA	67
PREVALÊNCIA DE PROPRIEDADES E DE ANIMAIS	67
ANÁLISE UNIVARIADA	69
ANÁLISE MULTIVARIADA	70
DISCUSSÃO	71
CONCLUSÕES.....	75
REFERÊNCIAS	76
APENDICE	79
APENDICE - QUESTIONÁRIO DO ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO	80

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 DEFINIÇÃO

A tuberculose bovina, causada pelo *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), é uma zoonose de evolução crônica que acomete principalmente bovinos e bubalinos. A enfermidade nos bovinos é caracterizada pelo desenvolvimento progressivo de lesões com aspecto nodular, denominadas de tubérculos, podendo acometer qualquer órgão ou tecido (BRASIL, 2006).

1.2 ETIOLOGIA

O agente etiológico da tuberculose foi cultivado e corado com fucsina-anilina pela primeira vez por Robert Koch em 1882 (ROXO, 1996). Em 1887, nos Estados Unidos da América (EUA), Theobald Smith, observou que o bacilo isolado em bovinos apresentava características culturais e morfológicas diferentes das apresentadas pelo bacilo que infectava humanos, sugerindo a existência de mais de uma espécie (PRITCHARD, 1988). Somente em 1970, Karlso e Lessel, propuseram a classificação do bacilo bovino como espécie, *Mycobacterium bovis*, até então considerado uma variante do *Mycobacterium tuberculosis* denominada de *Mycobacterium tuberculosis* subespécie *bovis*.

Mycobacterium bovis pertence a ordem *Actinomycetales*, família *Mycobacteriaceae* e integra o complexo *Mycobacterium tuberculosis* ao qual pertencem ainda *M. tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium pinnipedii*, *Mycobacterium caprae* e, mais recentemente, *Mycobacterium mungi* (FERREIRA NETO; BERNARDI, 1997; ALEXANDER *et al.*, 2010).

O *Mycobacterium avium* é o agente da tuberculose em várias espécies de aves e faz parte do complexo *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAC). O *Mycobacterium avium* é subdividido em quatro subespécies (spp): spp. *avium*, spp. *paratuberculosis*, spp. *silvaticum* e spp. *hominissuis*. As espécies integrantes do complexo MAC provocam lesões granulomatosas nos linfonodos do trato digestório de suínos acarretando perdas no abate, por codenação parcial ou total da carcaça. Essas micobactérias, exceto *Mycobacterium paratuberculosis*, não são patogênicas para os bovinos e bubalinos mas, responsáveis por

reações inespecíficas nas provas de tuberculinização (DVORSKA *et al.*, 2004; BRASIL, 2006).

1.3 IMPORTÂNCIA

A enfermidade em bovinos tem impacto econômico e sanitário no comércio nacional e internacional de animais e seus sub-produtos, podendo afetar a estabilidade social e econômica e ter efeito danoso sobre uma grande diversidade de espécies (COUSINS; FLORISSON, 2005).

Para o pecuarista, as perdas diretas ocasionadas pela tuberculose nos bovinos, podem ser atribuídas a morte de animais, redução no ganho de peso, secreção de leite e eficiência reprodutiva, levando ao descarte precoce e eliminação de animais de alto valor zootécnico, condenação de carcaças no abate e restrições às exportações (OLIVEIRA *et al.*, 2008). De acordo com De Kantor e Ritacco (1994) e O'Reilly e Daborn (1995), as perdas para o produtor são mais evidenciadas em rebanhos leiteiros e são decorrentes da diminuição da produção de leite e da eliminação precoce de matrizes. Barwineck e Taylor (1996) estimaram que para o setor leiteiro da Turquia, 65% dos custos eram devidos a diminuição na produção de leite, 28% à redução da vida produtiva e 7% à redução da natalidade. Ainda deve ser considerada a perda de prestígio e credibilidade dos rebanhos onde a doença ocorre e talvez seja este, o prejuízo de maior impacto para o criador (BRASIL, 2006).

Além das implicações da tuberculose bovina no comércio de animais e seus produtos e dos prejuízos econômicos diretos e indiretos aos produtores, tem também as relacionadas à saúde pública. Já na primeira década do século XX ficou comprovado que bovinos tuberculosos representavam sério risco à saúde pública e que o homem era notavelmente suscetível ao bacilo bovino. O leite contendo bacilos tuberculosos é responsável pela tuberculose extrapulmonar no homem, especialmente em crianças, e a forma pulmonar causada por inalação. Na época a tuberculose acometia aproximadamente 20 a 40% dos bovinos de vários países da Europa o que levou as autoridades sanitárias a implementar diversas medidas de controle (FERREIRA NETO; BERNARDI, 1997).

Mundialmente a tuberculose humana é um dos problemas de saúde pública mais graves. Em 2004, nove milhões de pessoas desenvolveram a doença e diariamente morreram aproximadamente cinco mil pessoas. A Organização Mundial da

Saúde (OMS) estima que um terço da população mundial esteja infectada, porém a grande maioria nunca desenvolverá a enfermidade. A tuberculose reemergiu com o aumento da incidência do vírus da síndrome da imunodeficiência adquirida, no homem. Os fármacos disponíveis para o tratamento da tuberculose no homem permitem a obtenção de elevadas taxas de cura mas, o surgimento de micobactérias resistentes compromete seriamente o tratamento (LÓPEZ MARÍN *et al.* 2006; De KANTOR , RITACCO, 2006).

Segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN-SVS), a ocorrência de novos casos de tuberculose humana no Brasil vem diminuindo nos últimos anos. No ano de 2000, 81 mil novos casos foram identificados, enquanto que em 2010, foram aproximadamente 71 mil novos casos e a taxa de mortalidade específica por causa no mesmo período, decresceu de 3,3% para 2,4%. De acordo com informações do Programa Nacional de Controle da Tuberculose, a doença foi considerada a quarta causa de morte por doença infecciosa, com cerca de 4.600 mortes ao ano e a primeira em pacientes com Síndrome de Deficiência Imunológica Adquirida (BRASIL, 2011).

A pasteurização e a fervura do leite minimizaram a importância da infecção por via digestiva para o ser humano. Por outro lado, a infecção por via aerógena continua sendo importante na cadeia produtiva da carne, principalmente para os trabalhadores de frigoríficos. O avanço dos programas de erradicação da tuberculose bovina na Europa, Estados Unidos da América e Canadá eliminou essa fonte de infecção ao ser humano, restringindo o problema aos países produtores de alimentos de origem bovina onde a tuberculose ainda é um desafio à saúde animal (THOEN; LOBUE; De KANTOR, 2006).

No Brasil, o comércio clandestino, compra e venda de bovinos tuberculosos, a fabricação e utilização de carimbos falsos da inspeção sanitária, abate clandestino, aliado à falta de dados estatísticos confiáveis sobre a realidade da doença em bovinos no país, constituem ameaça à saúde pública. Modismos, como o consumo de leite cru, aumentam o risco de novas infecções no ser humano em regiões ou países com elevada prevalência de tuberculose bovina (ABRAHÃO, 1998; PARDO; LANGONI; MENDONÇA, 2001).

Os casos de tuberculose humana por *Mycobacterium bovis* são subestimados. Os sinais clínicos, radiológicos e patológicos causados pelo *Mycobacterium bovis* no ser humano são idênticos aos provocados pelo *Mycobacterium tuberculosis*, principal agente etiológico da tuberculose humana (WEDLOCK *et al.*, 2002). Em muitos países, o diagnóstico da tuberculose pulmonar é feito apenas pela baciloscopia do escarro,

sendo que a cultura que permite a identificação da espécie, é limitada a situações muito especiais. Muitos laboratórios que realizam o diagnóstico bacteriológico, não utilizam meio de cultivo com piruvato e não observam o tempo mínimo de incubação adequado para o isolamento de *Mycobacterium bovis* o que pode diminuir a sensibilidade da técnica (DROBNIIEWSKI *et al.*, 2003; SEQUEIRA; RITACCO; De KANTOR, 2005; THOEN; LOBUE; De KANTOR, 2006). Por estes motivos, entre outros, torna-se difícil a avaliação da participação efetiva do *Mycobacterium bovis* na tuberculose humana. Na América Latina, as informações sobre o impacto da tuberculose bovina na saúde humana são ainda mais escassas (RITACCO; De KANTOR, 1992).

Em 1993, a OMS ressaltou a importância da tuberculose bovina na saúde pública. Recomendou a realização de mais estudos sobre a distribuição e prevalência da infecção ou doença no ser humano e em animais, assim como o impacto do *Mycobacterium bovis* na epidemia da tuberculose humana, principalmente nos países em desenvolvimento. A OMS sugeriu ainda, efetiva colaboração dos profissionais da saúde; médicos e veterinários, além de maiores investimentos nas pesquisas sobre vacinas e novos métodos de diagnóstico (ABRAHÃO, 1998).

Wedlock *et al.* (2002) estimaram que 5% a 10% dos casos de infecção humana são originados pelo *Mycobacterium bovis*. Thoen, Lobue e De Kantor (2006) relataram que na Argentina, México e Brasil foram notificados, entre 1966 e 2005, apenas 12 casos de tuberculose humana por *Mycobacterium bovis*. Na Argentina, estima-se que o *Mycobacterium bovis* seja responsável por 2% de todos os casos de tuberculose humana sendo que os trabalhadores de matadouros e de explorações leiteiras são mais frequentemente infectados (De KANTOR; RITACCO, 2006). Na província de Santa Fé, Argentina, Latini *et al.* (1990) pesquisaram os casos de tuberculose humana entre 1984 a 1989 e verificaram que 2,4 a 6,2% dos casos foram causados pelo *Mycobacterium bovis*.

Pérez-Guerrero *et al.* (2008) no México examinaram 255 amostras obtidas de pacientes com sinais clínicos de tuberculose e identificaram 46 amostras Bacilo Álcool Ácido Resistentes, 20 amostras positivas ao isolamento bacteriano e 74 amostras positivas na PCR. Entre estas 94 amostras, 66 corresponderam ao espótipo *Mycobacterium tuberculosis* e 13 ao *Mycobacterium bovis*. Os autores ressaltaram a importância do *Mycobacterium bovis* na epidemiologia da tuberculose humana e seu risco para a saúde pública.

Segundo Sobral *et al.* (2011), não existem relatos disponíveis no Brasil sobre a participação do *Mycobacterium bovis* nos casos de tuberculose humana. Os autores analisaram 8.121 isolados de amostras clínicas, oriundos de pacientes do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/ Instituto de Doenças do Tórax do Estado do Rio de Janeiro dos quais, 79 apesar de cresceram em meio contendo glicerol e piruvato, específico para o crescimento do *Mycobacterium bovis*, quando examinados por PCR com *primers* específicos, apresentaram padrões genotípicos de *Mycobacterium tuberculosis*.

Na Tabela 1 é apresentado o percentual de casos de tuberculose humana causados pelo *Mycobacterium bovis* em países industrializados em diferentes períodos. Observa-se que ocorre variação entre 0,9% a 7,2%, sendo este último relatado na Nova Zelândia (COSIVI *et al.*, 1998).

Tabela 1 - Casos de tuberculose humana por *Mycobacterium bovis* em diferentes países, por período.

Países	Período	Número	% do total de casos de tuberculose humana
Austrália	1970-94	40	3,1
Inglaterra	1977-90	232	1,2
Alemanha	1975-80	236	4,5
Irlanda Área rural	1986-90	17	6,4
Irlanda Área urbana	1982-85	09	0,9
Nova Zelândia	1983-90	22	7,2
Espanha	1986-90	10	0,9
Suécia	1983-92	96	2,0
Suíça	1994	18	2,6
Estados Unidos da América	1980-91	73	3,0

Fonte: Adaptado de Cosivi *et al.* (1998)

É crescente o interesse epidemiológico na prevalência da tuberculose zoonótica no Brasil, assim como o isolamento bacteriano, seguido de identificação a partir de amostras clínicas de humanos, cujos resultados são de fundamental importância para tomada de decisão quanto à prevenção (SOBRAL *et al.*, 2011).

1.4 EPIDEMIOLOGIA

Mycobacterium bovis é o agente com maior espectro de hospedeiros entre os animais domésticos e silvestres, especialmente quando comparado a outras espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (O'REILLY; DABORN, 1995). Entre os animais domésticos suscetíveis à infecção pelo *Mycobacterium bovis* estão os bovinos, búfalos, caprinos, ovinos, suínos, caninos e felinos. A principal fonte de infecção para os rebanhos é o bovino doente. Eventualmente, o homem com tuberculose causada pelo *Mycobacterium bovis* pode ser fonte de infecção para os animais (O'REILLY; DABORN, 1995; ABRAHÃO, 1998; DE LISLE; MACKINTOSH; BENGIS, 2001).

A fonte mais importante de infecção para os rebanhos é o bovino ou o bubalino infectado e por este motivo, a principal forma da introdução da tuberculose em um rebanho se dá pela aquisição de animais infectados. Animais doentes podem eliminar *Mycobacterium bovis* pela via respiratória, digestiva, cutânea, congênita, genital, mamária e urinária (BRASIL, 2006). Dentre essas vias, a respiratória é a mais importante, sendo a bactéria eliminada pelo ar expirado, escarro e muco nasal. Em bovinos naturalmente infectados, as lesões encontram-se predominantemente no trato respiratório superior, inferior e linfonodos desta região. Isto faz com que os aerossóis de animais enfermos sejam a principal via de transmissão e o trato respiratório, a porta de entrada mais importante para bovinos. Infecções experimentais demonstram que 80 a 90% dos animais são infectados por via aerógena (PRITCHARD, 1988; NEILL *et al.*, 1994; POLLOCK *et al.*, 1996).

Para alguns autores a eliminação do *Mycobacterium bovis* pelo leite, urina e fezes são de pouca relevância na transmissão da doença entre bovinos (HARDIE; WATSON, 1992; MORRIS; PFEIFFER; JACKSON, 1994). Apesar disto, o trato digestório é considerado a segunda porta de entrada mais importante para bovinos, podendo a infecção ocorrer pelo contato direto com animais infectados, água, pastagem e fômites contaminados. Bezerros podem se infectar pela ingestão de leite de vacas com tuberculose mamária, o que ocorre em aproximadamente 1% a 2% das vacas com tuberculose (MORRIS; PFEIFFER; JACKSON, 1994; POLLOCK; NEILL, 2002; SALAZAR, 2005).

A infecção congênita e vertical para os bezerros é incomum, mas pode acontecer quando os órgãos reprodutores estiverem infectados (NEILL *et al.*, 1994). Ozyigit,

Senturk e Akkoc (2007) relataram um caso de transmissão intrauterina em um bezerro de 15 dias de idade, com sinais clínicos de tuberculose generalizada por *Mycobacterium bovis*.

Wray (1975); Menzies e Neil (2000) relataram que o *Mycobacterium bovis* em condições favoráveis, tem sua viabilidade entre 18 e 332 dias em temperaturas entre 12 e 24°C, dependendo da grau de exposição solar. O *Mycobacterium bovis* pode ser eliminado pelas fezes dos bovinos, provavelmente devido à ingestão de exsudato originado nas lesões pulmonares (NEILL *et al.*, 1988; CASSIDY *et al.*, 1998). Estudo realizado na Irlanda descreve que o uso de esterco bovino na adubação de pastagens pode aumentar a probabilidade da ocorrência de tuberculose, favorecendo a infecção por via oral ou por inalação de aerossóis (GRIFFIN *et al.*, 1993).

Segundo Humblet, Boschiroli e Saegerman (2009), os fatores de risco associados à presença da tuberculose bovina podem estar relacionados ao animal, ao rebanho, a região e ao país. Entre os principais fatores associados ao animal, pode ser citada a idade, raça, estado nutricional, resistência genética e estado imune. Os fatores relacionados ao rebanho são: tamanho, densidade populacional, tipo de exploração, sistema de produção, contato com animais silvestres, ingresso de animais, falta de realização de exames diagnósticos, entre outros. Com relação à região e ao país, deve ser observado o histórico de prevalência da doença nos bovinos da propriedade e da região, o comércio e a movimentação de animais.

A idade dos animais, como fator de risco, foi relatada em pesquisas conduzidas na Tanzânia. Kazwala *et al.* (2001) estudaram 239 rebanhos e encontraram forte associação entre a doença e a evolução da idade dos animais, provavelmente explicado pelo aumento da exposição dos suscetíveis a animais infectados e ainda sem sinais clínicos. Cleaveland *et al.* (2007) identificaram em 622 rebanhos aumento significativo na prevalência da doença à medida que a idade dos animais aumentava [OR 1.27 (1.16 -1.3) $p < 0,001$].

Kazwala *et al.* (2001) citaram maior prevalência da tuberculose em machos ($p < 0,005$), provavelmente devido às particularidades do manejo dos animais naquela região onde os machos inteiros e castrados têm maior contato com outros animais além do isolamento das fêmeas do restante do rebanho. Por outro lado, Inangolet *et al.* (2008) pesquisaram 1470 animais de rebanhos nômades em Uganda e encontraram maior associação da doença com as fêmeas [OR=6.3 (1.4- 26.34), IC95%]. Oloya *et al.* (2007), também em Uganda, consideraram o gênero de pouca importância como fator de risco.

Segundo Radostits *et al.* (2000), as raças originadas do *Bos indicus* são mais resistentes à tuberculose do que as originadas do *Bos taurus*. Por outro lado, Kazwala *et al.* (2001), em estudo conduzido no planalto Sul da Tanzânia, analisaram 5936 animais de 239 rebanhos e relataram que as raças exóticas não africanas (*Bos taurus*) (20/244), foram menos suscetíveis ($p < 0,05$) à tuberculose do que as do gado nativo (*Short Horn Zebu*) (761/5692), porém consideraram que esta diferença possa ser consequência dos tipos de manejo e não pela variação de suscetibilidade entre as raças. Ameni *et al.* (2007) compararam a prevalência e a gravidade da tuberculose em animais de raças pura zebu (2578), holandesa (925) mantidas a pasto, e os cruzados entre as duas raças (1921), em um estudo do tipo caso-controle feito em duas regiões da Etiópia e encontraram prevalência mais elevada, assim como lesões mais acentuadas nos animais de raça holandesa [OR= 2.32 (1.89- 2.85), IC 95%].

A variabilidade genética à resistência a doenças pode ocorrer entre raças e dentro das raças. A variação de suscetibilidade ao bacilo da tuberculose é considerada como fator de risco em potencial e seu estudo vem sendo inserido nas pesquisas de biologia molecular. As técnicas com marcadores genéticos permitem a provável comprovação desta hipótese (MEADE *et al.*, 2007). A resistência associada a uma proteína de macrófagos chamada gene 1 (NRAMP1) detectada em ratos, também ocorre nos bovinos (FENG *et al.* 1996; MORRIS, 2007). Paixão *et al.* (2006), em pesquisa feita com 248 animais de quatro raças bovinas, 81 animais Holandês, 95 Nelore, 37 Guzerá e 35 Gir, oriundos de diferentes estados brasileiros, analisaram seus DNAs extraídos pela técnica *Single Strand Conformational Analysis* (SSCA) e observaram que a participação do alelo SLC11A1 foi significativamente diferente entre os animais da raça Holandesa e os das demais raças zebuínas. Os autores sugeriram que esta variabilidade seja consequência do curto período de seleção e da heterogeneidade da raça que deu origem ao Zebu no Brasil.

Outro fator de risco de tuberculose em bovinos, relacionado ao animal, é a imunossupressão, que predispõe os animais a várias infecções, entre elas, ao *Mycobacterium bovis* (MENZIES; NEILL, 2000). De La Rua-Domenech *et al.* (2006) correlacionaram a imunossupressão pré e pós o parto e infecções concomitantes com vírus da diarréia viral bovina (BVD), como causas de resultados falso negativo aos testes alérgicos e não necessariamente como fator de risco.

O escore corporal ou estado nutricional é caracterizado como fator de risco para ocorrência de doenças de origem infecciosa, inclusive a tuberculose bovina. O'Reilly e Daborn (1995) observaram que os rebanhos mantidos sob condições nutricionais pobres na Nova Zelândia e na Irlanda foram mais suscetíveis à infecção pelo *Mycobacterium bovis* e ao desenvolvimento da doença clínica. Cook *et al.* (1996) pesquisaram 233 pequenos rebanhos na Zâmbia e consideraram a condição corporal como fator que influencia diretamente a resposta aos testes tuberculínicos, já que animais com menor escore corporal e estressados podem apresentar resposta insatisfatória aos testes. Monaghan *et al.* (1994) e De La Rua-Domenech *et al.* (2006), também relacionaram o estado nutricional como causa de resultado falso negativo ao teste de tuberculinização e não o consideraram como um fator de risco.

Em nível de rebanho, a presença da tuberculose bovina pode estar associada ao tamanho do rebanho, densidade populacional, tipo de exploração, presença de animais silvestres, práticas zootécnicas e sanitárias (NEIL *et al.* 1994; BRASIL, 2006; HUMBLET; BOSCHIROLI; SAEGERMAN, 2009).

Javed *et al.* (2010) pesquisaram os fatores de risco associados a tuberculose em 132 rebanhos com 1092 búfalos d'água de duas regiões de Punjab – Paquistão e identificaram como fatores de risco o tamanho do rebanho (rebanhos ≥ 10 bovinos [OR=1.105 (1.003-1.218) IC 95%] e a criação de búfalos como animais de companhia [OR= 4.223 (1.494 – 11.938) IC 95%].

Apesar de vários pesquisadores considerarem o tamanho do rebanho um importante fator de risco, na realidade a sua associação com a presença da tuberculose se dá pela densidade populacional (GRIFFIN *et al.*, 1996; MUNROE *et al.*, 1999; PORPHYRE; STEVENSON; MCKENZIE, 2008). Quando se menciona tamanho de rebanho, está se referindo à probabilidade de contato efetivo entre o animal infectado e um susceptível (COOK *et al.*, 1996; CLEVELAND *et al.*, 2007). De acordo com De Jong (1995), este contato é expresso pelo número médio de novos animais infectados para cada animal infectante, por unidade de tempo. O trabalho de Perez *et al.* (2002) realizado em rebanhos leiteiros da Província de Santa Fé na Argentina, descreve este contato como coeficiente de transmissão inter-rebanhos, que nas condições de seu estudo, foram necessários 2.2 contatos efetivos vaca/ano para que a enfermidade fosse transmitida a um novo animal. Esta estimativa foi calculada por modelo estocástico modificado de Reed-Frost.

Considerando a relação entre tamanho do rebanho, presença e manutenção da tuberculose, Brooks-Pollock e Keeling (2009) estudaram as causas de persistência da tuberculose nos rebanhos da Grã-Bretanha empregando os registros de evolução dos rebanhos disponíveis no “Cattle Tracing System”. Os autores identificaram que a política de subsídios adotada na União Europeia (U.E.) quando associada à otimização do uso das terras e à economia de escala, fatores que estimulam o aumento do tamanho dos rebanhos e proporcionaram a manutenção da enfermidade devido à retenção dos animais por períodos mais prolongados. A partir destes resultados, os autores passaram a simular modelos financeiros simples para o tamanho ideal de rebanhos, incluindo então a incidência de tuberculose, como fator importante na eficiência das propriedades. Nas simulações feitas observou-se que 90% dos rebanhos infectados com até 20 animais, conseguem sanear o rebanho depois de dois testes consecutivos, já a chance de saneamento dos rebanhos após dois testes consecutivos, baixa para 55% se o rebanho for de 400 animais.

Com relação ao tipo de exploração como fator de risco, grande parte das pesquisas mostra que as maiores prevalências da tuberculose ocorrem em rebanhos de produção de leite (COSIVI *et al.*, 1998; BELCHIOR, 2000; HUMBLET; BOSCHIROLI; SAEGERMAN, 2009;). Entretanto, Munroe *et al.* (1999), em estudo realizado em seis focos de tuberculose registrados entre 1985 e 1995, em rebanhos leiteiros e de corte no Canadá, não detectaram diferença de prevalência entre os dois tipos de exploração.

No estado de Minas Gerais, Gonçalves *et al.* (2003), avaliaram 1586 rebanhos nas regiões de maior produção de leite e observaram que os rebanhos com manejo intensivo, caracterizados pela utilização de ordenhadeira mecânica; têm mais risco de tuberculose bovina quando associados à prática de confinamento do rebanho; expresso pela razão das prevalências em 3,1; apesar da fração atribuível populacional dos rebanhos com tuberculose devido aos fatores de risco identificados, representava somente 15%.

Segundo Salazar (2005), o risco de infecção em bovinos de corte é mínimo quando mantidos em baixa densidade populacional e em pastagens, mas quando mantidos em confinamento, o risco de transmissão é semelhante ao dos rebanhos leiteiros.

O contato com populações de animais silvestres é considerado fator de risco para rebanhos domésticos e podem ser responsabilizados como hospedeiros mantenedores permanente ou transitório do *Mycobacterium bovis* na vida selvagem ou em cativeiro, podendo introduzir ou reintroduzir a doença em rebanhos bovinos.

Particularmente em países desenvolvidos, onde a tuberculose bovina foi erradicada ou está em fase de erradicação, espécies silvestres têm grande importância como reservatório do *Mycobacterium bovis* (MORRIS; PFEIFFER; JACKSON, 1994; MORRIS; PFEIFFER, 1995; GRIFFIN *et al.*, 2005; BRASIL, 2006; LIVINGSTONE *et al.*, 2006).

Apesar de muitas espécies silvestres serem suscetíveis ao *Mycobacterium bovis*, poucas são responsabilizadas pela manutenção da infecção na natureza e pela transmissão para outros animais. No Reino Unido e Irlanda o texugo (*Meles meles*), na Nova Zelândia o marsupial (*Trichosurus vulpecula*), na América do Norte o bisão e cervos, na África e Austrália os búfalos são hospedeiros mantenedores da infecção e responsáveis pela reintrodução da doença em rebanhos bovinos (MORRIS; PFEIFFER; JACKSON, 1994; RODWELL *et al.*, 2001; GRIFFIN *et al.*, 2005).

Abrahão (1998), em revisão de literatura menciona que apesar dos animais silvestres não terem importância epidemiológica na transmissão da infecção por *Mycobacterium bovis* no Brasil, as autoridades sanitárias brasileiras precisam estar atentas para evitar que, futuramente, animais silvestres façam parte da cadeia epidemiológica da tuberculose em bovinos e por esta razão, vale mencionar que no Estado do Paraná em 2010, segundo relato pessoal do Professor Renato Silva patologista da Universidade Federal do Paraná, foram detectadas lesões granulomatosas e isolado *Mycobacterium bovis* em linfonodos e pulmão de um quati de vida livre encontrado morto nos arredores do Zoológico de Curitiba.

A participação dos animais silvestres na transmissão da tuberculose para animais de produção e para humanos é de interesse global, no entanto as medidas sugeridas para o manejo e controle da infecção na vida silvestre são complexas e controversas, pois muitas vezes a recomendação é o uso do controle populacional como estratégia (NISHI; SHURY; ELKIN, 2006).

Outros fatores de risco vinculados ao rebanho foram pesquisados por Reilly e Courtenay (2007) em estudo de caso-controle realizado no Reino Unido com 171 propriedades entre 1995 a 1999. Foram avaliadas diferentes práticas de manejo como potenciais fatores de risco de introdução da tuberculose e sua manutenção nos rebanhos. Os autores concluíram que a probabilidade de introdução da doença é fortemente influenciada pela compra de gado, por outro lado a manutenção da doença parece ser mais afetada pelas condições de manejo como: método de estocagem de alimentos/silagem;

contato com animais infectados de propriedades vizinhas e contato com texugos. Os fatores que influenciaram a introdução e manutenção da tuberculose foram interrupção das rotinas de teste de diagnóstico, tamanho de rebanho, localização da propriedade e densidade de texugos, além de características das propriedades como: rebanhos com mais que 0,8 bovino por hectare, regime de rotação de pastagem, suplementação com melado, suplementação mineral, rebanhos mistos ou de leite, alimentação com feno, entre outros.

Os fatores de risco relacionados com a presença da tuberculose bovina em uma região ou em um país sofrem influência da prevalência e de antecedentes da doença, contiguidade com outros rebanhos infectados, movimentações transfronteiriças e migratórias informais de pessoas em áreas limítrofes entre regiões e países com diferentes condições sanitárias. A migração sazonal de animais silvestres e comércio, ilegal ou legal por zoológicos, reservas naturais assim como a reintrodução de animais em programas de conservação da natureza também são considerados fatores de risco em regiões de fronteiras (HUMBLET; BOSCHIROLI; SAEGERMAN, 2009).

Johnston *et al.* (2011) em estudo do tipo caso-controle com 802 propriedades, 401 casos e 401 controles, realizado em áreas de maior risco de tuberculose na Inglaterra e País de Gales, detectaram fatores de risco relacionados com a região, propriedades com áreas contíguas a propriedades com histórico de tuberculose e exposição do rebanho a animais silvestres como o texugo.

Rodwel *et al.* (2008) em um estudo retrospectivo visando estimar a prevalência e fatores de risco da tuberculose humana na fronteira entre o México e a Califórnia - EUA, utilizaram dados da vigilância da tuberculose humana no período de 1994 até 2005 e identificaram mudanças na participação do agente etiológico no estado da Califórnia. A prevalência de infecção pelo *Mycobacterium bovis* representou 45% (62/138) em crianças menores de 15 anos de idade e 6% (203/3153) dos casos em adultos. No período analisado, a incidência do *Mycobacterium bovis* aumentou significativamente com o tempo ($p=0.002$) enquanto a incidência do *Mycobacterium tuberculosis* decresceu ($p<0.001$), especialmente entre as pessoas de etnia hispânica, corroborando a influência das migrações e das áreas limítrofes entre países. Os autores sugerem que a tradição cultural dos mexicanos de consumir leite e queijos frescos sem pasteurização, oriundos do México, aumenta o risco de exposição das pessoas ao *Mycobacterium bovis* apesar do sucesso do programa americano de erradicação de tuberculose bovina.

Os fatores de risco podem ser comuns a algumas regiões e específicos a outras, provavelmente devido às características locais, situações epidemiológicas restritas e efeito de programas de controle adotados. Neste sentido, as diferenças entre países em desenvolvimento e países desenvolvidos devem ser consideradas na elaboração das estratégias dos programas sanitários (HUMBLET; BOSCHIROLI; SAEGERMAN, 2009).

1.5 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da tuberculose em bovinos pode ser realizado de forma direta ou indireta, por métodos clínicos, anatomopatológicos ou laboratoriais. O exame clínico apresenta como principal limitação o fato dos sinais clínicos aparecerem somente em fases mais avançadas da doença. A evolução da enfermidade geralmente é lenta e os sinais mais comuns são; caquexia progressiva, tosse seca e repetitiva, linfadenomegalia localizada ou generalizada. Por sua vez, animais com tuberculose avançada podem apresentar queda na sensibilidade à tuberculina ou mesmo anergia, sendo importante sua identificação especialmente nos casos de rebanhos em saneamento por se constituírem na principal fonte de infecção (LAGE *et al.*, 1998; BRASIL, 2006; RUGGIERO *et al.*, 2007).

O diagnóstico anatomopatológico feito por meio da inspeção de carcaças ou necropsia detalhada é importante ferramenta no diagnóstico da tuberculose em bovinos. O método tem suas limitações, pois alguns processos inflamatórios granulomatosos apresentam características morfológicas semelhantes às descritas para os casos de tuberculose. Infecções por *Nocardia spp.*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Actinomyces bovis*, *Actinobacillus lignieresii*, fungos e infestação por larvas de parasitos podem induzir a erros de diagnóstico (SALAZAR, 2005). Os achados mais comuns são: nódulos de 1 a 3 cm de diâmetro, que podem confluir e apresentar aspecto purulento ou caseoso, ou ainda, calcificar em estágios mais avançados da doença. Na maioria das vezes, estes nódulos são encontrados em linfonodos mediastínicos, retrofaríngeos, bronquiais, parotídeos, cervicais, inguinais superficiais e mesentéricos, no pulmão, fígado, intestino, tecido mamário ou qualquer outro órgão. Estes materiais podem ser coletados e enviados para diagnóstico laboratorial. É importante salientar que animais reagentes aos testes tuberculínicos podem não apresentar lesões macroscópicas visíveis ao olho nu (BRASIL, 2006).

Os fragmentos de amostras clínicas podem ser submetidos a exames histopatológicos. A lesão característica da tuberculose é o tubérculo com necrose caseosa central, circundada por células gigantes de Langhans, podendo estar presentes células linfocitárias e plasmocitárias. Com o envelhecimento da lesão ocorre aumento do tecido conjuntivo. Pode ser empregada ainda citologia que permite a identificação de processos granulomatosos com encontro de células epitelióides ou multinucleadas mescladas com várias proporções de macrófagos, linfócitos e plasmócitos. A técnica é de fácil execução, rápida e de custo inferior, podendo ser utilizada no frigorífico (WHITNEY; ROUSSEL; COLE, 1999; JONES; HUNT; KING, 2000; OKANO, 2007).

Amostras clínicas podem ser examinadas diretamente por baciloscopia. Os esfregaços são corados pelo método de Ziehl-Neelsen para pesquisa de bacilos álcool ácido resistentes (BAAR). Esta metodologia é empregada usualmente no Brasil para o diagnóstico rápido da tuberculose no homem e em animais. Um resultado positivo sugere fortemente tratar-se de micobactéria, mas a sensibilidade é baixa e não distingue o bacilo humano do animal (RUGGIERO *et al.*, 2007; VARELLO *et al.*, 2008).

O diagnóstico definitivo da tuberculose deve ser efetuado mediante o isolamento e a identificação do agente por métodos bacteriológicos. Para obter o isolamento de diferentes espécies do gênero *Mycobacterium* é indicada semeadura das amostras clínicas paralelamente nos meios de Löwenstein-Jensen e de Stonebrink-Lesslie (RIBEIRO, 2006). O *Mycobacterium bovis* tem seu crescimento dificultado em meios que contenham glicerol, sendo essa uma característica importante para diferenciação do *Mycobacterium tuberculosis*. Algumas cepas de *Mycobacterium bovis* crescem exclusivamente em meios de cultura suplementados com piruvato ao invés de glicerol, por isto, se recomenda a semeadura no meio de Löwenstein-Jensen suplementado com glicerol e no meio de Stonebrink-Lesslie, isento de glicerol, mas enriquecido com piruvato (LATINI *et al.*, 1990; De KANTOR; RITACCO, 1994). A identificação das micobactérias é feita pelas propriedades bioquímicas e fenotípicas da colônia (QUINN *et al.*, 2004; BRASIL, 2005).

As técnicas microbiológicas empregadas no isolamento do *Mycobacterium bovis* têm como desvantagens a baixa sensibilidade, além da necessidade da incubação por 30 a 90 dias (RODRIGUEZ *et al.*, 2004). Baseando-se nestas restrições, o PNCEBT recomenda o exame bacteriológico para situações específicas como: confirmação da presença de infecção em bovinos importados de um país ou região onde não foi comprovada

anteriormente; estudo de animais positivos aos testes tuberculínicos sem lesões macroscópicas visíveis, confirmação da infecção em animais positivos aos testes tuberculínicos em propriedades consideradas livres; pesquisa de micobactérias em lesões sugestivas de tuberculose, encontradas durante a inspeção *post-mortem* de animais provenientes de propriedades monitoradas; pesquisa de micobactérias em amostras de leite e outros produtos de origem animal; necropsia de animais com reações inespecíficas, nos quais são encontradas lesões sugestivas de tuberculose (BRASIL, 2006).

A partir da década de 90, do século XX, diferentes técnicas de biologia molecular foram descritas e padronizadas para a utilização na rotina laboratorial de diagnóstico de doenças de etiologia viral e bacteriana. Com relação à tuberculose essas técnicas tem proporcionado grande impulso na investigação epidemiológica da doença, tanto em humanos quanto em animais e fornecendo ferramentas que permitem a identificação de novas cepas do agente etiológico, possibilitando assim, a comparação das sequências genômicas dos novos isolados com aquelas de cepas padrão já estabelecidas depositadas em banco de dados de acesso público (GenBank) (NIEMANN; RICHTER; RÜSCHGERDES, 1999).

Uma das técnicas utilizadas para a detecção e genotipagem do *Mycobacterium* spp é a Análise do Polimorfismo do Tamanho dos Fragmentos de Restrição (RFLP) das sequências de inserção *IS6110* e *IS1081* (RETAMAL; MARTÍNEZ; ABALO, 2003). Os elementos repetitivos (IS) são encontrados em diferentes sítios do cromossomo de *Mycobacterium tuberculosis* e determinam grande heterogeneidade genotípica entre os isolados (VITALE *et al.*, 1998; ZANINI *et al.*, 2001). Essa técnica tem grande valor epidemiológico, principalmente em populações onde a epidemiologia da doença é desconhecida. A técnica possibilita diferenciar os isolados porque ambos os IS pesquisados são específicos das bactérias que integram o complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Tanto a presença quanto o número de cópias dos IS variam entre as cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (*IS6110*) e *Mycobacterium bovis* (*IS1081*) (MAZUREK *et al.*, 1991; YANG *et al.*, 1998).

Miyata *et al.* (2008) verificaram que, em algumas situações, a técnica da PCR pode falhar no diagnóstico pela ausência de cópias da *IS6110*. Nessas situações a técnica de *Restriction Enzyme Pattern Analysis* (PRA-PCR), tem demonstrado eficiência e versatilidade.

Segundo Araújo *et al.* (2005) a técnica de PRA-PCR, descrita para genotipagem do gene que codifica uma proteína de 65-kDa do gênero *Mycobacterium* (TELENTINE *et al.*, 1993), falha na diferenciação de *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium tuberculosis*. No estudo conduzido pelo grupo, duas amostras isoladas e identificadas como MTC por PRA-PCR também podem ser *Mycobacterium bovis* que não foram amplificadas pelos “*primers*” específicos para a espécie (JB21/JB22) descritos por Rodriguez *et al.* (1995). Esse resultado se deve, possivelmente, pela ausência da sequência alvo, sugerindo que a utilização de uma única técnica molecular pode gerar resultados falsos negativos.

A PCR é utilizada para amplificar um produto da sequência do gene *hsp65*, específico do gênero *Mycobacterium*, que posteriormente é digerido com as enzimas de restrição BstII e HaeIII (MIYATA *et al.*, 2008). Para o diagnóstico da tuberculose animal a técnica de PCR vem sendo utilizada em amostras clínicas ou em isolados de cultivo (SAKAMOTO *et al.*, 1999). A técnica é considerada específica, sensível, capaz de detectar pequenas quantidades de bacilos vivos ou mortos na amostra e reduzir consideravelmente o tempo necessário para conclusão do diagnóstico definitivo para apenas alguns dias (RUGGIERO *et al.*, 2007). A PCR é considerada importante para a obtenção de resultados mais confiáveis mesmo quando comparada com as técnicas tradicionais como: diagnóstico bacteriológico por testes bioquímicos e fenotípicos, isolamento da bactéria a partir de técnicas clássicas (RODRIGUEZ *et al.*, 2004). Alguns dos fatores que podem limitar a utilização rotineira da PCR com o objetivo de diagnóstico são a complexidade da prova (ZANDEN, 2002); a metodologia de extração do ácido nucleico (DNA) das amostras clínicas; a presença de inibidores da PCR em amostras de tecidos (MANGIAPAN *et al.* 1996); e o par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) selecionado (RUGGIERO *et al.*, 2007).

O diagnóstico direto da tuberculose bovina utilizando a combinação de técnicas de bacteriologia clássica, como o isolamento da bactéria, seguido da identificação por métodos moleculares tem sido sugerido por diferentes autores como o uso de: PRA-PCR (TELENTINE *et al.*, 1993), *Spolygotyping* (KAMERBEEK *et al.*, 1997; VAN SOOLINGEN *et al.*, 1994) e MIRU-VNTR (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Units-Variable Number Tandem*) (SUPPLY *et al.*, 2000).

Uma técnica alternativa para diferenciar as bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* é a PCR multiplex, que utiliza conjuntos de *primers* específicos para diferentes regiões do genoma bacteriano. Porém, essa técnica só pode ser empregada

com sucesso em amostras provenientes de regiões livres de *Mycobacterium africanum* (YEBOAH-MANU; YATES; WILSON, 2001).

A técnica molecular *Spoligotyping* permite a identificação e tipificação simultânea de micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. A técnica detecta a presença e ou ausência de espaçadores do locus de Repetição Direta (DR), o que permite a diferenciação entre as cepas de *Mycobacterium bovis* (DR39) e *Mycobacterium tuberculosis* (DR43) (KAMERBEEK *et al.*, 1997). Essa região no *Mycobacterium bovis* contém grande número de DRs com tamanho de 36 pares de bases (pb) intercaladas com DNA espaçadores (DVRs) com 35 a 41 pb. Quando a região DR de diferentes isolados é comparada, observa-se que a ordem dos espaçadores é praticamente a mesma em todos os isolados, mas ocorrem deleções e inserções nos DVRs. O polimorfismo dos vários isolados é representado pela presença ou pela ausência de um ou mais DVRs. Dessa forma, o *Spoligotyping* detecta a presença ou ausência de sequências conhecidas de espaçadores e essa característica é empregada para determinar a similaridade entre as cepas (KAMERBEEK *et al.*, 1997).

Rodriguez *et al.* (2004) utilizando a técnica de *Spoligotyping* em 43 isolados de *Mycobacterium bovis*, provenientes de bovinos abatidos no estado de São Paulo, detectaram 12 diferentes espoligotipos. Os resultados obtidos mostraram que as amostras brasileiras compartilham espoligotipos com amostras provenientes da Argentina e da Europa, evidenciando relações epidemiológicas entre as cepas de *Mycobacterium bovis* provenientes dessas regiões.

Apesar da diversidade das técnicas de biologia molecular que podem ser empregadas em medicina veterinária, com a finalidade de diagnóstico e de tipificação de micobacterioses em bovinos, dificilmente as técnicas tradicionais de identificação do agente etiológico serão completamente substituídas. Para Ruggiero *et al.* (2007), o objetivo da adoção dessas técnicas é facilitar o diagnóstico, diminuindo o tempo necessário para confirmação da presença do agente, bem como possibilitar a identificação de fatores de risco e a adoção mais rápida de medidas de controle da doença na população humana e animal.

Por outro lado, há também métodos indiretos de diagnóstico da tuberculose que determinam a resposta do animal ao agente etiológico. Essa resposta pode ser humoral, com produção de anticorpos circulantes ou celular, mediada por linfócitos e macrófagos (LAGE *et al.*, 1998). A prova tuberculínica é uma reação alérgica mediada por

células e classificada como reação de hipersensibilidade tardia do tipo IV. Como antígenos ou alérgenos são utilizadas tuberculinas de dois tipos: derivado proteico purificado (PPD) bovino, procedente do *Mycobacterium bovis*; e o PPD aviário proveniente do *Mycobacterium avium* (MONAGHAN *et al.*, 1994).

Os países que têm programa oficial de controle da tuberculose bovina devem garantir a utilização de alérgenos de acordo com padrões recomendados pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) para que os resultados possam ser comparáveis (De KANTOR; RITACCO, 2006).

No Brasil, o PPD bovino é produzido a partir da amostra AN5 de *Mycobacterium bovis*, contendo 1mg de proteína por mL e o PPD aviário, produzido a partir da amostra D4 de *Mycobacterium avium*, contendo 0,5 mg de proteína por mL (BRASIL, 2006). O controle da produção e da qualidade dos PPDs, está regulamentado pela Portaria Nº 64 de 18 de março de 1994 (BRASIL, 1994). As amostras de referência são fornecidas pelo Laboratório Nacional de Minas Gerais - LANAGRO-MG aos laboratórios produtores e cada partida produzida é submetida a testes de controle do volume da dose, potência biológica, esterilidade e inocuidade pelo próprio LANAGRO-MG. A venda dos PPDs desde 28 de julho de 2002, está sob controle exclusivo do serviço oficial de saúde animal dos estados. Somente Médicos Veterinários habilitados pelo serviço oficial para fazer o diagnóstico podem adquirir os antígenos (BRASIL, 2006).

As provas de tuberculinização são ferramentas básicas de diagnóstico utilizadas em programas de controle e erradicação da tuberculose bovina em todo o mundo. No Brasil, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose- PNCEBT indica para o diagnóstico da tuberculose em bovinos e bubalinos o Teste da Prega Caudal (TPC), o Teste Cervical Simples (TCS) e o Teste Cervical Comparativo (TCC). O TPC e TCS são testes de triagem e o TCC confirmatório. O TPC é indicado para uso rotineiro em estabelecimentos de criação especializados na pecuária de corte (BRASIL, 2006).

A acurácia dos testes de diagnóstico é primariamente definida em termos de sua sensibilidade e especificidade, calculadas respectivamente das proporções de animais infectados e não infectados, diagnosticados corretamente. Na aplicação dos testes de diagnóstico à populações, esses dois parâmetros são frequentemente considerados constantes para diferentes populações com características variáveis. Entretanto, para o diagnóstico da tuberculose raramente isso se aplica, já que o resultado do teste pode ser

influenciado pelo estágio e severidade da enfermidade, prevalência de reações cruzadas com outros micro-organismos e fatores relacionados ao hospedeiro (De LA RUA-DOMENECH *et al.*, 2006).

O'Reilly e Daborn (1995) relataram que a sensibilidade dos testes de tuberculinização é influenciada pelo ponto de corte, potência e dose da tuberculina administrada, intervalo pós infecção e pós parto, eventuais variações na aplicação da técnica e leitura da reação, além de outros fatores. A especificidade é influenciada pelas tuberculinas, teste utilizado, tabela de interpretação e eventual exposição do bovino ao *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium paratuberculosis* ou outras micobactérias de origem ambiental.

De La Rua-Domenech *et al.* (2006), com base em dados da literatura, relataram que a sensibilidade do TPC e do TCSs variou entre 63,2% e 100% com mediana de 83,9%, sendo a TCS considerada mais sensível. A especificidade do TCS variou entre 75,5% e 99,0% e do TPC entre 96,8% e 99,0%.

De acordo com Lôbo (2008), as estimativas de sensibilidade e de especificidade do TCC calculados pela densidade de probabilidade (Distribuição Pert) tendo como base os dados de várias publicações foram respectivamente de 77,5% e 99,5%.

Outro teste que pode ser empregado para avaliar a resposta imune celular na infecção por *Mycobacterium bovis*, é a dosagem de interferon gama (IFN- γ). O teste é recomendado para complementar as provas intradérmicas utilizadas no diagnóstico da tuberculose em países com programas oficiais de controle e erradicação da tuberculose bovina. Ele é usado rotineiramente na Austrália, desde 1991, onde foi desenvolvido nos anos 80 e, na Nova Zelândia, desde os anos 90. O teste tem dois objetivos estratégicos: uso em paralelo com provas alérgicas para aumentar a sensibilidade diagnóstica possibilitando a detecção de animais tuberculosos recém infectados e, uso em série para aumentar a especificidade diagnóstica em regiões em fase de erradicação onde as reações inespecíficas podem ser mais prevalentes, diminuindo o tempo de quarentena dos animais inconclusivos ao TCC (De LA RUA-DOMENENCH *et al.*, 2006).

O teste do IFN- γ está fundamentado na dosagem *in vitro* de uma citocina em amostras de sangue total. Animais infectados por *Mycobacterium bovis* possuem no sangue linfócitos T (Th1), que reconhecem antígenos de *Mycobacterium bovis* e respondem a estimulação com PPD bovina liberando citocinas, entre as quais IFN- γ detectado pelo ELISA

de captura com anticorpo monoclonal (LAGE *et al.*, 1998; WOOD *et al.*, 1991; JONES *et al.*, 1992). Esse ensaio apresenta como vantagem o fato de não ser invasivo, podendo ser realizado várias vezes e sem intervalo de tempo, e em relação ao teste tuberculínico, proporciona ainda, a vantagem de que para seu uso, o animal precisa ser contido somente uma vez. Porém, oferece algumas restrições como, elevado custo, necessidade de tempo restrito para o processamento das amostras de sangue (até 8h após a coleta) e a possibilidade da ocorrência de resultados falso-positivos, em razão das reações cruzadas com micobactérias inespecíficas. Reações inespecíficas podem ser diagnosticadas pela utilização concomitante de PPD bovina e PPD aviária (De KANTOR; RITACCO, 1994; WOOD; ROTHEL, 1994; ABRAHÃO, 1998).

Gonzáles Llamares *et al.* (1999) e UK (1999) estimaram os valores de sensibilidade e especificidade do teste do IFN- γ respectivamente em 61 a 97% e 90,6 a 99,6%. Scacchia *et al.* (2000) compararam a tuberculinização cervical com o teste do IFN- γ (*kit Bovine Gamma Interferon Test* [Bovigam-CSL Veterinary Limited] e relataram sensibilidade de 70,3 e 91,7%, respectivamente. A especificidade do teste do IFN- γ foi de 84,3%.

No Brasil, Marassi, Medeiros e Lilenbaum (2010), fizeram uma série de ensaios com o teste do IFN- γ e sugeriram seu uso em animais inconclusivos aos testes intradérmicos, diminuindo o intervalo entre testes e, por consequência, o tempo de quarentena.

A existência de animais infectados e que não são identificados pelos testes alérgicos intradérmicos, deve ser considerada quando um programa de controle extensivo está em desenvolvimento, porque este fato pode atrasar e até comprometer o seu sucesso. Animais infectados em estágio avançado da doença e não diagnosticados pelas provas de tuberculinização, tendem a eliminar o *Mycobacterium bovis* pela via respiratória e assim infectar outros animais do rebanho. Uma das possibilidades de detecção destes animais com anergia é o uso de testes que detectam anticorpos humorais como ELISA e de polarização de fluorescência TPF (SURUJBALLI *et al.*, 2002; LILENBAUM; FONSECA, 2006).

Para a realização do TPF e do ELISA foram pesquisados antígenos não purificados de *Mycobacterium bovis*, PPDs de diferentes culturas de *Mycobacterium bovis* e proteínas MPB70 e MPB83 extraídas do *Mycobacterium bovis* (AUER, 1987; RITACCO *et al.*,

1987; RITACCO *et al.*, 1988; PLACKETT *et al.*, 1989; HARBOE *et al.*, 1990; HARBOE *et al.*, 1995).

Lilenbaum e Fonseca (2006) detectaram animais infectados pelo teste ELISA em dois rebanhos do estado do Rio de Janeiro e que eram negativos aos testes de tuberculinização recomendados pelo PNCEBT. Os resultados do ELISA foram confirmados pelo isolamento de *Mycobacterium bovis* das lesões pulmonares. O antígeno empregado para a realização do teste sorológico foi PPD bovina (TECPAR, Brasil). Os valores de sensibilidade e especificidade do ELISA foram de 86,7 e 90,6%, respectivamente (LILENBAUM; RIBEIRO; SOUZA, 1999).

Testes de fluorescência polarizada (TFP) foram pesquisados, usando a proteína MPB70 marcada com isotiocianato de fluoresceína para detecção de anticorpos anti-MPB70 em animais herbívoros silvestres infectados por *Mycobacterium bovis* (LIN *et al.*, 1996) e em soros de bovinos naturalmente infectados (SURUJBALLI *et al.*, 2002). Os autores afirmam que a boa sensibilidade e especificidade aliadas à simplicidade, rapidez na execução e baixo custo da técnica, tornam a TFP um método diagnóstico sorológico atrativo para ser utilizado em conjunto com os testes de tuberculinização ou o teste do IFN- γ . Em função dessas características e após o uso no Chad, África Central, Ngandolo *et al.* (2009), recomendaram a TPF para o diagnóstico da tuberculose em bovinos em países em desenvolvimento.

1.6 ESTRATÉGIAS E PROGRAMAS DE CONTROLE E ERRADICAÇÃO

Como estratégia global para manter o livre comércio de forma segura, o Código Sanitário para os Animais Terrestres da OIE, pelo artigo 11.6 regulamenta os critérios para zoneamento e compartimentação da tuberculose bovina (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL -OIE, 2012).

Como estratégia local, todos os países que erradicaram a tuberculose em bovinos e os que a mantêm sob controle, utilizam sistematicamente e por longo tempo as provas de tuberculinização intradérmica, associadas a repetição do teste com abate do animal infectado, vigilância em estabelecimentos de abate e restrições na movimentação de bovinos (DE LA RUA-DOMENECH, 2006).

A seleção da estratégia a ser adotada para cada enfermidade deve ser fundamentada em sua história e na magnitude de seu impacto (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE - OPS, 1986). Estas informações podem ser obtidas por meio de registros isolados de investigações laboratoriais, estudos epidemiológicos e pelo uso de técnicas estocásticas de simulação de estratégias que podem fundamentar a escolha da melhor opção para cada situação. Programas de controle e erradicação da tuberculose bovina devem ser avaliados periodicamente e revisados, quando necessário.

Barlow *et al.* (1998), para conhecer melhor o padrão de transmissão da tuberculose entre rebanhos bovinos da Nova Zelândia, utilizaram como modelo os focos de tuberculose bovina ocorridos no período de 1988 a 1993, na Ilha Waikato, norte da Nova Zelândia. Os autores observaram a ocorrência de 0,8% de novos focos/ano e destes, 81% não foram influenciados por reservatórios silvestres e que, 13% do total dos focos tiveram influência dos animais silvestres. O resultado do estudo sugere mudança de estratégia para os próximos 10 anos, combinando a redução do percentual de rebanhos sob controle de movimentação de 0,76% para 0,20%, com a redução do intervalo de testes em toda a região, associado à redução de animais silvestres infectados no sul de Waitomo.

Perez *et al.* (2002), usando simulações estocásticas, estudaram três rebanhos leiteiros na província de Santa Fé – Argentina, para comparar o impacto de diferentes estratégias de erradicação da tuberculose bovina mediante teste e abate. Os autores concluíram que quando a prevalência da doença for igual ou maior a 22%, a melhor estratégia é o despovoamento total do rebanho e observaram ainda, em relação às provas de diagnóstico, que em média a prova cervical simples foi menos eficiente que a prova comparada e que a prova caudal quando associada ao teste do IFN- γ é mais eficiente na eliminação da tuberculose dos rebanhos.

A OIE (2012) sugere como opção para regiões onde se pretende reduzir a prevalência da tuberculose, incentivar a intensificação da certificação de propriedades livres, visto que uma extensa área contígua destas propriedades pode facilitar a regionalização, criando zonas livres da doença.

Lôbo (2008), simulando o impacto financeiro de algumas variáveis econômicas e de produção de rebanhos brasileiros em certificação, com a produção leiteira por vaca, verificou que a razão benefício-custo é muito sensível à média da produção leiteira e ao recebimento de adicionais no preço do leite, sendo pouco sensível à variação dos custos

dos serviços veterinários. Assim sendo, a certificação é mais viável para as propriedades leiteiras de maior produtividade, visto que no Brasil não existe subsídio para esta atividade.

Na Europa a maioria dos países iniciou o combate à tuberculose bovina na década de 30 do século XX, mas somente após a segunda guerra mundial as campanhas de erradicação da doença foram intensificadas pelos governos baseando-se na tuberculinização sistemática dos rebanhos, sacrifício de reagentes e restrições à movimentação de rebanhos infectados. Na década de 50, a participação nos programas de controle e erradicação, tornou-se compulsória em muitos países europeus: Grã Bretanha em 1950; França em 1955; Irlanda e Irlanda do Norte em 1957; Polônia e Tchecoslováquia em 1959. Os países do sul da Europa aderiram mais tardiamente ao programa, como a Itália, em 1977 (DE LA RUA-DOMENECH, 2006).

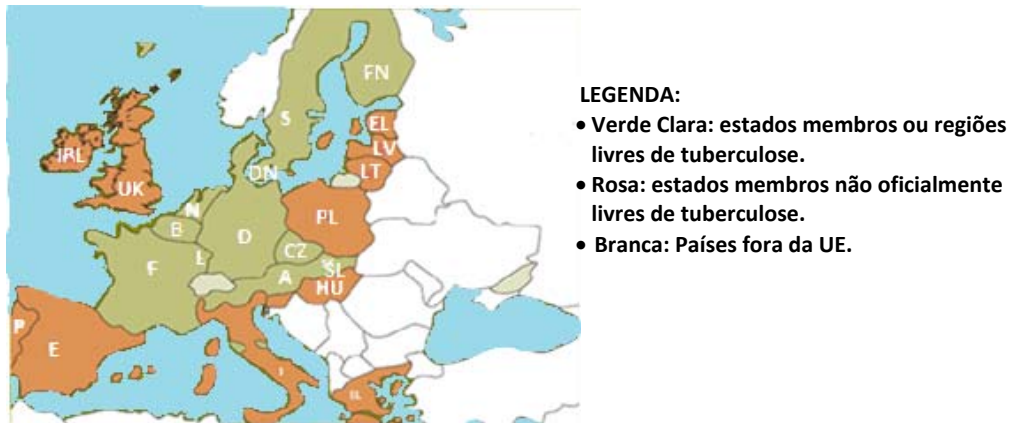
Segundo Reviriego Gordejo e Vermeersch (2006), a Diretiva 64/432/EEC de 26 de junho de 1964 (EUR-LEX, 2012a) foi a primeira tentativa conjunta da comunidade econômica europeia para regulamentar e facilitar o comércio intracomunitário de bovinos. A diretiva estabeleceu normas para criação e manutenção de rebanhos, regiões e países livres de tuberculose. Para a certificação de rebanhos livres, todos os animais acima de seis meses de idade devem passar por dois testes de tuberculinização negativos com intervalo de seis meses entre eles. Posteriormente, os rebanhos devem ser testados uma vez ao ano para manutenção da condição de livre da doença. Quando o estado membro obtiver um percentual menor ou igual a 0,1% de rebanhos infectados/ano durante seis anos consecutivos e, todos os bovinos abatidos estiverem sob controle da inspeção oficial, a unidade geográfica pode ser declarada livre de tuberculose e dispensar o teste cutâneo rotineiro. Alguns anexos desta Diretiva preveem o uso do teste de tuberculinização comparada para o reteste de animais inconclusivos ou, como confirmatória da prova simples.

Em 1977, a Diretiva 77/391/EEC (EUR-LEX, 2012b) estabeleceu medidas comunitárias para a erradicação da brucelose, tuberculose e leucose bovina, obrigando os estados membros a implantar seus programas.

A Diretiva 1226/2002 (EUR-LEX, 2012c) de 08 de julho de 2002, redefine os padrões das tuberculinas bovina e aviária e admite a utilização do teste do IFN- γ (BOVIGAM[®]) como teste paralelo.

Vários estados obtiveram sucesso com os programas de erradicação, sendo declarado oficialmente como estado membro, livre de tuberculose. A situação em 30 de setembro de 2005 é apresentada na Figura 1.

Figura 1 - Mapa da União Europeia - UE com estados membros (ou regiões) de acordo com a condição sanitária oficial da tuberculose bovina em 30 de setembro de 2005



Fonte: Adaptado de De La Rua-Domenech (2006).

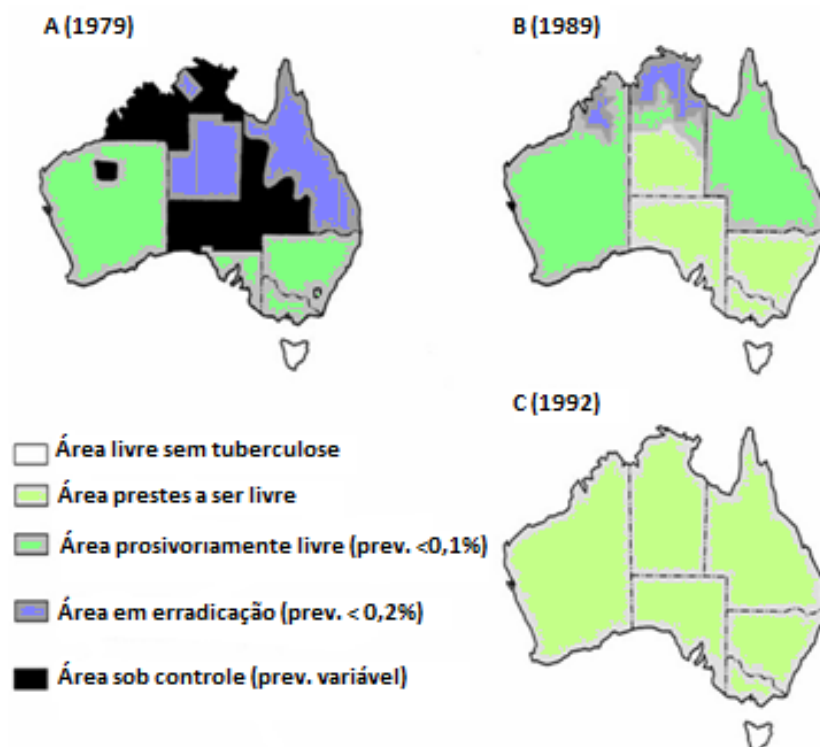
Segundo Reviriego Gordejo e Vermeersch (2006), a Dinamarca obteve a condição de livre em 1980, Países Baixos em 1995, Alemanha e Luxemburgo em 1997, Áustria e algumas regiões da Itália em 1999, França em 2001, Bélgica em 2003, Finlândia e Suécia em 1995 e a República Tcheca em 2004. Em contraposição, o Reino Unido, Irlanda, Espanha, Itália e, em menor grau, Grécia e Portugal tem dificuldade na erradicação devido à ocorrência de focos de tuberculose causados principalmente pela presença de reservatórios silvestres, de animais infectados, uso de pastagens alugadas, pastoreio em áreas comuns, grande movimentação de animais, alta densidade animal, testes parciais do rebanho, falta de cumprimento das regras do programa ou a combinação destes fatores (DE LA RUA-DOMENECH, 2006).

Na Austrália, a tuberculose foi introduzida, provavelmente no século XIX, com a importação de bovinos da Grã Bretanha. Registros dos governos estaduais indicavam que a doença, aparentemente, não existia na Ilha da Tasmânia. No estado de Victoria a estimativa de prevalência nos anos 50, estava em torno de 1,28% no período de 1951-1952, no estado de South Austrália a prevalência estimada era de 0,3% em 1951, no de New South Wales era de 0,5% em 1960 e no estado de Queensland, a prevalência caiu de 12% em 1945 para menos de 1% por volta de 1960 (COUSINS; ROBERTS, 2001). Inicialmente os estados

australianos adotavam voluntariamente medidas de controle como exame de animais e eliminação dos reagentes. Em 1940 tornaram-se obrigatórios os exames nos rebanhos leiteiros com eliminação e indenização pelos animais reagentes. Na década de 60, a tuberculose em rebanhos leiteiros, com raras exceções, estava sob controle, mas em rebanhos de corte o problema persistia com prevalência variando em determinadas regiões de 1 a 5% e em alguns casos acima de 30% (COUSINS *et al.*, 1998).

Segundo Cousins e Roberts (2001) em 1970, o governo federal lançou o programa de erradicação da tuberculose com apoio financeiro da indústria de carne e do leite. No início, as propriedades foram classificadas como: Não Avaliadas; Suspeitas; Infectadas; Restritas; Provisoriamente saneadas; Confirmadas livres; Confirmada livre 1; Confirmada livre 2; Confirmada livre 3; Testada Negativa ou Monitorada Negativa. Com base nestas classificações, foram definidos parâmetros de movimentação dos animais entre os rebanhos e construídos blocos de propriedades com os mesmos níveis sanitários, permitindo assim, a formação de uma área de controle; uma área em erradicação; uma área provisoriamente livre; uma área prestes a ser livre e finalmente, uma área livre (Figura 2).

Figura 2 - Mapa da evolução da situação da tuberculose por áreas da Austrália. (A) Situação em 1979, (B) Situação em 1989, (C) Situação em 1992.



Fonte: Adaptado de Cousins e Roberts (2001)

O programa australiano se baseou, essencialmente, na utilização repetida do teste da prega caudal para detecção de animais reagentes e seu abate, associado ao controle da movimentação dos animais e complementado pelo monitoramento e rastreamento das carcaças confirmadas com tuberculose. Na fase final da erradicação foram eliminados rebanhos inteiros com suspeita de infecção. Em 1980, o teste do IFN- γ , desenvolvido na Austrália, passou a ser utilizado em combinação com o teste da prega caudal (DE LA RUA-DOMENECH, 2006).

Um grande desafio do programa na Austrália foi o elevado número de rebanhos de búfalos asiáticos selvagens, existentes nas várzeas costeiras do norte do país. Nos anos 60, a prevalência de tuberculose nestes animais era de 16,4% e foram considerados como reservatórios para os bovinos. De 1984 a 1989 cerca de 300.000 búfalos foram sacrificados como parte do programa de controle da tuberculose em bovinos (DE LA RUA-DOMENECH, 2006).

Em 31 de dezembro de 1997, a Austrália foi reconhecida como Livre de Tuberculose, segundo os critérios da OIE. Desde 1998, as atividades de vigilância e erradicação se baseiam pelo *Tuberculosis Freedom Assurance Program*. Atualmente o programa concentra-se na vigilância em estabelecimentos de abate, sustentado pelo uso do Sistema Nacional de Informação em Saúde Animal, que propicia a identificação e rastreamento de animais infectados (ANIMAL HEALTH AUSTRÁLIA, 2012).

A Nova Zelândia iniciou em 1945 um programa voluntário de testes e abate de animais reagentes. Em 1961, o programa se tornou compulsório para rebanhos leiteiros e em 1968 foi estendido para os rebanhos de corte (DE LA RUA-DOMENECH, 2006).

O programa de erradicação da tuberculose bovina da Nova Zelândia se baseia em três pontos: controle da doença com o objetivo de conter sua difusão entre rebanhos bovinos e de cervos; controle da movimentação em nível de rebanhos e entre áreas e o controle de animais silvestres. O programa conta com o apoio de toda a cadeia produtiva de leite e corte e dos criadores de cervos (ANIMAL HEALTH BOARD - AHB, 2012).

Os rebanhos de bovinos e de cervos são classificados como “Infectados” ou como “Limpos”. O teste da prega caudal é usado como triagem dos rebanhos. Os testes dos são feitos anualmente nas áreas denominadas de Áreas de Controle da Movimentação, onde a prevalência de rebanhos infectados não pode exceder a 1% e realizados de três em três anos nas Áreas Limpas. Para a movimentação na área de controle, todos os animais acima de

três meses de idade são submetidos ao teste da prega caudal, no máximo 60 dias antes do transporte dos animais. Como prova de triagem para bovinos, é utilizado o teste da prega caudal e para cervos, o cervical simples. Como testes auxiliares em série, é indicado para bovinos o teste do IFN- γ , para cervos o ELISA-IgG1 e o cervical comparado. Como teste em paralelo para bovinos é recomendado o teste do IFN- γ e para cervos, o ELISA Ig G1 (TWEDDLE; LIVINGSTONE, 1994; DE LA RUA-DOMENECH, 2006). O grande desafio do programa da Nova Zelândia é o controle dos reservatórios silvestres, constituídos principalmente pelo marsupial herbívoro (*Trichosurus vulpecula*) e pelo furão (*Mustela putorius*). Estes vetores são os principais responsáveis pela transmissão para bovinos e cervos (ANIMAL HEALTH BOARD - AHB, 2012). Em 1989 tornou-se obrigatório o controle da tuberculose em rebanhos comerciais de cervos, adotando o mesmo esquema aplicado para o controle em bovinos (CARTER, 1991).

Nos EUA, os relatórios oficiais citam a tuberculose bovina como problema de saúde pública e como causa de prejuízos para a pecuária no século XIX. Em 1917, a prevalência nacional de rebanhos reagentes era de 5% e para minimizar seu impacto econômico e na saúde pública, o governo implantou o programa federal de erradicação da tuberculose (UNITED STATES, 2007).

Em 1940, a prevalência da tuberculose foi estimada em 0,5% e em 1969, caiu para 0,06%. Esta redução levou as autoridades sanitárias a enfatizar a vigilância em abatedouros para os bovinos e bisões. No caso de confirmação de *Mycobacterium bovis* nos granulomas, é feito rastreamento do rebanho de origem, com realização de testes de tuberculinização em todos os animais da propriedade. Rebanhos infectados podem ser sumariamente abatidos ou quarentenados até obter três testes negativos, com intervalo de 60 dias entre os dois primeiros e 180 dias para o último. Rebanhos com animais reagentes às provas de tuberculinização, mas sem lesões na carcaça ou isolamento negativo de *Mycobacterium bovis* dos granulomas, são liberados da quarentena após um teste negativo de todo rebanho, realizado 60 dias depois do abate dos animais reagentes (DE LA RUA-DOMENECH, 2006).

Os testes rotineiros recomendados pelo programa para uso em bovinos e bisões são o teste da prega caudal, o cervical simples e o comparado, cervical simples de dose dupla e o teste do IFN- γ . A escolha das provas depende da espécie animal e da situação epidemiológica da doença no rebanho. Os testes são realizados por Médicos Veterinários

federais, estaduais ou credenciados, podendo as provas de triagem ser feitas por técnicos federais ou estaduais sob supervisão de um médico veterinário (UNITED STATES, 2005; DE LA RUA-DOMENECH, 2006).

Entre 2000 e 2005, o programa foi revisado com o objetivo de avaliar a melhor estratégia a ser adotada para a erradicação, usando-se para isso, estudo de benefício/custo de cada estratégia. Com os resultados obtidos, foi implantado em 2006 um plano estratégico chamado de “*Veterinary Services Progressive Bovine Tuberculosis Eradication Strategic Plan*” no qual, estados, zonas ou regiões foram classificados em cinco categorias com base na prevalência da doença em rebanhos de bovinos e de bisões (Tabela 2). Para as regiões evoluírem de categoria, devem obedecer aos padrões mínimos definidos pelo programa (UNITED STATES, 2007).

Tabela 2 - Categorias de classificação sanitária, de acordo com as prevalências da tuberculose bovina nos Estados Unidos, 2006.

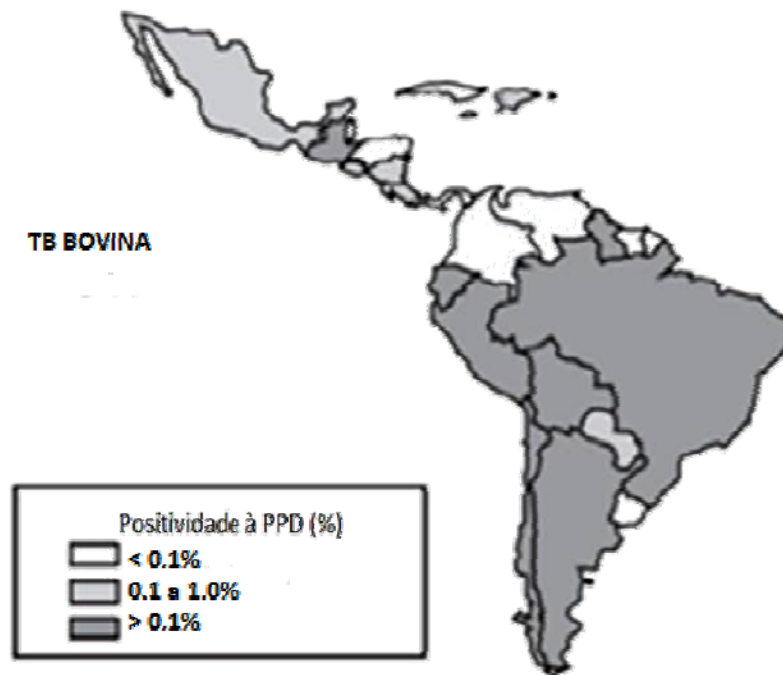
Categoria	Prevalência da Tuberculose Bovina	Estados/Zonas
Credenciada Livre	Zero em bovinos e em bisão	49 estados, península superior do Michigan, maior parte do Novo México, Porto Rico e Ilhas Virgens americanas.
Credenciada Modificada Avançada	Menor que 0,01% do total de rebanhos de bovinos e bisões	Minnesota, parte da Península Inferior do Michigan e parte dos dois municípios orientais do Novo México.
Credenciada Modificada (Regionalizada)	Menos que 0,1% do total de rebanhos de bovinos e bisões	11 municípios do norte do Michigan menor e partes dos dois outros municípios.
Preparada para Certificação	Menos que 0,5% do total de rebanhos de bovinos e bisões	-
Não Certificada	Desconhecida ou $\geq 0,5\%$ do total de rebanhos de bovinos e bisões	-

Fonte: Adaptada do Relatório de Saúde Animal 2006 (UNITED STATES, 2007).

Em 2006, a maior parte dos estados americanos era considerada livre de tuberculose, com taxa de rebanhos reagentes, menor que 0,02%. Em quatro regiões do país como o Novo México, sul do Texas ao longo da fronteira com o México, nordeste do Michigan e o noroeste de Minnesota, a doença ocorre eventualmente pela infecção residual, geralmente influenciada pela presença de animais silvestres. Segundo a OIE (2011) a doença está limitada a algumas zonas, é de notificação obrigatória e alvo de vigilância em animais domésticos e silvestres.

Com relação aos programas de controle e de erradicação da tuberculose bovina na América Latina, vários países implementaram programas apesar do conhecimento limitado da prevalência da doença em bovinos (Figura 3).

Figura 3 - Prevalência de positividade às provas de tuberculinização intradérmica em bovinos, em países da América Latina.



Fonte: Adaptado de López Marin et al. (2006).

Em algumas ilhas do Caribe, Panamá, Honduras, Belize, Colômbia, Venezuela, Suriname e Uruguai a prevalência foi considerada baixa ou nula. Prevalência intermediária foi observada no México, República Dominicana, Nicarágua, Costa Rica, El Salvador e Paraguai. Países como o Brasil, Argentina, Haiti, Guatemala, Bolívia, Chile, Equador, Guiana e Peru têm prevalência considerada elevada (LÓPEZ MARÍN *et al.*, 2006).

Dos 374 milhões de bovinos da América Latina e do Caribe, aproximadamente 70% se encontram em áreas onde a infecção por *Mycobacterium bovis* é superior a 1%. Os 30% restantes, estão em países com prevalência inferior a 1% ou mesmo nula (DE KANTOR; RITACCO, 2006).

Em vários países da América Latina o número de notificação da tuberculose bovina é precário e para incrementar o número de tuberculinizações e notificações, López Marín *et al.* (2006) recomendaram facilitar o acesso a métodos de diagnósticos simples e de baixo custo. De Kantor *et al.* (2008) recomendaram o desenvolvimento de projetos voltados para a tipificação molecular sistemática do *Mycobacterium bovis* isolado dos animais, rastreamento epidemiológico dos casos humanos de tuberculose zoonótica com análise molecular das cepas de *Mycobacterium bovis*, desenvolvimento de uma prova de triagem para leite de tanque, padronização das provas de amplificação de DNA com avaliação de seu uso em condições de campo, e desenvolvimento de *software* para o rastreamento dos animais e vigilância epidemiológica.

Na América Latina, o Uruguai foi um dos primeiros países a implantar medidas de controle para tuberculose bovina. Em 1918, a legislação tornou obrigatória a tuberculinização dos bovinos leiteiros de todo país. Em 1942, foi iniciado um programa de erradicação na bacia leiteira de Montevideu e Canelones que durou 10 anos. Por falta de recursos, o programa foi interrompido registrando prevalência de 6,23% em bovinos (ERRICO *et al.*, 1980).

Em 1963, foi implantado o “Plano de Qualidade do Leite” na região de Montevideu que priorizou o pagamento diferenciado pelo leite oriundo de propriedades livres de tuberculose. A certificação era voluntária, e os testes de tuberculinização realizados por médico veterinário. A partir de 1976, o plano de qualidade do leite foi estendido a todo o país e em 1983, a indústria e os produtores artesanais de lácteos se integraram ao controle sistemático da doença. Na década de 80, a prevalência de reações positivas em animais já era em torno de 0,001 a 0,1%, tendo iniciado as primeiras certificações de propriedade livre de brucelose e tuberculose (GARÍN, 2011; URUGUAY, 2001).

Desde 1997, o pagamento diferenciado pelo leite foi categorizado conforme critérios higiênicos sanitários dentre os quais está a certificação obrigatória como propriedade livre de tuberculose, para todos os estabelecimentos comerciais. Para a certificação é exigido o exame de todos os animais acima de um ano e a obtenção de dois

resultados negativos consecutivos, num prazo mínimo de seis e no máximo de doze meses, seguido do abate dos reagentes. Os testes indicados pelo programa são: da prega caudal, cervical simples e cervical comparado. Para a comercialização interna de bovinos leiteiros e reprodutores, é exigido atestado negativo com validade de 120 dias. O objetivo principal do programa atualmente é erradicar a doença por meio de certificação de propriedades livres de tuberculose bovina (URUGUAY, 2001).

A obrigatoriedade da certificação está restrita ao gado leiteiro. Para rebanhos de corte, a vigilância é feita somente ao abate, devido à baixa frequência histórica de lesões de tuberculose nestes animais; que pode ser explicada pela baixa probabilidade de contágio nas condições extensivas da produção pecuária de corte do Uruguai (FERNÁNDEZ, 1976).

Atualmente, o Serviço de Inspeção Veterinária Oficial, por meio de dados de inspeção em todas as vacas e novilhos abatidos, estima que a prevalência de tuberculose em rebanhos leiteiros é menor que 1% e menor ainda, em rebanhos de corte (GARÍN, 2011).

Na Argentina, os dados sobre a prevalência de focos e de animais são pontuais ou regionalizados. Estudos realizados em 81 rebanhos leiteiros na região central do país, entre 1983 e 1984, relataram prevalência de focos de 22,2% e de animais reagentes de 2,99%. Em 1992, foi realizado novo estudo com 40 rebanhos leiteiros detectando prevalência de 87,5% de focos e 9,57% de casos. O aumento das prevalências foi explicado pela introdução de reprodutores infectados de outras regiões. Estudo feito em 1990/1991 na bacia leiteira da província de Jujuy detectou 37% de rebanhos e 4% dos bovinos infectados. Atualmente, com base em dados da inspeção, estima-se uma prevalência em animais de 0,9% (TORRES 2011).

Em 1984, a extinta “Secretaria de Estado de Agricultura y Ganaderia” estabeleceu com a Resolução de N° 406 de 14 de agosto de 1984, normas para diagnóstico e controle da tuberculose animal. Em 1993, a Resolução de N° 1287 de 16 de novembro de 1993, criou oficialmente o programa de controle e erradicação da tuberculose bovina na Argentina. Somente em 1999, por meio da Resolução de N° 115/99 da “Secretaria de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación”, foi implantado o Programa tendo como objetivo principal, a erradicação da tuberculose nas propriedades leiteiras, contando com a participação efetiva da indústria de lácteos. A partir de 2002, a vigilância epidemiológica em

abatedouros e frigoríficos, feita pelo serviço de inspeção veterinária, foi estendida para todo o país (TORRES, 2011).

As estratégias do programa são aplicadas regionalmente de acordo com a identificação de ecossistemas e zonas de risco dentro do país, a distribuição geográfica das formas de produção pecuária; leite, reprodução e engorda; e a prevalência da doença da região (TORRES, 2011).

O programa se baseia no teste e sacrifício de animais reagentes, não sendo aceito o reteste dos animais positivos. Os testes utilizados são o da prega caudal e o cervical simples em bovinos acima de três meses de idade, realizadas por médicos veterinários acreditados pelo “Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria” (ARGENTINA, 2012). O Programa estabelece como meta, estender a certificação de propriedades livres para as propriedades de bovinos de corte, implantada inicialmente para propriedades leiteiras. Para a região da Terra do Fogo, Antártida e Ilhas do Atlântico Sul, foi implantada um programa de certificação como zona livre de tuberculose (TORRES, 2011).

O Chile declarou em 1925, que a tuberculose em todas as espécies animais, era passível de medidas sanitárias, mas somente em 2011, foi estabelecido o controle obrigatório e que as medidas sanitárias para o controle e erradicação da tuberculose bovina no país deverão ser aplicadas gradualmente, levando-se em consideração a distribuição geográfica da enfermidade. Observa-se na Figura 2 que o país foi dividido em duas zonas: I ou zona de erradicação, localizada ao sul do país e; II considerada zona de controle, ao norte do Chile. Por sua vez, cada uma das zonas foi subdividida em áreas endêmica e esporádica (CHILE, 2011).

A prevalência na área de ocorrência esporádica da zona II é de 16,5% de focos e de 3,8% de casos e na área endêmica de 56,3% de focos e 23,6% de casos. A prevalência na área de ocorrência esporádica da zona I é de 0,46% de focos e 0,001% de casos, e na área endêmica é de 0,30% de focos e de 0,67% de casos. O programa iniciou dando ênfase as propriedades leiteiras da zona I, contando com ativa participação da indústria de lácteos (NOACK, 2010).

Figura 4 - Mapa do Chile com regiões administrativas e Zonas do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Tuberculose Bovina



Fonte: Adaptado de Prochile (2012)

As metas do programa para os próximos 17 anos são: Erradicar a tuberculose na Zona I e diminuir a prevalência da enfermidade em propriedades para menos de 1,3% na Zona II. Para atingir estas metas a estratégia a ser empregada é de detecção de propriedades infectadas, quarentena e início de saneamento dos rebanhos, certificação de propriedades livres, abate dos animais reagentes em abatedouro com inspeção e controle da movimentação dos animais, especialmente entre as zonas (NOAK, 2010).

Os testes de diagnóstico de rotina são o da prega da cauda, cervical simples, cervical comparado e a vigilância em frigorífico com envio de amostras para confirmação laboratorial. Em rebanhos sem infecção, a certificação como propriedade livre é obtida com dois exames negativos consecutivos pelo teste caudal, de todos os bovinos acima de 18 meses de idade, com intervalo entre as provas de 180 a 240 dias. Em propriedades com antecedentes de infecção, são exigidos três testes negativos consecutivos com intervalo de 180 a 240 dias entre eles (CHILE, 2010).

Com relação a legislação no Brasil, as primeiras medidas de controle da tuberculose animal foram implantadas pelo Decreto Nº 24.548 de 3 de julho de 1934, que entre outras medidas, incluiu a tuberculose bovina como sendo de interesse da saúde animal e pública, obrigando o sacrifício de animais acometidos pela doença (BRASIL, 1934).

Em 1986, a Instrução de Serviço SETAD Nº 005/86 tornou obrigatório para o trânsito de animais puros e cruzados leiteiros e bubalinos, o teste negativo de tuberculinização intradérmica. Para participação em eventos agropecuários, era exigido teste negativo dos animais de reprodução com idade superior a 12 meses, com validade de no máximo 60 dias (BRASIL, 1986).

No Brasil, até o ano de 2000, não existiam estudos amostrais abrangentes sobre a prevalência da tuberculose bovina. Entre 1989 e 1998 os dados oficiais de notificação, indicavam uma prevalência média nacional de 1,3% de animais infectados (BRASIL, 2006). Em 1999, foi feito um estudo amostral dirigido às regiões relevantes na produção leiteira com grande quantidade de pequenas e médias propriedades no estado de Minas Gerais. Foram testados, 1.586 rebanhos e 22.990 animais acima de 24 meses de idade, encontrando prevalência de 5% em propriedades e 0,81% em animais (BELCHIOR, 2000).

A inexistência de ações padronizadas e de princípios metodológicos com abordagem populacional, levaram o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil – MAPA a instituir o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal – PNCEBT em 20 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001). Com a implantação do PNCEBT, fundamentado pelo controle estratégico de bloqueio dos pontos críticos de transmissão da doença como identificação das fontes de contaminação e dos fatores de risco, exigiu que os estados fizessem estudos amostrais para conhecer a prevalência em propriedades e em animais e identificar os fatores de risco associados à presença da tuberculose bovina.

O PNCEBT adota como estratégia, medidas compulsórias e voluntárias. As medidas obrigatórias, consistem da exigência de teste negativo aos testes de tuberculinização intradérmica para o trânsito de reprodutores e sua participação em eventos agropecuários e, do abate sanitário ou destruição dos animais reagentes. As medidas voluntárias, se restringem a certificação de propriedades livres e monitoradas para tuberculose bovina (BRASIL 2006).

O programa, para garantir a qualidade técnica das ações propostas, implantou e normatizou a habilitação de médicos veterinários da iniciativa privada para fazer os diagnósticos, padronizou os métodos de diagnóstico oficiais; teste da prega caudal, cervical simples e cervical comparado; implantou o controle oficial da produção e da

distribuição dos antígenos, previu ações fiscalizatórias e monitoramento dos processos de certificação por parte dos serviços oficiais de saúde animal e, propiciou sua integração com os serviços de inspeção (BRASIL, 2006).

A certificação de propriedades livres de tuberculose segue os princípios técnicos estabelecidos pela OIE e é dirigida especialmente às propriedades de produção leiteira. O saneamento é iniciado com testes de todos os animais seguido do sacrifício ou da destruição dos reagentes positivos, até obter um resultado negativo de todo o rebanho. Com três testes negativos consecutivos de todo o rebanho, num intervalo de 90 a 120 dias entre os primeiros dois testes e de 180 a 240 dias entre o segundo e o terceiro teste, a propriedade é certificada como livre (BRASIL, 2006).

A certificação de propriedades monitoradas é exclusiva para propriedades com criação de gado de corte. O processo de certificação inicia com um teste amostral dos animais adultos acima de 24 meses de idade, seguindo parâmetros de amostragem definidos pelo PNCEBT com 99% de IC e, prevalência mínima esperada intrarrebanho de 1%. Se for detectado pelo menos um animal positivo, todas as fêmeas acima de 24 meses e reprodutores devem ser testados e os reagentes positivos, sacrificados ou destruídos. A certificação é fornecida à propriedade, no caso de teste negativo de todos os animais amostrados ou, após teste negativo de todos os animais reprodutores do rebanho. Em ambos os casos, o certificado tem validade por 12 meses (BRASIL, 2006).

Atualmente o programa conta com pouco mais de 10 anos e tem como metas; avaliação de novas técnicas de diagnóstico, expansão dos estudos epidemiológicos para todas as unidades da federação e busca de parcerias com as indústrias de setor para facilitar o abate sanitário de animais reagentes e vigilância ao abate.

REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO, R. M. C. M.. Tuberculose humana causada pelo *Mycobacterium bovis*: considerações gerais e a importância dos reservatórios animais. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 4, n. 1, p. 5-15, 1998.
- ALEXANDER, K. A.; LAVER, P. N.; MICHEL, A. L.; WILLIAMS, M; VAN HELDEN, P. D, WARREN, R. M.; van PITTIUS, G. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 16, n.8, p. 1296-1299, Aug. 2010. Disponível em: <<http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/16/8/10-0314.htm>>. Acesso em: 29 maio 2012.
- AMENI, G.; ASEFFA, A.; ENGERS, H.; YOUNG, D.; GORDON, S.; HEWINSON, G.; VORDEMEIER, M. High prevalence and increased severity of pathology of bovine tuberculosis in Holsteins compared to zebu breeds under field cattle husbandry in central Ethiopia. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 14, n. 10, p. 1356–1361, Oct. 2007.
- ANIMAL HEALTH AUSTRÁLIA (AHA). **Australian bovine**: tuberculosis surveillance project. Disponível em: <<http://www.animalhealthaustralia.com.au/programs/diseasesurveillance/australian-bovine-tuberculosis-surveillance-project>>. Acesso em: 29 maio 2012.
- ANIMAL HEALTH BOARD (AHB). **Annual report**: 2010-2011. Wellington, 2012a. Disponível em: <http://www.ahb.org.nz/Portals/0/AHB%20Annual%20Report_web.pdf>. Acesso em: 29 maio 2012.
- _____. **New Zealand's bovine tb control programme**. New Zealand, 2012b. Disponível em: <<http://www.ahb.org.nz/TB-control-programme>>. Acesso em: 29 maio 2012.
- ARAÚJO, C. P.; LEITE, C. Q. F.; DE PRINCE, K. A.; JORGE, C. S. G.; OSÓRIO, A. L. A. R. *Mycobacterium bovis* identification by a molecular method from post-mortem inspected cattle obtained in abattoirs of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 7, p. 749-752, Nov. 2005.
- ARGENTINA. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). **Programa nacional de control y erradicación de la tuberculosis bovina**. Disponível em: <<http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=858&io=158992012>>. Acesso em: 20 fev. 2012.
- AUER, L. A. Assesment of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of cattle infected with *Mycobacterium bovis*. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, AU, v. 64, n. 6, p. 172-176, 1987.
- BARLOW, N. D.; KEAN, J. M.; CALDWELL, N. P.; RYAN, T. J. Modeling the regional dynamics and management of bovine tuberculosis in New Zealand cattle herds. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 36, p. 25-38, 1998.
- BARWINEK, F.; TAYLOR, N. M. **Assessment of the socio-economic importance of bovine tuberculosis in Turkey and possible strategies for control or eradication**. Ankara: Turkish-German Animal Health Information Projekt, 1996.

BELCHIOR, A. P. C. **Prevalência, distribuição regional e fatores de risco da tuberculose bovina em Minas Gerais**. 2000. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

BRASIL. Decreto n. 24.548, de 3 de julho de 1934. Aprova o regulamento do serviço de defesa sanitária animal. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/1930-1949/D24548.htm>. Acesso em: 20 abr. 2012.

_____. Portaria nº 64 de 18 de março de 1994. Aprova as Instruções sobre Normas para Produção e Controle de Tuberculina PPD. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 23 mar. 1994. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/produtos-veterinarios/legislacao>>. Acesso em: 2 abr. 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 2, de 10 de janeiro de 2001. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 11 jan. 2001.

_____. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT)**. Brasília, 2006.

_____. Seção de Controle do Trânsito e Animais e de Doenças Exóticas. **Manual de procedimentos: movimentação interestadual de animais e produtos**. 5. ed. Brasília, 1986.

BRASIL. Ministério da Saúde. Centro de Referência Prof. Helio Graga. **Manual de bacteriologia da tuberculose**. 3. ed. Rio de Janeiro, 2005.

_____. **Programa Nacional de Controle da Tuberculose**, 2011. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/2ap_padrao_tb_20_10_11.pdf>. Acesso em: 2 abr. 2012.

BROOKS-POLLOCK, E.; KEELING, M. Herd size and bovine tuberculosis persistence in cattle farms in Great Britain. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 92, p. 360-365, 2009.

CARTER, C. E. Tuberculosis control in the New Zealand deer industry. In: SYMPOSIUM ON TUBERCULOSIS, PALMERSTON NORTH, New Zealand, Apr 1991. **Proceeding...** New Zealand: Veterinary Continuing Education, 1991. p. 203-211.

CASSIDY, J. P.; BRYSON, D. G.; POLLOCK, J. M.; EVANS, R. T.; FORSTER, F.; NEILL, S. D. Early lesion formation in cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 119, p. 27-44, 1998.

CHILE. Ministerio de Agricultura. Servicio Agrícola y Ganadero- SAG. **Certificación oficial de predios libres y unidades colectivas libres de brucelosis y/o tuberculosis y/o leucosis bovina**: D-PP-VE-001. Santiago, Ene. 2010.

_____. Resolución 2762 de 21 de abril de 2011. Establece el control obligatorio y medidas sanitarias para el control y erradicación de la tuberculosis bovina en todo el territorio nacional. Disponível em: <[ww.sag.cl](http://www.sag.cl)>. Acesso em: 15 jan. 2012.

CLEAVELAND, S.; SHAW, D. J.; MFINANGA, S. G. SHIRIMA, G.; KAZWALA, R. R., EBLATE, E.; SHARP, M. *Mycobacterium bovis* in rural Tanzania: Risk factors for infection in human and cattle populations. **Tuberculosis**, Edinburgh, v. 87, p. 30-43, 2007.

COOK, A. J.; TUCHILI, L.; M.; BUVE, A.; FOSTER, S. D.; GODFREY-FAUSETT, P.; PANDEY, G. S.; MCADAM, K. P. Human and bovine tuberculosis in the monze district of zambia-a cross-sectional study. **British Veterinary Journal**, London, v. 152, n. 1, p. 37-46, 1996.

COSIVI, O.; GRANGE, J. M.; DABORN, C. J.; RAVIGLIONE, M. C.; FUJIKURA, T.; COUSINS, D.; ROBINSON, R. A.; HUCHZERMAYER, H. F.; DE KANTOR, I.; MESLIN, F. X. Zoonotic Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in Developing Countries **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 4, n. 1, p. 59-70, Jan./Marc. 1998.

COUSINS, D. V.; FLORISSON, N. A review of tests available for use in the diagnosis of tuberculosis in non-bovine species. **Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties**, Cambridge, v. 24, n. 3, p. 1039–1059, 2005.

COUSINS, D. V.; ROBERTS, J. L. Australia's campaign to eradicate bovine tuberculosis: the battle for freedom and beyond. **Tuberculosis**, Edinburgh, v. 81, n. 1/2, p. 5-15, 2001.

COUSINS, D.; CORNER, L. A.; TOLSON, J. W.; JONES, S. L.; WOOD, P. R. **Eradication of bovine tuberculosis from Australia**: key management and technical aspects. Parkville, Vic.: CSL, 1998.

DE JONG, M. C. M. Mathematical modeling in veterinary epidemiology: why model building is important. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 25, p. 183–193, 1995.

DE KANTOR, I. N.; PAOLICCHI, F.; BERNARDELLI, A.; TORRES, P. M.; CANAL, A.; LOBO, J. R.; ZOLLIN DE ALMEIDA, M. A.; PAREDES NOACK, L. A.; LÓPEZ, J. F.; GARÍN, A.; LÓPEZ INSAURRALDE, A.; BOSCHIROLI-CARA, M. L.; CATALDI, A.; AMBROGGI, M. La tuberculosis bovina en America Latina: situación actual y recomendaciones. CONGRESO LATINO AMERICANO DE ZOONOSIS, 3., 2008, Buenos Aires. **Proceeding...** Buenos Aires, 2008.

DE KANTOR, I. N.; RITACCO, V. An update on bovine tuberculosis programmes in Latin American and Caribbean countries. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 112, n. 2/4, p. 111-118, Febr. 2006.

_____. Bovine tuberculosis in Latin America and the Caribbean: current status, control and eradication programs. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 40, p. 5-14, 1994.

DE LA RUA-DOMENECH, R. Bovine tuberculosis in the European Union and other countries: current status, control programmes and constraints to eradication. **GVC Government Veterinary Journal**, London, v. 16, n. 1, p. 19-45, 2006. Special Edition

DE LA RUA-DOMENECH, R.; GOODCHILD, A. T.; VORDERMEIER, H. M.; HEWINSON, R.G.; CHRISTIANSEN, K. H.; CLIFTON-HADLEY, R. S. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, c-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. **Research in Veterinary Science**, London, v. 81, p. 190 -210, 2006.

DE LISLE, G. W.; MACKINTOSH, C. G.; BENGIS, R. G. *Mycobacterium bovis* in free-living and captive wildlife, including farmed deer. **Review of Science and Technology off International Epiz**, New York, v. 20, n. 1, p. 86-111, 2001.

DROBNIIEWSKI, F.; STRUTT, M.; SMITH, G.; MAGEE, J.; FLANAGAN, P. Audit of scope and culture techniques applied to samples for the diagnosis of *Mycobacterium bovis* by hospital laboratories in England and Wales. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 130, p. 235–237, 2003.

DVORSKA, L.; MATLOVA, L.; BARTOS, M.; PARMOVA, I.; BARTL, J.; SVASTOVA, P.; BULL, T.J.; PAVLIK, I. Study of *Mycobacterium avium* complex strains isolated from cattle in the Czech Republic between 1996 and 2000. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 99, p. 239-250, 2004.

ERRICO, F.; BARRIOLA, J.; LABORDE, M.; BOLLA, L. Tuberculosis bovina: situación actual en el Uruguay. **Veterinaria**, Montevideo, v. 73, p. 83-87, 1980.

EUR-LEX. Access to European Union Law. **Council Directive 64/432/EEC of 26 June 1964 on animal health problems affecting intra-Community trade in bovine animals and swine**. Disponível em: http://eur-lex.europa.eu/smartapi/cgi/sga_doc?smartapi!celexapi!prod!CELEXnumdoc&lg=EN&numdoc=31964L0432&model=guichett. Acesso em: 21 abr. 2012a

_____. **Decisão da comissão de 9 de março de 1979**. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/Notice.do?mode=dbl&lang=pt&ihmlang=pt&lng1=pt,en&lng2=da,de,el,en,es,f, it,nl,pt,&val=72281:cs&page=>>>. Acesso em: 21 abr. 2012b

_____. Regulamento (CE) N.º 1226/2002 Da Comissão de 8 de Julho de 2002. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**, Bruxelas, 9 jul. 2002. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:179:0013:0018:PT:PDF>>. Acesso em: 21 abr. 2012c

FENG, J.; LI, Y.; HASHAD, M.; SCHURR, E.; GROS, P.; ADAMS, L. G.; TEMPLETON, J.W. Bovine Natural Resistance Associated Macrophage Protein 1 (Nramp1) Gene. **Genome Research**, New York, v. 10, p. 956-964, Oct. 1996.

FERNÁNDEZ, F. **Tuberculosis bovina**: una enfermedad para no olvidar. Montevideo: Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP), 1976.

FERREIRA-NETO, J. S.; BERNARDI, F. O controle da tuberculose bovina. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.11, n. 47, p. 9-13, 1997.

GARÍN, A. Programa de control y erradicación de la tuberculosis bovina en el Uruguay. In: S SIMPOSIO Y FORO INTERNACIONAL SOBRE TUBERCULOSIS BOVINA, Ciudad de México, jul. 2011. **Anales...** Ciudad de México: CONASA, 2011.

GONÇALVES, V. S. P.; BELCHIOR, A. P. C.; RODRIGUES NETO, A.; LEITE, R. C. A exploratory survey of bovine tuberculosis in the State of Minas Gerais, Brazil. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON VETERINARY EPIDEMIOLOGY AND ECONOMICS, 10., Vina del Mar, Chile,

2003. **Proceedings** ... Vina del Mar, Chile, 2003. Disponível em: <www.sciquest.org.nz>. Acesso em: 23 mar. 2012.

GONZÁLEZ LLAMAZARES, O. R.; GUTIÉRREZ MARTÍN, C. B.; NISTAL, D. A.; REDONDO, V. A. D. P.; DOMÍNGUEZ RODRÍGUEZ, L.; RODRÍGUEZ FERRI, E. F. Field evaluation of the single intradermal cervical tuberculin test and the interferon-gamma assay for detection and eradication of bovine tuberculosis in Spain. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 70, p. 55-56, 1999.

GRIFFIN, J. M.; HAHSEY, T.; LYNCH, K.; SALMAN, M. D.; MCCARTHY, J.; HURLEY, T. The association of cattle husbandry practices, environmental factors and farmers characteristics with the occurrence of chronic bovine tuberculosis in dairy herds in the Republic of Ireland. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 17, p. 145-60, 1993.

GRIFFIN, J. M.; MARTIN, S. W.; THORBURN, M. A.; EVES, J. A.; HAMMOND, R. F. A case-control study on the association of selected risk factors with the occurrence of bovine tuberculosis in the Republic of Ireland. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 27, n. 3/4, p. 217-229, Jul. 1996.

GRIFFIN, J. M.; WILLIAMS, D. H.; KELLY, G. E.; CLEGG, T. A.; O'BOYLE, I.; COLLINS, J. D.; MORE, S. J. The impact of badger removal on the control of tuberculosis in cattle herds in Ireland. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 67, n. 4, p. 237-266, 2005.

HARBOE, M.; NAGAI, S.; WIKER, H. G.; SLETTEN, K.; HAGA, S. Homology between the MPB70 and MPB 83 proteins of *Mycobacterium bovis* BCG. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oxford, v. 42, n. 1, p. 46-51, 1995.

HARBOE, M.; WIKER, H. G.; DUNCAN, J. R.; GARCIA, M. M.; DUKES, T. W.; BROOKS, B. W.; TURCOTE, C.; NAGAI, S. Protein G-based enzyme-linked immunosorbent assay for anti-MPB70 antibodies in bovine tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 28, n. 5, p. 913-921, 1990.

HARDIE, R. M.; WATSON, J. M. *Mycobacterium bovis* in England and Wales: past, present and future. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 109, p. 23-33, 1992.

HUMBLET, M. F.; BOSCHIROLI, M. L.; SAEGERMAN, C. Classification of worldwide bovine tuberculosis risk factors in cattle: a stratified approach. **Veterinary Research**, Les Ulis, FR, v. 40, n. 5, p.50, Jun. 2009.

INANGOLET, F. O; DEMELASH, B.; OLOYA, J.; OPUDA-ASIBO, J.; SKJERVE, E. A cross-sectional study of bovine tuberculosis in the transhumant and agro-pastoral cattle herds in the border areas of Katakwi and Moroto districts, Uganda. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 40, p. 501-508, 2008.

JAVED, M. T.; SHAHID, A. L.; FAROOQI, F. A.; AKHTAR, M.; CARDENAS, G. A.; WASIQ, M.; CAGIOLA, M. Risk factors associated with the presence of positive reactions in the SCCIT test in water buffalo around two cities in Punjab, Pakistan. **Acta Tropical**, Basel, v. 115, n. 3, p. 242-247, 2010.

JOHNSTON, W. T.; VIAL, F.; GETTINBY, G.; BOURNE, F.J. ; CLIFTON-HADLEY, R. S.; COX, D. R.; CREA, P.; DONNELLY, C. A.; MCINERNEY, J. P.; MITCHELL, A. P.; MORRISON, W. I.; WOODROFFE, R. Herd-level risk factors of bovine tuberculosis in England and Wales after the 2001 foot-and-mouth disease epidemic. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 15, p. 833-840, 2011.

JONES, S. L. ; COX, J. C.; SHEPHERD, J. M.; ROTHEL, J. S.; WOOD, P. R.; RADFORD, A. J. Removal of false-positive reactions from plasma in an enzyme immunoassay for bovine interferon- γ . **Journal of Immunology Methods**, Baltimore, v. 155, p. 233–240, 1992.

JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. **Patologia veterinária**. São Paulo: Manole, 2000.

KAMERBEEK, J.; SCHOOLS, L.; KOLK, A.; VAN AGTERVELD, M.; VAN SOOLINGEN, D.; KUIJPER, S.; BUNSCHOTEN, A.; MOLHUIZEN, H.; SHAW, R.; GOYAL, M.; VAN EMBDEN, J Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, p. 907-914, 1997.

KAZWALA, R. R.; KAMBARAG, E D. M.; DABORN, C. J.; NYANGE, J.; JIWA, S. F. H.; SHARP, J. M. Risk factors associated with the occurrence of bovine tuberculosis in cattle in the Southern Highlands of Tanzania, **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 25, p. 609-614, 2001.

LAGE, A. P.; LOBATO, F. C. F.; MOTA, P. M. P. C.; GONÇALVES, V. S. P. **Atualização em tuberculose bovina**. Belo Horizonte: FEP/MVZ, 1998.

LATINI, M. S.; LATINI, O. A.; LOPEZ, M. L.; CECCONI, J. O. Tuberculosis bovina en seres humanos. **Revista Argentina del Tórax**, Buenos Aires, v.51, p. 13-16, 1990.

LILENBAUM, W.; FONSECA, L. S. The use of ELISA as a complementary tool for the tuberculosis eradication program in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 43, p. 256-261, 2006.

LILENBAUM, W.; RIBEIRO, E. R.; SOUZA, G. N. Evaluation of an ELISA-PPD for the diagnosis of bovine tuberculosis in field trials in Brazil. **Research in Veterinary Science** London, v. 66, p. 191-195, 1999.

LIN, M.; SUGDEN, E A.; JOLLEY, M. E; STILWELL, K. Modification of the *Mycobacterium bovis* extracellular protein MPB70 with fluorescein for rapid detection of specific serum antibodies by fluorescence polarization. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 3, n. 4, p. 438-444, Jul. 1996.

LIVINGSTONE, P. G.; RYAN, T. J; HANCOX, N. G.; CREWS, K. B.; BOSSON, M. A. J.; KNOWLES, G. J. E., MCCOOK, W. Regionalisation: a strategy that will assist with bovine tuberculosis control and facilitate trade. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 112, p. 291-301, 2006.

LÔBO, J. R. **Análise custo-benefício da certificação de propriedades livres de tuberculose bovina**. 2008. Dissertação (Mestrado em Agronegócios) - Universidade de Brasília, Brasília.

LÓPEZ MARÍN, L. M.; OTERO, F. D.; MAZA, A. J. V.; SOLÍS, H. E.; PABELLO, J. A. G. Tuberculosis humana y bovina en Latinoamérica: De estudios sobre virulencia hacia herramientas para su control. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, Mexico, v. 48, n. 2, p. 173-178, 2006.

MANGIAPAN, G.; VOKURKA, M. ; SHOULS, L.; CADRANEL, J.; LECOSSIER D.;VAN EMBDEN J.; HANCE, A.J. Sequence capture-PCR improves detection of mycobacterial DNA in clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, p. 1209-1215, 1996.

MARASSI, C. D.; MEDEIROS, I. ; LILENBAUM, W. The use of a Gamma-Interferon assay to confirm a diagnosis of bovine tuberculosis in Brazil. **Acta Tropical**, Basel, v. 113, p. 199-201, 2010.

MAZUREK, G. H.; CAVE, M. D.; EISENACH, K. D.; WALLACE JR, R. J.; BATES, J. H.; CRAWFORD, J. T. Chromosomal DNA fingerprint patterns produced with IS6110 as strain-specific markers for epidemiologic study of tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 29, n. 9, p. 2030-2033, Sep. 1991.

MEADE, K. G.; GORMLEY, E.; DOYLE, M. B.; FITZSIMONS, T.; O'FARRELLY, C.; COSTELLO, E.; KEANE, J.; ZHAO, Y; Mac HUGH, D. E. Innate gene repression associated with *Mycobacterium bovis* infection in cattle: toward a gene signature of disease, **BMC. Genomics**, San Diego, v. 8, p. 400-415, 2007.

MENZIES, F. D.; NEIL, S. D. Cattle-to cattle transmission of bovine tuberculosis - review. **The Veterinary Journal**, London, v. 160, p. 92-106, 2000.

MIYATA, M.; SANTOS, A. C. B.; PAVAN, F. R.; SILVA, R. M. G.; VIANA, B. H. J.; LEITE, C. Q. F. Importância da técnica do PRA (PCR-Restriction Enzyme Pattern Analysis) na confirmação molecular dos isolados clínicos de pacientes atendidos no ambulatório da cidade de Araraquara com suspeita de tuberculose. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 54. Salvador, 2008. **Resumos...** Salvador, BA, 2008. Disponível em: <www.sbg.org.br>. Acesso em: 25 abr. 2012.

MONAGHAN, M. L.; DOHERTY, M. L.; COLLINS, J. D.; KAZDA, J. F. ; QUINN, P.J. The tuberculin test. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 40, p. 111-124, 1994.

MORRIS, C. A. A review of genetic resistance to disease in *Bos taurus* cattle. **The Veterinary Journal**, London, v. 174, p. 481-491, 2007.

MORRIS, R. S.; PFEIFFER, D. U. Directions and issues in bovine tuberculosis epidemiology and control in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, New Zealand, v. 43, n. 7, p. 256-265, 1995.

MORRIS, R. S.; PFEIFFER, D. U.; JACKSON, R. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 4, n. 1-2, p. 153-177, 1994.

MUNROE, F.; DOHOO, I.; MCNAB, W.; SPANGLER, L. Risk factors for the between-herd spread of *Mycobacterium bovis* in Canadian cattle and cervids between 1985 and 1994. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 41, p. 119-133, 1999.

NEILL, S. D.; HANNA J.; O'BRIEN J. J.; McCRACKEN, R. M. Excretion of *Mycobacterium bovis* by experimentally infected cattle. **Veterinary Record**, London, v. 123, p. 123, 340-3, 1988.

NEIL S. D.; POLLOCK, J. M.; BRYSON, D.B.; HANNA, J. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 40, p.41-52, 1994.

NGANDOLO, B. N. R.; MÜLLER, B.; DIGUIMBAYE-DJAÍBE, C.; SCHILLER, I.; MARG-HAUFE, B.; CAGIOLA, M.; JOLLEY, M., SURUJBALLI, O.; AKAKPO, A. J.; OESCH, B.; ZINSSTAG, J. Comparative assessment of fluorescence polarization and tuberculin skin testing for the diagnosis of bovine tuberculosis in Chadian cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 89, p. 81-89, 2009.

NIEMANN, S.; RICHTER, E.; RÜSCH-GERDES, S. Stability of *Mycobacterium tuberculosis* IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism Patterns and Spoligotypes Determined by Analyzing Serial Isolates from Patients with Drug-Resistant Tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 2, p. 409-412, 1999.

NISHI, J. S.; SHURY, T.; ELKIN B. T. Wildlife reservoirs for bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in Canada: strategies for management and research. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 112, p. 325-328, 2006.

NOAK, P. L. A. Proyecto de Control y Erradicación de Tuberculosis Bovina de Chile. In: SEMINARIO INTERNACIONAL DE TUBERCULOSIS BOVINA, Santiago, 14 – 15 Ene. 2010. In: **Anales...** Santiago: Gobierno de Chile, 2010.

O'REILLY, L. M.; DABORN C. J. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. **Tubercle and Lung Disease**, Edinburgh, v. 76, Suppl. 1, p. 1-46, 1995.

OKANO, W. **Post mortem, citologia, histopatologia e bacteriologia no diagnóstico da tuberculose bovina**: matadouro-frigorífico da Região Norte do Paraná. 2007. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu.

OLIVEIRA, V. M.; FONSECA, A. H.; PEREIRA; M. J. S.; CARNEIRO, A. V.; JESUS, V. L. T. ALVES, P. A. M. Análise retrospectiva dos fatores associados à distribuição da tuberculose bovina no estado do Rio de Janeiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 3. p. 574-579, 2008.

OLOYA, J.; MUMA, J. B.; OPUDA-ASIBO, J.; DJONNE, B.; KAZWALA, R.; SKJERVE, E. Risk factors for herd-level bovine-tuberculosis seropositivity in transhumant cattle in Uganda. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 80, p. 318-329, 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL (OIE). **Código sanitário para os animais terrestres**. Disponível em: <http://www.oie.int/index.php?id=169&L=0&htmfile=chapitre_1.11.6.htm>. Acesso em: 21 mar. 2012.

_____. **WAHID-Interface:** animal health situation. 2011. Disponível em: http://web.oie.int/wahis/public.php?page=country_status&year=2011. Acesso em: 21 mar. 2012.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). **Administración de programas de salud animal**. Brasilia, 1986.

OZYIGIT, M. O.; SENTURK, S.; AKKOC, A. Suspected congenital generalized tuberculosis in a newborn calf. **Veterinary Record**, London, v. 160, p. 307-308, 2007.

PAIXÃO, T. A.; FERREIRA, C.; BORGES, A. M.; OLIVEIRA, D. A. A.; LAGE, A. P.; SANTOS, R. S. Frequency of bovine Nramp1 (Slc11a1) alleles in Holstein and Zebu breeds. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 109, p. 37-42, 2006.

PARDO, R. B.; LANGONI, H.; MENDONÇA, L. J. P. Isolamento de *Mycobacterium spp.* do leite de vacas suspeitas e positivas para tuberculose. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 38, n. 6, p. 284-287, 2001.

PEREZ, A. M; WARD, M. P.; CHARMANDARIAN, A.; RITACCO, V. Simulation model of within-herd transmission of bovine tuberculosis in Argentine dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 54, p. 361-372, 2002.

PÉREZ-GUERRERO, L.; MILIÁN-SUAZO; ARRIAGA-DIAZ, C.; ROMERO-TORREZ, C.; ESCARTIN-CHÁVEZ, M. Epidemiología molecular de la tuberculosis bovina y humana en una zona endémica de Querétaro, México. **Salud Pública de México**, Mexico, v. 50, n. 4, p. 186-291, 2008.

PLACKETT, P.; RIPPER, J.; CORNER, L. A.; SMALL, K.; DE WITTE, K.; MELVILLE, L.; HIDES, S.; WOOD, P. R. An ELISA for the detection of anergic tuberculous cattle. **Australian. The Veterinary Journal**, London, v. 66, n. 1, p. 15-19, 1989.

POLLOCK, J. M.; NEILL, S. D. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. **Immunology**, Oxford, v. 163, p. 115-107, 2002.

POLLOCK, J. M.; POLLOCK, D. A.; CAMPBELL, D. G., GIRVIN, R. M.; CROCKARD, A. D.; NEIL, S.D.; MACKIE, D. P. Dynamics changes in circulating and antigen responsive T-cell subpopulation post-*Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Immunology**, Oxford, v. 87, p. 236-41, 1996.

PORPHYRE, T.; STEVENSON M. A.; MCKENZIE, J. Risk factors for bovine tuberculosis in New Zealand cattle farms and their relationship with possum control strategies. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 86, p. 93-106, 2008.

PRITCHARD, D. G. A century of bovine tuberculosis 1888 – 1988, conquest and controversy. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 99, p. 357-399, 1988.

PROCHILE. **Mapa do Chile:** Programa Nacional de Controle e Erradicação da Tuberculose Bovina. Disponível em: <http://www.prochile.cl/servicios/red_nacional/imagenes/mapa_chile_nuevo.png>. Acesso em: 24 maio 2012.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. **Clinical veterinary microbiology**. Edinburgh: Mosby, 2004.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. Doenças causadas por bactérias – IV, 19. In: _____. **Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2000. p. 817-824.

REILLY, L. A.; COURTENAY, O. Husbandry practices, badger sett density and habitat composition as risk factors for transient and persistent bovine tuberculosis on UK cattle farms. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 80, p. 129–142, 2007.

RETAMAL, P. M.; MARTÍNEZ, A. M. T.; ABALOS, P. P. Secuencias de inserción IS6110 e IS1081 en cepas de *Mycobacterium bovis* provenientes de bovinos beneficiados en la Región Metropolitana. **Revista Chilena de Infectología**, Santiago, v. 2, n. 3, p. 166-170, 2003.

REVIRIEGO GORDEJO, F. J.; VERMEERSCH, J. P. Towards eradication of bovine tuberculosis in the European Union. **The Veterinary Microbiology**. Amsterdam, v. 112, p. 101–109, 2006.

RIBEIRO, D. C. **Comparação de protocolos de extração de DNA para detecção de *mycobacterium bovis* através da PCR em homogeneizados de órgãos bovinos**. 2006. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

RITACCO, V.; DE KANTOR, I. N. Zoonotic tuberculosis in Latin America. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 30, n. 12, p. 3299-3300, Dec. 1992.

RITACCO, V.; KANTOR, I. N.; BARRERA, L.; NADER, A.; BERNARDELLI, A.; TORREA, G.; ERRICO, F.; FLIESS, E. Assessment of the sensitivity and specificity of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of mycobacterial antibodies in bovine tuberculosis. **Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B**, Malden, v. 34, n. 2, p. 119-125, 1987.

RITACCO, V.; LOPEZ, B.; BARRERA, L.; TORREA, G.; NADER, A.; KANTOR, I. N.; FLIESS, E. Evaluation of four antigens for the detection of anti-*Mycobacterium bovis* antibodies by enzyme immunoassay. **Revista Argentina de Microbiologia**, Buenos Aires, v. 20, n. 2, p. 97-101, 1988.

RODRIGUEZ, C. A. R.; ZUMÁRRAGA, M. J.; OLIVEIRA, E. M. D.; CATALDI, A. A.; ROMANO, M. I.; OTTO, H. H.; BONAFÉ, V. L. ; FERREIRA NETO, J. S. Caracterização molecular de isolados de *Mycobacterium bovis* do estado de São Paulo Brasil, utilizando a técnica de spoligotyping. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, n. 3, p. 277-282, jul./set. 2004.

RODRIGUEZ, J. G.; MEJIA, G. A.; DEL PROTILO, P.; PATARROYO, M. E.; MURILLO, L. A. Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. **Microbiology**, New York, v. 141, p. 2131-2138, 1995.

RODWEL, T. C.; MOORE, M.; MOSER, K. S.; BRONDINE, S. K.; STRATHDEE, S. A. Tuberculosis from *Mycobacterium bovis* in Binational Communities, United States. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 14, n. 6, Jun. 2008.

RODWELL, T. C.; KREIK, N. P.; BENGIS, R. G.; WHYTE, I. J.; VILJOEN, P. C.; DE VOS, V.; BOYCE, W. M. Prevalence of bovine tuberculosis in African buffalo at Kruger National Park. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, Iowa, v. 37, n. 2, p. 258-264, 2001.

ROXO, E. Tuberculose bovina: revisão. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 63, n. 2, p. 91-97, 1996.

RUGGIERO, A. P.; IKUNO, A. A.; FERREIRA, V. C. A.; ROXO, E. Tuberculose bovina: alternativas para o diagnóstico. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, n. 1, p. 55-65, jan./mar. 2007.

SAKAMOTO, S.; HEINEMANN, M. B.; TELLES, M. A. S.; ROXO, E.; RICHTZENHAIN, L. J.; VASCONCELLOS, S. A.; FERREIRA NETO, J. S. Detecção e identificação de *Mycobacterium bovis* pela reação da cadeia da polimerase (PCR). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 66, n. 2, p. 45-58, 1999.

SALAZAR, F. H. P. **Ocorrência de tuberculose causada por *Mycobacterium bovis* em bovinos abatidos em frigoríficos no estado de Mato Grosso, Brasil**. 2005. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande.

SCACCHIA, M.; LELLI, R.; PETRINI, A.; PRENCIPE, V.; CALISTRI, P.; GIOVANNINI, A. Use of innovative methods in the eradication of bovine tuberculosis. **Journal of Veterinary Medicine**, Berlin, Series B 47, p. 321–327, 2000.

SEQUEIRA, M. D.; RITACCO, V.; De KANTOR, I. N. In: THOEN, O.; GILSDORF, M.J.; STEELE, J. (Ed.). ***Mycobacterium bovis* Infection in Animals and Humans**. Ames: Blackwell Publishing, 2005.

SOBRAL, L. F.; DUARTE, R. S.; VIEIRA, G. B. O.; DA SILVA, M. G.; BOECHAT, N.; FONSECA, L. S. Identificação de *Mycobacterium bovis* em cepas micobacterianas isoladas espécimes clínicos humanos em um complexo hospitalar na cidade do Rio de Janeiro. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 5, p. 664-668, 2011.

SUPPLY, P.; MAZARS, E.; LESJEAN, S.; VINCENT, V.; GICQUEL, B.; LOCHT, C. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 36, n. 3, p. 762-771, 2000.

SURUJBALLI, O. P.; ROMANOWSKAA, A.; SUGDEN, E. A.; TURCOTTE, C.; JOLLEY, M. E. A. fluorescence polarization assay for the detection of antibodies to *Mycobacterium bovis* in cattle sera. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 87, p. 149–157, 2002.

TELENTI, A.; MARCHESI, F.; BALZ, M.; BALLY, F.; BOTTGER, E. C.; BODMER, T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 31, n. 2, p. 175-178, 1993.

THOEN, C.; LOBUE, P.; De KANTOR, I. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 112, p. 339-345, 2006.

TORRES, P. M. Control de la tuberculosis bovina: experiencia argentina. In: SEMINÁRIO SOBRE CONTROLE DA TUBERCULOSE BOVINA, Bogotá, 2011. **Anales...** Bogotá: [s.n.], 2011.

TWEEDLE, N. E.; LIVINGSTONE, P. Bovine tuberculosis control and eradication programs in Australia and New Zealand. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 40, p. 23-39, 1994.

UK. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (MAFF). **An epidemiological investigation into bovine tuberculosis**: second report of the independent scientific group on cattle TB. UK. London, 1999.

UNITED STATES. Department of Agriculture. Animal health report: 2006. **Agriculture Information Bulletin**, Washington, n. 801, Sept. 2007. Disponível em: http://www.aphis.usda.gov/publications/animal_health/content/printable_version/06_AHR_eport_508.pdf

_____. **Bovine tuberculosis eradication**: uniform methods and rules, effective. Washington, Jan. 2005. Disponível em: http://www.aphis.usda.gov/publications/animal_health/content/printable_version/bovind_turb_errad_1_1_05.pdf. Acesso em: 10 fev. 2012.

URUGUAY. Ministério de Ganaderia, Agricultura y Pesca - MGAP. **Enfermedades infecciosas**. In: _____. **Legislacion sanitaria animal**. Montevideo, ago, 2001. Disponível em: http://www.mgap.gub.uy/DGSG/Legislacion/Cap2_Enf_Infecciosas.pdf. Acesso em: 21 abr. 2012.

VAN SOOLINGEN, P. E. W.; DE HAAS, J.; HAAGSMA, T.; EGER, P. W. M.; HERMANS, V.; RITACCO, A.; ALITO, J. D. A. Use of various genetic markers in differentiation of *Mycobacterium bovis* strains from animals and humans and for studying epidemiology of bovine tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, p. 2425–2433, 1994.

VARELLO, K.; PEZZOLATO, M.; MASCARINO, D.; INGRAVALLE, F.; CARAMELLI, M.; BOZZETTA, E. Comparison of histologic techniques for the 36 diagnosis of bovine tuberculosis in the framework of eradication programs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 20, n. 2, p. 164-169, 2008.

VITALE, F.; CAPRA, G.; MAXIA, L.; REALE, S.; VESCO, G.; CARACAPPA, S. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in cattle by PCR using milk, lymph node aspirates and nasal swabs. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 4, p.1050-1055, 1998.

WEDLOCK, D. N.; SKINNER, M. A.; LISLE, G. W.; BUDDLE, B. M. Control of *Mycobacterium bovis* infection and the risk to human populations. **Microbes and Infection**, Paris, v. 4, p. 471-480, 2002.

WHITNEY, M.S.; ROUSSEL, A.J.; COLE, D.J. Cytologic in bovine practice: Solid tissue, pleural fluid, and peritoneal fluid specimens. **Veterinary Medicine**, Chicago, v. 49, n. 3, p. 277-289, Mar. 1999.

WOOD, P. R.; CORNER, L. A.; ROTHEL, J. S.; BALDOCK, C.; JONES, S. L.; COUSINS, D. B.; McCORMICK, B. S.; FRANCIS, B. R.; CREEPER, J.; TWEDDLE, N. E. Field comparison of the

interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 68, n. 9, p. 286-290, 1991.

WOOD, P. R; ROTHEL, J. S. In vitro immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 40, p. 125-135, 1994.

WRAY, C. Survival and spread of pathogenic bacteria of veterinary importance within the environment. **Veterinary Bulletin**, Farnham Royal, v. 45, p. 543-50, 1975.

YANG, Z.; BARNES, P. F.; CHAVES, F.; EISENACH, K. D.; WEIS, S. E.; BATES, J. H.; CAVE, M. D. Diversity of DNA Fingerprints of Mycobacterium tuberculosis Isolates in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 4, p. 1003-1007, Apr. 1998.

YEBOAH-MANU, D.; YATES, M. D.; WILSON, S. M. Application of a simple multiplex PCR to aid in routine work of the mycobacterium reference laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 11, p. 4166-4168, 2001.

ZANDEN, A. G. M. **Spoligotyping, a tool in epidemiology, diagnosis and control of tuberculosis**. 2002. Tese (Doutorado) - Katholieke Universiteit Nijmegen, Nijmegen.

ZANINI M S.; MOREIRA, E. C.; LOPES, M. T.; OLIVEIRA, R. S.; LEÃO, S. C.; FIORAVANTI, R. L.; ROXO, E.; ZUMARRAGA, M.; ROMANO, M. I.; CATALDI, A.; SALAS, C. E. *Mycobacterium bovis*: polymerase chain reaction identification in bovine lymph node biopsies and genotyping in isolates from southeast Brazil by spoligotyping and restriction fragment length polymorphism. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 6, p. 2809-2813, 2001.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Conhecer a situação epidemiológica da tuberculose bovina no estado do Paraná.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar a prevalência da tuberculose bovina em propriedades.
- Estimar a prevalência da tuberculose bovina em animais adultos em fase de reprodução.
- Identificar fatores de risco associados à presença da tuberculose em propriedades com criação de bovinos.

3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

3.1 EPIDEMIOLOGIA E FATORES DE RISCO DE TUBERCULOSE BOVINA NO ESTADO DO PARANÁ.

RESUMO

A tuberculose bovina é uma zoonose de ampla distribuição geográfica no mundo. O controle da doença requer identificação de animais infectados por meio de testes de tuberculinização seguida da eliminação destes animais e por este motivo, tornam seu uso rotineiro complexo. Considerando a importância do tema na saúde pública e na produção pecuária, foram pesquisadas, por meio de um estudo epidemiológico seccional, as prevalências em rebanhos de bovinos e em animais adultos em fase de reprodução, assim como os fatores de risco associados à presença da tuberculose nos rebanhos do estado do Paraná. O estado foi estratificado em sete regiões e a seleção da amostra foi feita em duas etapas, nas quais foram selecionadas 1.419 propriedades com criação de bovinos e testados 16.045 animais. A prova utilizada foi a tuberculinização intradérmica cervical comparada. A prevalência em propriedades e em animais no estado do Paraná foi estimada em 2,15% [IC 95%: 1,31–3,00] e 0,42% [IC 95%: 0,04–0,81] respectivamente. As prevalências estimadas em propriedades e em animais, por estrato amostral foram respectivamente: no estrato 1 (Noroeste) 3,69% [IC 95%: 1,60–7,13] e 1,08% [IC 95%: 0,00 – 2,59]; no estrato 2 (Centro-Oeste-Norte) 3,48% [IC 95%: 1,41-7,04] e 0,43% [IC 95%: 0,00 – 0,87]; no estrato 3 (Norte Pioneiro) 1,96% [IC 95%: 0,54-4,94] e 0,17% [IC 95%: 0,00-0,40]; no estrato 4 (Centro-Sul) 3,89% [IC 95%: 1,58-7,85] e 0,29% [IC 95%: 0,01-0,57]; no estrato 5 (Oeste) 0,00 [IC 95%: 0,00 – 1,83] e 0,00 [IC 95%: 0,00 – 0,00]; no estrato 6 (Leste-Sul) 1,03% [IC 95%: 0,12-3,67] e 0,20% [IC 95%: 0,00-0,54]; no estrato 7 (Sudoeste) 2,24% [IC 95%: 0,73-5,15] e 0,22% [IC 95%: 0,01-0,43]. O modelo de regressão logística identificou como fatores de risco associados à presença de tuberculose bovina, rebanho adulto com mais de 22 bovinos e a existência de ordenha mecanizada na propriedade. Os resultados demonstram que a tuberculose bovina tem prevalência baixa na maioria das regiões do Estado do Paraná e sugerem que o risco da presença da doença aumenta em rebanhos leiteiros maiores e com ordenha mecânica.

Palavras chave: Prevalência. *Mycobacterium bovis*. Estratégias de controle. Tuberculinização intradérmica.

INTRODUÇÃO

O Paraná é um dos estados da região sul do Brasil, com área geográfica de 199.282 Km² que correspondem a 2,3% do território nacional e é subdividido em 399 municípios. Situa-se em uma área de transição em termos físicos e naturais, com diferentes climas, solos, formas de relevo, geologia e cobertura vegetal diversificada. Estes fatores refletem a diversidade dos sistemas de produção pecuária. Nas regiões mais próximas ao Trópico de Capricórnio (norte, noroeste e norte-central) predomina o clima tropical onde se concentra a bovinocultura de corte, que representa 55% do rebanho bovino paranaense. As regiões de clima temperado abrangem cerca de dois terços do território do estado, cujo

sistema de produção da bovinocultura de corte é formado por raças mestiças e puras e está quase sempre integrado com lavouras. Ao sul do estado, o estrato fundiário é menor, dividido em propriedades de subsistência e algumas especializadas em produção leiteira (FAEP, 2010).

O rebanho bovino do estado do Paraná é de aproximadamente 9.5 milhões de animais, criados em 215.392 propriedades rurais (PARANÁ, 2012). A pecuária leiteira é constituída por raças especializadas, desenvolvida principalmente em pequenas propriedades, com grande participação familiar. Na bovinocultura de corte predomina o gado azebuado, especialmente da raça Nelore, criado em sistema extensivo com ciclo completo nas propriedades maiores, enquanto nas menores, se concentram as fases de terminação e produção de reprodutores de corte ou de leite (FAEP, 2010).

A tuberculose é uma das doenças de maior impacto na pecuária leiteira e representa risco para os consumidores de produtos de origem animal devido ao seu caráter zoonótico (MAPA, 2006). Por estes motivos, em 2001, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) do Brasil, instituiu o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT). Devido à inexistência de informações precisas, já que a maioria dos estudos sobre a prevalência da tuberculose bovina no Brasil abrangem unidades administrativas pequenas, como regiões de estados, municípios ou localidades (LAENDER, 1978; CASTRO, 1979; ALFINITO; OLIVEIRA, 1986; LILENBAUM *et al.*, 1998, BELCHIOR, 2000; RIBEIRO *et al.*, 2003; POLETTO *et al.*, 2004; BRASIL, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2007) o Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento induziu as unidades da federação a realizar estudos para caracterizar a situação epidemiológica da tuberculose bovina. E por esta razão, os objetivos deste trabalho foram de estimar a prevalência da tuberculose em propriedades e em animais, identificar características dos sistemas de produção e de manejo animal que possam estar associados ao aumento do risco de ocorrência da tuberculose bovina no estado do Paraná.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo transversal faz parte de um projeto cooperativo entre o MAPA, o Laboratório de Epidemiologia e Bioestatística da Universidade de São Paulo (LEB/VPS/FMVZ/USP), o Laboratório de Epidemiologia Veterinária da Universidade de Brasília

(EpiPlan/FAV/UnB) e os órgãos de defesa sanitária estaduais, como a Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento do Paraná – SEAB-PR.

Os trabalhos de campo foram realizados entre novembro de 2005 a agosto de 2007 pelos médicos veterinários da Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento do Paraná (SEAB-PR), após terem sido capacitados em curso de habilitação de médicos veterinários (BRASIL, 2006), incluindo o uso do aparelho de GPS (*global position system*), seleção das unidades primárias e secundárias de amostragem e preenchimento do questionário epidemiológico do estudo.

O estado do Paraná foi dividido em 07 (sete) estratos geográficos de amostragem (Figura 1), também chamados de regiões produtoras, devido às evidências de diferenças climáticas, dos sistemas de criação, da estrutura e tamanho dos rebanhos e das formas de comercialização da produção pecuária.

Figura 1 - Estado do Paraná e divisão das regiões produtoras.



Para o cálculo do número de propriedades selecionadas por região, foram considerados os seguintes parâmetros (THRUSFIELD, 2007): Prevalência esperada em propriedades (P_{esp}) estimada em 5%, com base nos valores encontrados por Belchior (2000) em Minas Gerais, nível de confiança de 95% e erro absoluto (d) de 3%, obtendo-se, assim, uma amostra mínima de 203 propriedades por região. Foi estabelecido que nas regiões onde não fosse possível amostrar esse número de propriedades, a amostra incluiria pelo menos 150 rebanhos para garantir que o erro absoluto não seria superior a 3,5% e o nível de confiança de 95%.

A distribuição das amostras em cada região foi feita em dois estágios (SALMAN, 2003). No primeiro estágio foram selecionadas aleatoriamente as propriedades ou unidade amostral primária e no segundo estágio, foram selecionados machos e fêmeas

bovinas e bubalinas com mais de 24 meses de idade, em atividade reprodutiva, por meio de aleatória sistemática das unidades amostrais secundárias. Desta subpopulação, foram excluídas do estudo as fêmeas que estavam entre 15 dias antes e após o parto ou aborto, para evitar reações anérgicas temporárias, conforme recomendado pelo PNCEBT (BRASIL, 2006).

Como método de diagnóstico, foi utilizada a prova de tuberculinização intradérmica cervical comparada, assumindo valores de sensibilidade e especificidade de 80% e 99.5% respectivamente, de acordo com Lôbo (2008). Os animais classificados como inconclusivos ao teste foram retestados 60 dias após. Os que repetiram o resultado inconclusivo foram classificados como positivos. A interpretação das leituras nas provas de tuberculinizações comparadas seguiu as normas do PNCEBT (BRASIL, 2006).

Em cada propriedade selecionada, foi avaliada aleatoriamente uma quantidade de animais que permitisse classificar; com 90% de sensibilidade e especificidade em nível de rebanho; a propriedade como foco ou não foco de tuberculose. O número de animais amostrado dependia do número existente de fêmeas e machos de reprodução com idade igual ou superior a 24 meses. Os pontos de corte ou número mínimo de animais positivos para caracterizar as propriedades como focos foram calculados (MARTIN; HOUKRI; THORBUM, 1992; DONALD; GARDNER; WINGGINS, 1994; SALMAN, 2003) utilizando o *software* Herdacc versão 3.0. Após algumas simulações conduzidas para diferentes tamanhos de rebanhos, de amostras e de pontos de corte, se obteve os valores apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Número de reprodutores adultos, quantidade de animais a serem amostrados e quantidade mínima de animais positivos para classificar a propriedade como foco.

Nº de ♀ ♂	Nº de animais	Ponto de Corte
≥ 24 m.	a serem testados	(Nº de animais positivos)
1 a 99	20	1
100 ou mais	40	2

Na primeira visita à propriedade selecionada foram detalhados os objetivos do projeto ao produtor e firmado compromisso autorizando a eliminação (por abate sanitário ou por destruição na propriedade) de todos os animais positivos, e em contrapartida, o produtor foi ressarcido com R\$ 250,00 por animal eliminado. Foi também

aplicado um questionário com 28 perguntas elaboradas para identificar possíveis fatores de risco de tuberculose, associados ao sistema de criação e da exploração, forma de inserção do produtor no mercado, manejo sanitário e reprodutivo do rebanho. Os animais foram selecionados aleatoriamente, identificados individualmente, tricotomizados no terço médio da região cervical esquerda nos locais de aplicação dos alergen¹ e inoculados conforme recomendação do PNCEBT (BRASIL, 2006). Após 72 horas, mais ou menos 6 horas, foi realizada a leitura das inoculações das tuberculinas e sua interpretação.

Os dados obtidos foram inseridos em um sistema *on line* elaborado pelo laboratório de epidemiologia da Universidade de São Paulo – USP².

Os cálculos de prevalência aparente foram estimados de acordo com Salman (2003), Thrusfield (2007), e Dohoo, Martin, Stryhn (2010), e seus respectivos intervalos de confiança calculados pela distribuição binomial exata pelo recurso *Analysis* do programa *Epi Info 6.0* (DEAN *et al.*, 1994).

Uma vez que cada unidade amostral primária e secundária representa respectivamente um conjunto de propriedades e de animais dentro da amostra, foi necessário calcular o valor ponderado que cada um deles tem em relação à população representada, por meio das seguintes fórmulas:

- Peso de cada propriedade = P_1
- Peso de cada animal = P_2

$$P_1 = \frac{\text{Propriedades na região}}{\text{propriedades amostradas na região}}$$

$$P_2 = \frac{\text{Reprodutores existentes } \geq 24m \text{ na propriedade}}{\text{Reprodutores } \geq 24m \text{ amostrados na propriedade}} \times \frac{\text{Reprodutores existentes } \geq 24m \text{ na região}}{\text{Reprodutores existentes } \geq 24m \text{ nas propriedades amostradas da região}}$$

Para os cálculos do peso das unidades primárias e secundárias da amostra, foram utilizados como fonte de referência, os números de rebanhos e de animais provenientes do Informe de Vacinação contra Febre Aftosa – campanha de novembro de 2008 (PARANÁ, 2008).

Como etapa inicial de identificação dos possíveis fatores de risco, as variáveis quantitativas foram transformadas em variáveis categóricas após análise exploratória dos dados, para facilitar sua utilização no modelo de regressão logística. Procedeu-se a análise univariada de todas as variáveis incluídas no questionário cuja

¹ PPD Bovina produzida a partir de cepa AN5 de *Mycobacterium bovis*, contendo 1 mg de proteína por mL (32.500UI) e PPD Aviária produzida a partir da cepa D4 de *Mycobacterium avium*, contendo 0,5 mg de proteína por mL (25.000UI), ambas produzidas pelo Instituto de Tecnologia do Paraná - TECPAR.

² Disponível em: <https://www.vps.fmvz.usp.br/tb>.

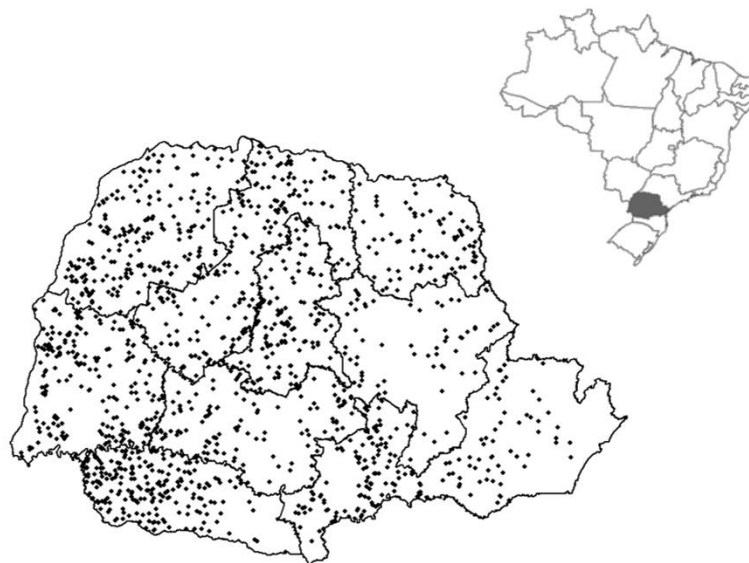
associação com a presença ou ausência de tuberculose no rebanho apresentava plausibilidade biológica ou epidemiológica. Aquelas cujo nível de significância (p) foi igual ou menor a 0,20 no teste do χ^2 ou exato de Fischer, foram submetidas ao modelo de regressão logística múltipla; que considera a interação entre variáveis. O método utilizado para modelagem foi o “Hierarchical Backward Elimination”, restando no modelo final somente as variáveis que apresentaram o valor de $p \leq 0,05$. A variável “estrato ou região” foi incluída no modelo logístico como variável de controle com o objetivo de analisar a associação dos possíveis fatores de risco com a presença da tuberculose independente da região em que os rebanhos estão localizados. Para estes cálculos foi usado o software STATA MP 12®.

Para avaliar o desempenho discriminatório das variáveis do modelo logístico final, foi calculada a sensibilidade e a especificidade dos parâmetros, por meio da Curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*), como instrumento de avaliação da capacidade preditiva do modelo. Para este cálculo foi usada a função específica do software STATA MP 12®.

RESULTADOS

As propriedades amostradas estão distribuídas por todo o espaço geográfico do Paraná, conforme se observa na Figura 2.

Figura 2 – Distribuição espacial da amostra no estudo de prevalência da tuberculose bovina, Paraná - Brasil.



Perfil da Amostra

As respostas obtidas pelo questionário são as descritas a seguir de acordo com:

i) Características gerais do rebanho: grande parte do rebanho do estado do Paraná (73%) era composta por bovinos de raças não europeias, de aptidão corte ou mista (59%) e 79% era criada em regime extensivo. O uso de inseminação artificial, associado ou não ao repasse com touro, estava presente em aproximadamente 24% das propriedades, sendo que entre os rebanhos leiteiros, 38% utilizavam inseminação artificial. Nas propriedades com rebanhos de corte e de leite, mistos e puros, a mediana da quantidade de vacas em ordenha e da produção leiteira diária foi de cinco vacas em lactação produzindo 30 litros por propriedade. A ordenha manual era feita em 60% das propriedades leiteiras e mecanizada em 36% delas. A prática de alugar pastagens foi observada em quase 10% das propriedades, enquanto 11% tinham áreas de pastagem comuns com fazendas vizinhas.

ii) Comercialização e consumo de produtos de origem animal: entre as propriedades que produziam queijo e manteiga, cerca de 85% delas destinavam seus produtos para consumo próprio e 15% também comercializavam. Em relação aos cuidados com o consumo de leite, detectou-se que em quase 15% das propriedades as pessoas tinham o hábito de consumir o leite cru. Pouco mais da metade das propriedades que abatiam os animais, o faziam em estabelecimentos com inspeção sanitária.

iii) Assistência veterinária e práticas sanitárias: 34% das propriedades tinham assistência veterinária; em 79% dos casos, o serviço era prestado por médicos veterinários autônomos não ligados a cooperativas. Em relação aos cuidados com a saúde animal, apenas 23% das propriedades faziam teste de tuberculose no rebanho e 48% destas, faziam-no uma vez ao ano. Aproximadamente 44% das propriedades compravam animais e 23% exigiam exames de tuberculose antes de finalizar a compra dos animais.

Prevalência de Propriedades e de Animais

As tabelas 2 e 3 apresentam o número de propriedades e animais com idade superior a 24 meses existentes e amostrados por região, assim como as

correspondentes estimativas de prevalência de focos (Tabela 2) e casos (Tabela 3) de tuberculose bovina.

A tabela 4 apresenta as prevalências de focos de tuberculose bovina no estado do Paraná, de acordo com o tipo de aptidão produtiva.

Fizeram parte do estudo 1.419 propriedades e 16.045 animais, sendo que destes, 220 foram submetidos ao reteste por terem sido inconclusivos no primeiro teste. Entre os animais retestados, 13 foram classificados como positivos de acordo com recomendação do PNCEBT (BRASIL, 2006).

Compunham a amostra 1.217 propriedades com rebanhos de até 99 animais adultos e 202 propriedades, com rebanhos adultos acima de 100 animais. Seguindo os critérios de definição de foco apresentados na Tabela 1, entre as propriedades com rebanhos maiores, somente uma foi classificada como negativa apesar de ter um animal positivo ao teste, as demais, tiveram dois ou mais animais positivos.

Tabela 2 - Dados censitários e prevalência de focos de tuberculose bovina, por região e para o estado do Paraná - Brasil.

Estrato/Região	Propriedades existentes com atividade reprodutiva	Propriedades		Prevalência Aparente (%)	IC (95%)
		Testadas	Positivas		
1 – Noroeste	22.596	217	8	3,69	[1,60–7,13]
2 – Centro-Oeste-Norte	19.677	201	7	3,48	[1,41–7,04]
3 – Norte Pioneiro	33.369	204	4	1,96	[0,54–4,94]
4 – Centro-Sul	38.816	180	7	3,89	[1,58–7,85]
5 – Oeste	31.652	200	0	0,00	[0,00–1,83]
6 – Leste-Sul	27.741	194	2	1,03	[0,12 –3,67]
7 – Sudoeste	43.538	223	5	2,24	[0,73–5,15]
Estado	217.389	1.419	33	2,15	[1,31–3,00]

IC: Intervalo de Confiança

Fonte: * Paraná (2008)

Tabela 3 - Dados censitários e prevalência de casos de tuberculose bovina, por região e para o estado do Paraná- Brasil.

Estrato/Região	Reprodutores ♀ ♂ ≥24m existentes na região *	Reprodutores ♀ ♂ ≥24m das propriedades amostradas *	Animais		Prevalência Aparente (%)	IC (95%)
			Testados	Positivos		
1 – Noroeste	1.187.829	11.572	3.361	15	1,08	[0,00 – 2,59]
2 – Centro-Oeste-Norte	627.789	9.031	3.009	16	0,43	[0,00 – 0,87]
3 – Norte Pioneiro	1.042.209	5.750	2.274	10	0,17	[0,00 – 0,40]
4 – Centro-Sul	938.947	7.466	2.177	14	0,29	[0,01– 0,57]
5 – Oeste	548.059	3.963	1.758	0	0	[0,00 – 0,00]
6 – Leste-Sul	221.562	2.171	1.224	3	0,20	[0,00 – 0,54]
7 – Sudoeste	567.757	3.629	2.242	5	0,22	[0,01– 0,43]
Estado	5.134.4152	43.582	16.045	63	0,42	[0,04 – 0,81]

IC: Intervalo de Confiança.

Fonte: * Paraná (2008)

Tabela 4 - Prevalência de focos de tuberculose bovina por aptidão produtiva para o estado do Paraná- Brasil.

Tipo de exploração	Resultado	Prevalência (%)	IC (95%)
Corte	3/237	1,26	[1,19 – 1,33]
Misto	10/593	1,69	[1,60 – 1,78]
Leite	19/581	3,27	[3,05 – 3,49]

IC: Intervalo de Confiança.

Análise Univariada

A Tabela 5 apresenta o resultado da análise univariada, descrevendo apenas as variáveis com importância epidemiológica para o estudo e as que tiveram o valor p ao teste estatístico, inferior a 0,2. O ponto de corte para categorizar a variável “tamanho de rebanho bovino adulto” foi definido mediante análise exploratória dos dados, decidindo-se por usar o 3º quartil da distribuição, no caso, 22 bovinos com mais de 24 meses, o que demonstra que os rebanhos paranaenses são majoritariamente pequenos.

Tabela 5 - Resultados da análise univariada dos possíveis fatores de risco de tuberculose em bovinos com atividade reprodutiva no estado do Paraná – Brasil.

Variável	Expostos/Focos	Expostos/Não Foco	p valor
Tipo de exploração:			
. Leite	19/32	562/1379	0,034
. Corte ou Misto	13/32	817/1379	
Raça bovina:			
. Europeu	16/33	359/1374	0,004
. Não Europeu	17/33	1015/1374	
Tipo de criação categorizada:			
. Extensivo	23/33	1084/1381	0,226
. Intensivo e semiconfinado	10/33	297/1381	
Realização de ordenha categorizada:			
. Mecânica	18/33	270/1374	0,000
. Não ordenha e Ordenha Manual	15/33	1104/1374	
Aluguel de Pastagem:			
. Sim	6/32	132/1380	0,084
. Não	26/32	1248/1380	
Aquisição Animais:			
. Sim	21/33	596/1379	0,019
. Não	12/33	783/1379	
Rebanho bovino $\geq 24m$ categorizado:			
. ≤ 22 bovinos	14/33	1056/1386	0,000
. > 22 bovinos	19/33	330/1386	

Análise Multivariada

O modelo de regressão logística múltipla ficou composto pelas variáveis cujo valor de p é inferior a 0,05. Na Tabela 6, é possível verificar que as variáveis; “Tamanho de Rebanho Bovino Adulto” e “Realização de Ordenha” aumentam o risco da presença de tuberculose bovina na propriedade. Rebanhos com mais de 22 animais adultos (25% do total das propriedades amostradas) têm aproximadamente 2,4 vezes mais chance de ser foco do que os rebanhos menores. A *Odds Ratio* foi de 5,18 para os rebanhos com ordenha mecânica quando comparados aqueles em que a ordenha é manual ou não ordenham.

Tabela 6 - Modelo final de regressão logística múltipla de fatores de risco (*odds ratio*) para tuberculose em rebanhos com atividade reprodutiva no estado do Paraná- Brasil.

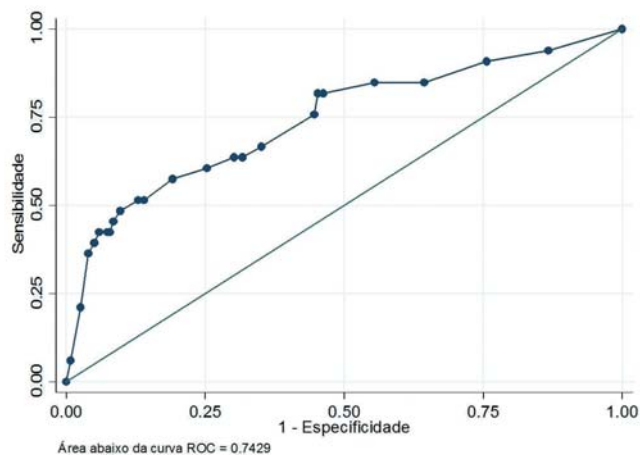
Variável	Odds Ratio	IC (95%)	p
Tamanho de rebanho bovino (> 24m):			
. Rebanho adulto > 22 bovinos	2,40	[1,11 – 5,19]	0,026
Realização de Ordenha:			
. Ordenha mecânica	5,18	[2,45 – 10,95]	0,000

IC: Intervalo de Confiança.

Pseudo $R^2 = 0,1137$ com 1209 observações.

O desempenho discriminatório das variáveis do modelo logístico final pode ser avaliado na Figura 3, que apresenta a Curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*), ou seja, a capacidade do modelo prever a proporção de focos e de não focos.

Figura 3 - Curva ROC do modelo logístico apresentado na Tabela 6.



A área abaixo da curva ROC foi de 0,743, indicando uma boa discriminação entre os rebanhos positivos e negativos, a qual deve estar idealmente próxima a 0,8 (KLEINBAUM; KLEIN, 2010).

DISCUSSÃO

Os parâmetros de sensibilidade (80%) e de especificidade (99,5%), considerados neste estudo para a prova de tuberculinização intradérmica cervical comparada, correspondem aos valores médios de uma distribuição Pert estimados por Lôbo

(2008), já que os valores publicados na literatura técnica e científica eram muito heterogêneos.

Os resultados do presente estudo permitem afirmar que a prevalência de tuberculose bovina em reprodutores adultos nas propriedades do estado do Paraná é de 2,25% [IC 95%: 1,31% – 3,00%]. Este valor é inferior à estimativa inicial de 5% [IC 95%: 4,7% - 5,4%], tendo como base o estudo conduzido em Minas Gerais por Gonçalves *et al.* (2003). Esta diferença deve estar associada às diferenças regionais dos sistemas de criação de ambos os estados e pela existência de regiões de prevalência alta em novas bacias leiteiras em MG, como o Alto Paranaíba que, segundo Belchior (2000), podem ter se contaminado por animais infectados das regiões tradicionais mineiras.

Os estratos referentes às regiões noroeste, centro-oeste-norte e centro-sul apresentaram prevalência de propriedades mais alta que as demais. No entanto, não é possível afirmar com 95% de confiança que as prevalências estimadas para as sete regiões sejam significativamente diferentes, em virtude de haver sobreposição dos intervalos de confiança. A região Oeste destacou-se pela ausência de propriedades positivas, que pode indicar prevalência residual da doença nesta região.

Ao observarmos os resultados apresentados na Tabela 4, se percebe que a prevalência de animais reagentes está próxima ao valor estimado por Kantor e Ritacco (1994) em 0,58%, para a região Sul do Brasil. O mesmo ocorreu no estudo feito em Minas Gerais por Gonçalves *et al.* (2003), no qual a prevalência aparente de animais foi de 0,81% [IC 95%: 0,37%-1,25%] um pouco mais alta porém, semelhantes estatisticamente em relação ao encontrado no presente estudo.

Em relação à prevalência da doença nos diferentes tipos de exploração, a prevalência da tuberculose nas propriedades leiteiras foi maior do que nas mistas e nas de corte (Tabela 5), resultado corroborado por outros autores referentes a outras regiões do Brasil, como Lilenbaum *et al.* (1998), Belchior (2000) e Brasil (2006). Em rebanhos leiteiros, a manutenção da doença no rebanho é favorecida pelo manejo mais intenso e confinado dos animais, onde o contato entre eles é mais próximo e frequente do que entre os animais criados nos outros tipos de exploração (PEREZ, *et al.*, 2002). O resultado do modelo logístico reforça esta hipótese, já que as propriedades com ordenha mecânica apresentaram maior risco de serem positivas, tal como já havia sido observado por Belchior (2000) em MG.

Este resultado é de importância estratégica para o PNCEBT, já que as propriedades com ordenha mecânica têm maior oferta do produto e, naquelas que produzem queijo e manteiga (499/1401), 15% dos produtores ainda mantinham o hábito de consumir leite cru e 85% informaram não vender seus produtos, o que pode ser indício de comércio informal, possivelmente próximo da propriedade, uma vez que a produção extrapola a demanda familiar. Sob este aspecto, vale salientar que o consumo per capita de lácteos no Brasil (equivalente-leite), vem crescendo com taxa anual de 1,7% desde 1986, o que significa dizer que cada brasileiro tem consumido em média, 1,7% a mais de lácteos por ano, em comparação com o ano anterior (CARVALHO, 2011) e que provavelmente o leite oriundo destas propriedades pode estar em maior oferta no mercado.

As principais características das propriedades com ordenha mecanizada (n=288) são a composição racial do rebanho, sendo a maioria (81,5%) formada por raças especializadas em produção leiteira (235/288) e entre estas, 62,84% de raças europeias. Quase metade (44,09%) das propriedades com ordenha mecânica, não usa inseminação artificial (127/288) e, somente 25% (73/288) destes produtores, exige exame negativo de tuberculose para repor o plantel. Estes fatores podem explicar e contribuir com o aumento do risco de infecção pelo *Mycobacterium bovis* entre estas propriedades, já que a maioria delas não usa inseminação artificial e não exige exames negativos dos animais raceadores comprados. Estes achados confirmam a associação da presença de tuberculose bovina com os fatores de risco mencionados por Reilly e Courtenay (2007); Oloya *et al.* (2007); Humblet, Boschioli e Saegerman (2009).

Em torno de 77% dos produtores não entregam leite para cooperativas e sim, diretamente aos laticínios na forma de leite resfriado e, na maioria dos casos (92%), o resfriamento é feito em tanque próprio. Estes dados expressam na realidade, o investimento feito na produção leiteira e, por este motivo, se espera que as demais práticas de manejo sejam intensivas visando o retorno mais rápido do capital, o que acarreta em aumento da taxa de contato efetivo entre os animais e por isto, facilita a manutenção da tuberculose no rebanho (PERES, WARD e RITACCO, 2011).

O tipo de criação (intensivo, semiconfinado ou extensivo), que se supunha inicialmente ter importância na explicação da presença da tuberculose e, mencionado como fator de risco por Humblet, Boschioli e Saegerman (2009) e Reilly e Courtney (2007), não foi significativo ($p=0,416$) nem quando categorizado como extensivo/não extensivo ($p=0,226$),

sendo por isto descartado do modelo final. Isto pode ser explicado pelo fato de a maioria (79%) das propriedades serem extensivas, o que torna esta variável pouco adequada para discriminar tipos de produção e manejo associados à presença da tuberculose, nas condições do Paraná. A existência de ordenha mecânica é, por outro lado, um indicador indireto de criação intensiva, o que confirma as observações dos autores mencionados.

A aquisição de animais ($p=0,019$) foi usada no modelo multivariado apesar de não ter sido mantida no modelo final já que Reilly e Courtenay (2007) e Oloya *et al.* (2007), entre muitos outros autores, recomendam minimizar a compra de animais como medida de mitigação do risco de tuberculose bovina. É possível que a compra de animais tenha forte correlação com o tamanho de rebanho, o que contribuiria para a sua exclusão do modelo.

O modelo revelou que as propriedades maiores, com mais de 22 animais adultos, têm maior risco de infecção pelo *Mycobacterium bovis*. O número de animais parece ser pequeno, porém reflete a estrutura demográfica do rebanho paranaense. Rebanhos maiores, foi também considerado fator de risco por Oliveira *et al.* (2008) em estudo retrospectivo feito no Rio de Janeiro, com dados referentes ao período de 1959 a 1989, assim como Brokks-Pollock e Kelling (2009).

Vale ressaltar que as variáveis mencionadas neste estudo não devem ser entendidas como fatores de risco em si mesmo, mas sim, como características produtivas que melhor e mais objetivamente refletem sistemas de produção e manejo intensivo que aumentam o risco da doença, conforme relatam autores como Humblet, Boschioli e Saegerman (2009), Gonçalves *et al.* (2003), e Elias *et al.* (2008). Os verdadeiros fatores de risco associados à presença de tuberculose bovina nas propriedades são todos aqueles que propiciam contato efetivo entre os animais infectados e os suscetíveis conforme descrevem Perez, *et al.* (2002).

No estado do Paraná, a vigilância de tuberculose bovina poderá se tornar mais eficiente se for dirigida prioritariamente no início desta nova fase do programa, às propriedades com rebanhos leiteiros tecnificados, de tamanho acima de 22 animais em idade de reprodução.

CONCLUSÕES

A prevalência da tuberculose bovina é baixa no estado do Paraná. E por este motivo, o estado tem uma situação epidemiológica favorável à implantação de um programa de erradicação da tuberculose bovina.

O estudo fornece informação necessária ao planejamento de estratégias de vigilância dirigidas a regiões e tipos de propriedades de risco mais elevado.

O Oeste Paranaense pode ser usado como região piloto para implantação de uma área livre de tuberculose bovina, onde possam ser testadas todas as particularidades da nova estratégia antes de serem aplicadas no estado todo.

As propriedades paranaenses que criam animais adultos acima de 22 bovinos, que têm ordenham mecanizada e majoritariamente compostas por raças europeias de leite, têm maior risco de estar infectadas por *Mycobacterium bovis*, devendo assim, ser incluídas inicialmente na vigilância da doença.

REFERÊNCIAS

- ALFINITO, J.W.; OLIVEIRA, F.R. Estudo Epidemiológico da Tuberculose Bovina na Ilha de Marajó. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 20., 1986, Cuiabá. **Anais...** Cuiabá: Sociedade Matogrossense de Medicina Veterinária, 1986. p. 216-217.
- BELCHIOR, A. P. C. **Prevalência, distribuição regional e fatores de risco da tuberculose bovina em Minas Gerais**. 2000. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT)**. Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2006.
- BROOKS-POLLOCK, E.; KEELING, M. Herd size and bovine tuberculosis persistence in cattle farms in Great Britain. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 92, p. 360-365, 2009.
- CARVALHO, MARCELO PEREIRA DE. O consumo de lácteos no Brasil. In: **Competitividade do Agronegócio do leite brasileiro**. Editores técnicos, Lorildo Aldo Stock, Rosângela Zoccal, Glauco Rodrigues de Carvalho, Kenya Beatriz Siqueira – Brasília, DF: 326 p., 2011.
- CASTRO, D. **Prevalência de Bovinos Reagentes à Prova Tuberculínica no Município de Uberaba, MG, 1978**. 1979. (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- DEAN, A.G.; DEAN, J. A.; COLOMBIER, D.; BRENDEL KA, SMITH DC, BURTON AH. **Epi-Info, version 6: a Word processing database, and statistics program for epidemiology on microcomputers**. Atlanta, CDC: Centers for Disease Control and Prevention, 1994.
- DOHOO, I.; MARTIN, W.; STRYHN, H. **Veterinary epidemiologic research**. 2nd ed. Charlottetown, Prince Edward Island: AVC, 2010.
- DONALD A. W.; GARDNER I. A.; WINGGINS A. D. Cut-off points for aggregate herd testing in the presence of disease clustering and correlation of test errors. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 19, n. 3/4, p. 167-187, 1994.
- ELIAS, K.; HUSSEIN, D.; ASSEGED, B.; WONDWOSSEN, T.; GEBEYEHU, M. Status of bovine tuberculosis in Addis Ababa dairy farms, **Review of Science and Technology off International Epiz.**, New York, v. 27, p. 915-923, 2008.
- FEDERAÇÃO DA AGRICULTURA DO ESTADO DO PARANÁ (FAEP). **Plano Diretor para o agronegócio do Paraná**. Curitiba, jun. 2010.
- GONÇALVES, V.S.P.; BELCHIOR, A. P. V C.; RODRIGUES NETO, A.; LEITE, R. C. An exploratory survey of bovine tuberculosis in the State of Minas Gerais, Brazil. In INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON VETERINARY EPIDEMIOLOGY AND ECONOMICS, 10., 2003. Vina del Mar, Chile. **Proceedings...** Vina del Mar, Chile, 2003. Disponível em: <<http://www.sciquest.org.nz>>. Acesso em: 21 maio 2012.

HERDACC version 3. **Guelph:** University of Guelph, 2005. Disponível em: <http://www.vetschools.co.uk/EpiVetNet/files/herdacc.exe>. Acessado em: 23 maio 2009.

HUMBLET, M. F.; BOSCHIROLI, M. L.; SAEGERMAN, C. Classification of worldwide bovine tuberculosis risk factors in cattle: a stratified approach. **Veterinary Research**, Les Ulis, FR, v. 40, n. 5, p.50, Jun. 2009.

KANTOR, I. N.; RITACCO, V. An update on bovine tuberculosis programmes in Latin American and Caribbean countries. **Veterinary Microbiology**, v. 112, p. 111-118, 2006.

KLEINBAUM, D.G.; KLEIN, M. **Logistic regression: a self-learning text**. 3th ed. New York: Springer, 2010.

LAENDER, F. C. **Prevalência de bovinos reagentes à prova de tuberculina no município de Pedro Leopoldo, MG, 1977**. 1978. (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

LILENBAUN, W.; SCHETTINI, J.; RIBEIRO, E.R.; SOUZA, G. N.; MOREIRA, E. C.; FONSECA, L. S. Tuberculose bovina. Prevalência e estudo epidemiológico em treze propriedades de diferentes sistemas de produção na região dos lagos do Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 20, p. 120-123, 1998.

LÔBO, J. R. **Análise custo-benefício da certificação de propriedades livres de tuberculose bovina**. 2008. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília.

MARTIN, S. W.; SHOUKRI, M.; THORBUM, M. A. Evaluating the health status of herds based on tests applied to individuals. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 14, n. 1/2, p. 33-43, 1992.

OLIVEIRA, I. A. S.; MELO, H. P. C.; CAMARA, A.; DIAS, R. V. C.; SOTO-BLANCO, B. **Prevalência de tuberculose no rebanho bovino de Mossoró, Rio Grande do Norte**. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, São Paulo, v. 44, n. 6, p. 395-400, 2007.

OLIVEIRA, V. M.; FONSECA, A. H.; PEREIRA, M. J. S.; CARNEIRO, A. V.; JESUS, V. L. T. ALVES, P. A. M. Análise retrospectiva dos fatores associados à distribuição da tuberculose bovina no estado do Rio de Janeiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 3. p. 574-579, 2008.

OLOYA, J.; MUMA, J. B.; OPUDA-ASIBO, J.; DJONNE, B.; KAZWALA, R.; SKJERVE, E. Risk factors for herd-level bovine-tuberculosis seropositivity in transhumant cattle in Uganda. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 80, p. 318-329, 2007.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. **Informe de vacinação contra febre aftosa**. Curitiba, 2012.

_____. **Informe de Vacinação contra Febre Aftosa**. Curitiba, 2008.

PEREZ, A. M; WARD, M.P. ARMANDO; CHARMANDARIAN, A.; RITACCO,V. Simulation model of within-herd transmission of bovine tuberculosis in Argentine dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 54, p. 361–372, 2002.

PEREZ, A. M; WARD, M. P.; RITACCO, V. Modelling the feasibility of bovine tuberculosis eradication in Argentina. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.**, v. 30, n. 2, p. 635-645, 2011.

POLETTI, ROSANGELA, *et al.* **Prevalência de tuberculose, brucelose e infecção víricas em bovinos leiteiros do município de Passo Fundo, RS.** *Ciência Rural*, Santa Maria v. 34, n. 2, p. 595-598, mar/abr,2004.

REILLY, L. A.; COURTENAY, O. Husbandry practices, badger sett density and habitat composition as risk factors for transient and persistent bovine tuberculosis on UK cattle farms. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 80, p. 129-142, 2007.

RIBEIRO, A. R. P. *et al.* **Prevalência de tuberculose e brucelose bovina no município de Ilhéus.** *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 55, n. 1, Belo Horizonte, fev. 2003.

SALMAN,M.D. **Animal disease surveillance and survey systems methods and applications.** 1st. ed. Iowa State Press, 2003.

STATA MP 12. Data analysis and statistical software. © Copyright 1996–2011.StataCorp LP.

THRUSFIELD, M. **Veterinary epidemiology.** 3ed. Oxford: Blackwell Science, 2007. 610p.

APÊNDICE

APENDICE

QUESTIONÁRIO DO ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO

TUBERCULOSE BOVINA E BUBALINA																		
Estudo Epidemiológico																		
01- Identificação: Município: _____ ESTRATO Nº: _____ UF: _____ Proprietário: _____ Propriedade: _____ Código de cadastro no serviço de defesa: _____ Esta propriedade foi visitada no inquérito de brucelose? <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não Se não, por que? <input type="checkbox"/> substituição por recusa <input type="checkbox"/> complementação do tamanho da amostra										02 - Data das visitas: Data da inoculação: ____/____/____ Data da leitura: ____/____/____ 03 - Código* do rebanho no estudo (9 dígitos) _____ *Correspondente ao Inquérito da Brucelose								
05- Tipo da Exploração: <input type="checkbox"/> corte <input type="checkbox"/> leite <input type="checkbox"/> mista 06- Tipo de Criação: <input type="checkbox"/> confinado <input type="checkbox"/> semi-confinado <input type="checkbox"/> extensivo 07- Nº de Ordenhas por dia: <input type="checkbox"/> 1 ordenha <input type="checkbox"/> 2 ou 3 ordenhas <input type="checkbox"/> Não ordenha 08- Tipo de Ordenha: <input type="checkbox"/> manual <input type="checkbox"/> mecânica ao pé <input type="checkbox"/> mecânica em sala de ordenha <input type="checkbox"/> Não ordenha 09- Produção de leite: a) Nº de vacas em lactação: _____ b) Produção diária de leite na fazenda: _____ litros 10- Usa inseminação artificial? <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> usa inseminação artificial e touro <input type="checkbox"/> usa só inseminação artificial 11- Raça predominante - Bovinos: <input type="checkbox"/> zebu <input type="checkbox"/> europeu de leite <input type="checkbox"/> europeu de corte <input type="checkbox"/> mestiço <input type="checkbox"/> outras raças - Bubalinos: <input type="checkbox"/> murrah <input type="checkbox"/> mediterrâneo <input type="checkbox"/> carabao <input type="checkbox"/> jaffarabadi <input type="checkbox"/> outras raças																		
12(a)- Bovinos existentes								12(b)- Bubalinos existentes										
Machos Castrados	Machos inteiros (meses)				Fêmeas (meses)				Machos Castrados	Machos inteiros (meses)				Fêmeas (meses)				
	Total	0-6	6-12	12-24	> 24	0-6	6-12	12-24		> 24	Total	0-6	6-12	12-24	> 24	0-6	6-12	12-24

13- Outras espécies na propriedade: ovinos/caprinos eqüídeos suínos aves comerciais
 cão gato

14- Espécies silvestres em vida livre na propriedade: não tem cervídeos capivaras
 marsupiais (gambá) outras:.....

15- Tem pastagem que faz divisa com mata? não sim

16- Faz testes para diagnóstico de tuberculose? não sim

Regularidade dos testes: uma vez ao ano duas vezes ao ano quando compra animais
 quando exigido para trânsito/eventos/crédito

17- Nos últimos 2 anos houve aquisição de bovinos ou búfalos? não sim,
 foram tuberculinizados () sim () não

Onde/de quem: em exposição em leilão/feira de comerciante de gado diretamente de outras fazendas

18- Local de abate das fêmeas e machos adultos no fim da vida reprodutiva:

na própria fazenda em estabelecimento sem inspeção veterinária
 em estabelecimento de abate com inspeção veterinária não abate

19- Aluga pastos em alguma época do ano? não sim

20- Tem pastos em comum com outras propriedades? não sim

21- Compartilha outros itens com outras propriedades? não insumos equipamentos
 funcionários

22- Existem na propriedade áreas alagadiças às quais o gado tem acesso? não sim

23- A quem entrega leite? cooperativa laticínio direto ao consumidor não entrega

24- Resfriamento do leite: não faz faz **Como:** em resfriador ou tanque de expansão próprio
 em resfriador ou tanque de expansão coletivo

25- A entrega do leite é feita a granel? não sim

26- Produz queijo e/ou manteiga na propriedade? não sim,

- finalidade:** p/ consumo próprio p/ venda
27- Consome leite cru? não sim
28-Tem assistência veterinária? não sim
De que tipo? veterinário da cooperativa veterinário particular

NOME DO VETERINÁRIO _____ ASSINATURA _____

29- INFORMAÇÕES SOBRE OS ANIMAIS TESTADOS				30 - RESULTADOS DO TESTE (1)							
Nº	IDENTIFICAÇÃO Cód. do estudo + N° sequencial (11 dígitos)	E S P E C I E	I D A D E	Tuberculina Aviária			Tuberculina Bovina			ΔB-ΔA	Resultado Final
				A0	A72	ΔA (A72-A0)	B0	B72	ΔB (B72-B0)		
01											
02											
03											
04											
05											
06											
07											
08											
09											
10											
11											
12											
13											
14											
15											
16											
17											
18											
19											
20											
21											
22											
23											
24											
25											
26											

CONTINUA

CONTINUAÇÃO

29- INFORMAÇÕES SOBRE OS ANIMAIS TESTADOS				30 - RESULTADOS DO TESTE (1)							
Nº	IDENTIFICAÇÃO Cód. do estudo + N° sequencial (11 dígitos)	E S P E C I E	I D A D E	Tuberculina Aviaria			Tuberculina Bovina			$\Delta B - \Delta A$	Resultado
				A0	A72	ΔA (A72-	B0	B72	ΔB (B72-B0)		
27											
28											
29											
30											
31											
32											
33											
34											
35											
36											
37											
38											
39											
40											

Códigos e instruções para preenchimento desta tabela

(1) O resultado do Teste Cervical Comparativo (TCC) pode ser Negativo (NEG), Inconclusivo (INC) ou Positivo (POS), de acordo com a tabela abaixo (conforme Artigo 32 do Regulamento PNCEBT):

$\Delta B - \Delta A$	resultado
$\leq 1,9$ mm	negativo
2,0 a 3,9 mm	inconclusivo
$\geq 4,0$ mm	positivo

31- INFORMAÇÕES SOBRE OS ANIMAIS RETESTADOS				32 - RESULTADOS DO RETESTE (1)							
Nº	IDENTIFICAÇÃO Cód. do estudo + N° sequencial (11 dígitos)	E S P E C I E	I D A D E	Tuberculina Aviaria			Tuberculina Bovina			ΔB-ΔA	Resultado
				A0	A72	ΔA (A72-	B0	B72	ΔB (B72-		
1											
2											
3											
4											
5											
6											
7											
8											
9											
10											
11											
12											
13											
14											
15											
16											
17											
18											
19											
20											

Códigos e instruções para preenchimento desta tabela

(1) O resultado do Teste Cervical Comparativo (TCC) pode ser Negativo (NEG), Inconclusivo (INC) ou Positivo (POS), de acordo com a tabela abaixo (conforme Artigo 32 do Regulamento PNCEBT):

ΔB – ΔA	resultado
≤ 1,9 mm	negativo
2,0 a 3,9 mm	inconclusivo
≥ 4,0 mm	positivo