

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA BRUCELOSE E
TUBERCULOSE BOVINA EM PROPRIEDADES FORNECEDORAS
DE LEITE PARA O PROGRAMA “LATICÍNIO ESCOLA” DO
MUNICÍPIO DE BOTUCATU – SP

ANNA PAULA VITIRITO MAURELIO

Botucatu-SP
Dezembro 2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ESTUDO DA SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA BRUCELOSE E
TUBERCULOSE BOVINA EM PROPRIEDADES FORNECEDORAS
DE LEITE PARA O PROGRAMA “LATICÍNIO ESCOLA” DO
MUNICÍPIO DE BOTUCATU – SP

ANNA PAULA VITIRITO MAURELIO

Dissertação apresentada junto ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária para
obtenção do título de Mestre.

Orientador: Professor Adjunto Antonio Carlos Paes
Coorientador: Professora Titular Jane Megid

Anna Paula Vitirito Maurelio

**SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA BRUCELOSE E TUBERCULOSE
BOVINA EM PROPRIEDADES FORNECEDORAS DE LEITE PARA O
PROGRAMA “LATICÍNIO ESCOLA” DO MUNICÍPIO DE BOTUCATU – SP**

COMISSÃO EXAMINADORA

Professor Adjunto Antonio Carlos Paes

Presidente e Orientador

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública - FMVZ – UNESP -
Botucatu

Professor Titular Hélio Langoni

Membro

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública - FMVZ – UNESP -
Botucatu

Professor Doutor Rogério Giuffrida

Membro

Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE).
Campus de Presidente Prudente.

Data da Defesa: 5 de dezembro de 2014

Ao meu marido Wilson Maurelio, pelo amor e apoio durante essa etapa de minha vida e que nunca deixou com que eu desistisse dos meus objetivos, sendo compreensivo e sempre incentivando-me a acreditar que iria dar certo.

“Ser profundamente amado por alguém nos dá força,
Amar alguém profundamente nos dá coragem”
(Lao-Tsé)

Ao meu orientador Antonio Carlos Paes e minha coorientadora Jane Megid, por toda paciência e dedicação prestada para realização desse trabalho e pelos ensinamentos durante essa fase de minha vida.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende
o que ensina.”
(Cora Coralina)

Aos meus pais, Elisabete Vitirito Martinho e Geraldo Martinho, e minha irmã Cíntia Vitirito Martinho por todos os ensinamentos de vida, que contribuíram com a minha formação pessoal e profissional.

Ao meu marido Wilson Maurelio, que sempre me apoiou em todos os momentos, nunca deixando com que eu perdesse o foco ou desistisse, por mais árduo que fosse o caminho a ser trilhado.

A minha grande amiga e parceira Bianca Paola Santarosa, que contribuiu para a conclusão desse trabalho, sempre dando estímulo e dividindo comigo sua sabedoria e experiências.

Ao meu orientador, Antonio Carlos Paes, pelos conhecimentos divididos, paciência, dedicação e carinho a mim destinado. Muito obrigada, você sempre será o meu Mestre.

A minha coorientadora, Jane Megid, por sempre me apoiar e por ter acreditado que tudo iria dar certo, sempre será um exemplo profissional em minha vida. E também pela grande amizade e carinho que sempre demonstrou quando eu mais precisei.

A todos os professores da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, em especial, aos do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, por todo conhecimento passado e momentos de descontração.

A todos os servidores da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, obrigada pelos serviços prestados, sempre que solicitados.

A todos os profissionais e proprietários que disponibilizaram suas propriedades e seus animais para realização das colheitas de materiais para realização do experimento deste projeto.

Aos animais, em especial, os bovinos utilizados no experimento, pois sem eles nada seria possível.

À Prefeitura Municipal de Botucatu por ter apoiado o projeto e viabilizado o contato com os produtores rurais.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de mestrado concedida, possibilitando dedicação exclusiva a este trabalho.

A todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte desta história.

“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram,
mas na intensidade com que acontecem.

Por isso existem momentos inesquecíveis,
coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”

(Fernando Pessoa)

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Interpretação de resultados do TCC, segundo o PNCEBT.....	24
TABELA 2	Propriedades visitadas e resultados dos exames de Tuberculina e soroaglutinação para Brucelose. Botucatu, 2014	27

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Linfonodo pré-escapular tubérculo caseoso com pontos de calcificação.....	29
FIGURA 2	Aderência pulmonar a parede torácica.....	29
FIGURA 3	Tubérculo de 15cm retirado de lobo pulmonar esquerdo, com aspecto caseoso e fibrosado.....	30
FIGURA 4	Tubérculo de 8cm localizado em lobo pulmonar direito, com aspecto caseoso.....	30
FIGURA 5	Linfonodo mesentérico com lesões caseosas.....	31

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	04
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	06
2.1	TUBERCULOSE.....	06
2.2	BRUCELOSE.....	12
2.3	IMPORTÂNCIA DO LEITE COMO VEÍCULO DE DISSEMINAÇÃO.....	16
3	OBJETIVOS.....	17
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1	ASPECTOS ÉTICOS.....	18
4.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	18
4.3	PROPRIEDADES RURAIS	18
4.4	ANIMAIS.....	19
4.5	ESCOLHA DAS PROPRIEDADES.....	19
4.6	AVALIAÇÃO DE CONHECIMENTO E ORIENTAÇÃO AO PRODUTOR.....	19
4.7	TESTES DIAGNÓSTICOS.....	20
4.7.1	Brucelose.....	20
4.7.2	Tuberculose.....	23
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
5	RESULTADOS.....	26
5.1	TESTES DIAGNÓSTICOS DE TUBERCULOSE E BRUCELOSE.....	26
5.2	QUESTIONÁRIO REALIZADO AOS PRODUTORES RURAIS.....	27
5.3	NECROPSIA DOS ANIMAIS POSITIVOS PARA TUBERCULOSE.....	28
6	DISCUSSÃO.....	32
6.1	TUBERCULOSE.....	32
6.2	BRUCELOSE.....	32
6.3	NECRÓPSIA.....	34
6.4	QUESTIONÁRIO REALIZADO AOS PRODUTORES RURAIS.....	37
6.5	LIMITAÇÕES DO PNCEBT.....	37
7	CONCLUSÃO.....	39
8	REFERENCIAS.....	40
9	ARTIGO CIENTÍFICO.....	50
	ANEXOS.....	67
I	QUESTIONÁRIO.....	67

MAURELIO, A.P.V. **Situação epidemiológica da brucelose e tuberculose bovina em propriedades fornecedoras de leite para o programa “Laticínio Escola” do município de Botucatu – SP.** Botucatu, 2014. 67p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

RESUMO

A brucelose e tuberculose são enfermidades infecto-contagiosas de evolução crônica, de caráter zoonótico, que representam grandes prejuízos econômicos à bovinocultura leiteira e saúde pública. Os objetivos deste trabalho foram: estudar a situação epidemiológica destas enfermidades nas propriedades fornecedoras de leite para o Programa Municipal de Botucatu intitulado "Laticínio Escola"; determinar o grau de conhecimento dos pequenos produtores acerca destas doenças por meio de um questionário elaborado para essa finalidade. Ao final do questionário os produtores receberam instruções técnicas sobre os temas abordados e foi realizado um trabalho social de conscientização sobre a importância zoonótica e sanitária. O estudo foi conduzido em 22 pequenas propriedades leiteiras do município de Botucatu-SP, que fornecem leite para creches e escolas municipais. Os testes realizados foram os preconizados pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), que são sorológicos para brucelose e imunoalérgico para tuberculose. Os animais reagentes a ambos os testes foram retirados da propriedade, levados ao Hospital Veterinário da FMVZ/UNESP, campus de Botucatu, para realização de exame necroscópico. O total de animais testados para Tuberculose foi 736, e para Brucelose 512. Encontrou-se pelo menos um bovino positivo para tuberculose em 13,6% (3/22) das propriedades, e para brucelose em 31,8% (7/22). A prevalência das enfermidades observada foi de 0,8% (6/736) e 2,3% (12/512) para tuberculose e brucelose, respectivamente. Os dados deste estudo foram semelhantes aos encontrados em trabalhos regionais da literatura nacional. Portanto, na microrregião de Botucatu-SP, estas enfermidades ainda representam grande relevância sócio-econômica, sanitária e de saúde pública.

Palavras-chave: bovinocultura de leite; Brucelose; prevalência; Tuberculose.

MAURELIO, A.P.V. **Epidemiological situation of bovine brucellosis and tuberculosis in properties that supply milk for the "Dairy School" of Botucatu-SP.** Botucatu, 2014. 67p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

ABSTRACT

Brucellosis and tuberculosis are chronic infectious diseases and considered as zoonosis, which represent large economic losses to dairy cattle and public health. Our objectives were to study the epidemiological situation of these diseases in the properties that supply milk to the Municipal Program of Botucatu entitled "Dairy School"; determine the degree of knowledge of small farmers about these diseases through a questionnaire prepared for this purpose. At the end of the questionnaire the producers received technical instruction on the topics and we performed a social work awareness of zoonotic importance and health. The study was conducted in 22 small dairy farms of Botucatu-SP, which provide milk for kindergartens and public schools. The tests performed were those recommended by the National Program for Control and Eradication of Brucellosis and Tuberculosis (PNCEBT), which are serologic for brucellosis and tuberculosis imunoalergic. Reagents animals to both tests were removed from the property, taken to the Veterinary Hospital of FMVZ/UNESP, Botucatu, to perform necropsies. The total number of animals tested for tuberculosis was 736, and for brucellosis 512. It has been found Brucellosis at least one positive for tuberculosis in 13.6% (3/22) of properties, for brucellosis in 31.8% (7/22). The prevalence of disease observed was 0.8% (6/736) and 2.3% (12/512) for tuberculosis and brucellosis, respectively. Data from this study were similar to those in regional work of the national literature. Therefore, in the micro region of Botucatu, these diseases still represent very important socio-economic, health and public health.

Keywords: brucellosis; dairy cattle; prevalence; tuberculosis.

1 INTRODUÇÃO

O efetivo de bovinos em 2010 teve aumento de 2,1% em relação a 2009 e foi de 209,541 milhões de cabeças. A Região Norte tem apresentado crescimento no rebanho superior às demais regiões desde 2009, revertendo a queda observada em 2007. No Sudeste, o avanço das lavouras de cana e grãos sobre as pastagens em São Paulo contribuiu para a redução da taxa de crescimento do rebanho. A produtividade de leite no Brasil (em litros/vaca/ano) cresceu 12% no período de 2005 a 2010. Ganhos significativos de produtividade ocorreram em todas as regiões, merecendo destaques os crescimentos observados no Sul (19,1%) e no Norte (12,5%) do País (IBGE, 2010).

Em 2010 a produção mundial de leite foi de 695,7 bilhões de litros, dos quais o Brasil contribuiu com 4,42% ou 30,7 bilhões de litros. Entre 2000 e 2010 a produção cresceu em média 4,4% ao ano, a segunda maior taxa anual de crescimento do mundo. O primeiro lugar foi da China, com 17,61% (EMBRAPA, 2011).

O agronegócio leiteiro vem ocupando importante destaque na economia mundial. No Brasil, é um dos mais importantes sistemas agroindustrial devido à alta relevância social. A atividade leiteira é praticada em todo país, em milhões de propriedades rurais, e gera cerca de três milhões de empregos diretos na produção primária e agrega mais de seis bilhões de reais ao valor da produção agropecuária nacional (MÜLLER, 2002).

No Brasil e em outros países da América Latina, onde a febre aftosa está em fase avançada de erradicação, o controle da tuberculose e brucelose está se tornando prioritário, pois se espera que elas sejam as próximas doenças a tornar-se alvo das exigências sanitárias internacionais (LÔBO, 2008). Assim, essas enfermidades devem ter controle prioritário nos sistemas produtivos de bovino. Além dos possíveis prejuízos ao comércio internacional, elas estão amplamente distribuídas no território brasileiro e são enfermidades infecciosas de caráter zoonótico, o que as torna importante problema em saúde pública (VALENTE et al., 2011).

O conhecimento da real situação epidemiológica das enfermidades por estados e regiões é de extrema importância quando se pretende estabelecer um programa de controle e erradicação, pois permite escolher as melhores estratégias e acompanhar o andamento do programa, julgando se há necessidade de promover correções, evitando o desperdício de tempo e recurso (POESTER et al., 2009a).

São enfermidades de notificação obrigatória, da lista B da OIE (World Organization for Animal Health), que designa a lista de enfermidades transmissíveis consideradas importantes sob o ponto de vista sócio-econômico e/ou sanitário a nível nacional, e cujas repercussões no comércio internacional de animais e produtos de origem animal são consideráveis. Estas enfermidades geralmente são objeto de informe anual, ainda que em alguns casos possam ser realizados informes mais frequentes (OIE, 2014).

Foi instituído em 2001 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) o Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT). O objetivo deste programa foi diminuir o impacto dessas zoonoses na saúde humana e animal, além de promover a competitividade da pecuária nacional, e teve como pretensão a erradicação das enfermidades após 20 anos de implementação do programa (BRASIL, 2001). São enfermidades de notificação obrigatória, de acordo com art. 5º, do Decreto 5.741/2006 e a Instrução Normativa 30/2006 do MAPA que disciplina a habilitação de Médicos Veterinários que atuam no setor privado para participarem da execução do PNCEBT.

Educação continuada é a principal diretriz para o sucesso do programa e o primeiro passo nesse sentido é fornecer aos proprietários informações relativas ao caráter zoonótico das enfermidades, ao risco a saúde humana e a importância dos animais como fontes de infecção e responsáveis pela manutenção da enfermidade no rebanho justificando, portanto a necessidade de eliminação dos animais positivos, esclarecendo que, a médio e longo prazo, o saneamento do rebanho é promissor se refletindo em melhoria para a saúde humana e animal e maior produtividade dos animais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tuberculose

O complexo *Mycobacterium tuberculosis* engloba muitas espécies e subespécies causadoras da tuberculose em grande variedade de hospedeiros mamíferos e inclui *Mycobacterium bovis*, o principal causador da tuberculose em bovinos (SMITH et al., 2006).

As micobactérias são bacilos álcool-ácido-resistentes (BAAR) em forma de bastões, aeróbios estritos, não formadores de esporos e imóveis. Espécies individuais diferem em tamanho; *Mycobacterium bovis* e *M. avium* são bacilos delgados e atingem até 4µm de comprimento, enquanto *M. avium* subsp. *paratuberculosis* apresentam bacilos largos e geralmente com menos de 2µm de comprimento. Embora as micobactérias sejam citoquimicamente Gram-positivas, alto conteúdo de ácido micólico e de lipídeos na sua parede celular previnem a entrada de corantes empregados na técnica de coloração de Gram. Os lipídeos da parede ligam-se à fucsina carbólica que não é removida pelo decolorante álcool-ácido usado no método de coloração de Ziehl-Neelsen (ZN), corando-se dessa forma em vermelho (QUINN et al., 2005).

Na pecuária bovina leiteira, a tuberculose constitui um problema muito antigo. Os prejuízos são muito grandes em virtude da drástica diminuição da produção de leite, perda de bezerros e perda com descarte dos animais adultos reagentes positivos (PAES, 2010). A enfermidade também possui importante caráter zoonótico, principalmente pela excreção do bacilo no leite e por secreções nasais, pois mesmo em estágios iniciais da infecção e sem a ocorrência de alterações pulmonares aparentes os animais podem produzir aerossóis infectantes (ACHA & SZYFRES, 2003).

A manifestação clínica em bovinos inclui sintomatologia predominantemente respiratória causada pelo quadro de broncopneumonia crônica, porém podemos observar em menor escala manifestações intestinais, reprodutivas e mastite (RADOSTITS et al., 2007).

O bacilo bovino tem sido diagnosticado como agente causador da tuberculose em 1 a 6% dos casos totais em humanos, tanto na forma pulmonar

como nas extrapulmonares, assumindo caráter de doença profissional em 64% dos casos (ABRAHÃO, 1999; ZANINI, 2001). As infecções humanas por *M. bovis* concentra-se principalmente na região rural. Fatores como desnutrição e síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) são aspectos que facilitam a proliferação do agente, levando a severas manifestações clínicas (MICHAEL et al., 2010).

No Brasil, um estudo realizado em Minas Gerais alerta para o fato de que queijo frescal é manufacturado por 32% das fazendas estudadas, das quais 93% utilizam leite *in natura*. Essa prática implica risco potencial de transmissão de *M. bovis* ao ser humano (GONÇALVES et al., 2003).

Os países que implantaram programas de controle da tuberculose animal ao longo do século passado, com bases em tuberculinização e sacrifício dos animais reagentes, conseguiram reduzir consideravelmente a frequência de animais infectados (ALMEIDA, 2009).

Em 1810, Carmichael constatou que a tuberculose dos gânglios linfáticos cervicais era mais frequente em crianças alimentadas com leite bovino do que nas mantidas com leite materno. Essa suspeita foi fortalecida com o isolamento do bacilo tuberculoso por Koch em 1882. A pasteurização compulsória do leite determinou grande redução na frequência de casos de tuberculose do trato digestivo em populações (GRANGE & YANTES, 1994).

A tuberculose bovina é uma importante zoonose que pode se espalhar entre os humanos por meio da inalação de aerossóis ou pela ingestão de leite não pasteurizado e/ou produtos cárneos crus contaminados (THOEN et al., 2006). Não há registros de infecção humana a partir de uma fonte ambiental direta (BIET et al., 2005).

A tuberculose humana causada por *M. bovis* é conhecida desde o final do século XIX. Em um estudo realizado, Corrêa & Corrêa (1974) analisaram 200 amostras provenientes de pessoas suspeitas de tuberculose, nos quais encontraram sete amostras que foram classificadas como sendo o bacilo bovino, dentre elas quatro eram casos de tuberculose pulmonar e duas tuberculose renal.

Diferenças na apresentação clínica da tuberculose humana relacionada com o *M. bovis* dependem da via de transmissão (MODA et al., 1996). Embora *M. bovis* mostre uma baixa tendência em se reativar, uma vez estabelecido no pulmão ele é tão virulento quanto o bacilo humano (O'REILLY & DABORN, 1995). Em seres humanos, casos de doença pulmonar associadas com cepas bovinas e humanas são indistinguíveis clinicamente, radiologicamente e patologicamente (MODA et al., 1996).

Os sintomas podem incluir febre vespertina, emagrecimento, fadiga, dor no tórax, suores noturnos, astenia, tosse com expectoração e hemoptise (ABRAHÃO, 1999). A tuberculose pulmonar que se desenvolve durante os primeiros cinco anos seguintes à infecção primária é classificada como tuberculose primária. Já as infecções pulmonares diagnosticadas com mais do que cinco anos são classificadas como secundárias e são consideradas mais infecciosas (O'REILLY & DABORN, 1995).

A tuberculose pulmonar causada por este agente é considerada uma doença ocupacional (ABRAHÃO, 1999), de modo que tratadores de rebanhos, ordenhadores, trabalhadores da indústria da carne, veterinários e membros da comunidade rural que vivem em íntimo contato com animais estariam mais expostos à infecção (ABRAHÃO et al., 2005).

Dados do Piedmont Regional Working Group of Bovine Tuberculosis de 1992 apresentados por MODA et al. (1996) mostraram que uma investigação entre veterinários trabalhando com rebanhos infectados identificaram altos índices de tuberculina positiva (45,4%) e tuberculose evidente (4,1%), embora não tenha sido estabelecido se tal infecção estava associada com *M. bovis*.

A via alimentar normalmente resulta em formas extra-pulmonares de tuberculose, podendo se estabelecer nos linfonodos cervicais e menos frequentemente nos axilares, uma condição denominada escrófula, mais comum em crianças que consomem leite não pasteurizado (O'REILLY & DABORN, 1995). Também acomete o trato intestinal, rins, ossos, articulações e sistema nervoso central (MODA et al., 1996). A infecção por meio de feridas da pele causa lesões cutâneas, de tendões e linfonodos (MODA et al., 1996).

A proporção de casos humanos mostra grande variação regional dependendo da presença e extensão da doença na população de bovinos, situação econômica e social, o padrão de higiene alimentar e a aplicação de medidas preventivas (ABRAHÃO, 1999). A incidência do bacilo bovino em humanos é maior nas áreas rurais com rebanhos infectados (MODA et al, 1996).

A transmissão do bacilo a partir de humanos para bovinos é geralmente direta e pela via respiratória, mas a disseminação indireta pela ingestão de forragem e/ou feno contaminado com urina de humanos infectados com lesões renais foi registrado nos Países Baixos e Alemanha (O'REILLY & DABORN, 1995). A transmissão entre seres humanos é um evento raro e ocorre principalmente pela via aerógena, sendo mais importante entre indivíduos imunossuprimidos (ABRAHÃO et al., 2005). Os animais silvestres podem infectar-se a partir dos seres humanos pela via aerógena, assim como os animais domésticos, que também podem se contaminar pelo consumo de leite cru e carne ou vísceras não cozidas (ABRAHÃO, 1999).

Com relação ao leite, sabe-se que a produção de leite de vaca ultrapassou 20 bilhões de litros em 2006, com a maior parte sendo produzida em pequenas propriedades (IBGE, 2008). Por ser tão rico em nutrientes, este produto oferece condições favoráveis a multiplicação de um grande número de micro-organismos do meio ambiente, do próprio animal, do homem e dos utensílios utilizados na ordenha (ABRAHÃO et al., 2005).

O emprego do processo de pasteurização de leite, entretanto, ainda é uma realidade distante em muitos países em desenvolvimento. Estima-se que 90% do leite produzido nos países africanos, da região sub-Saária, são consumidos *in natura* ou em forma de coalhada (ABRAHÃO, 1999).

No Brasil, a proibição da comercialização de leite cru está estabelecida na Lei nº 1.283 de 18/12/1950 e no Decreto nº 30.691, de 29/03/1952. Este decreto determina no seu Art. 486, inciso III que “Só se permite o aproveitamento de leite de vaca, de cabra, da ovelha e de outras espécies, quando (...) não reajam à prova de tuberculose (tuberculina) nem apresentem reação positiva às provas do diagnóstico da brucelose, obedecidos aos dispositivos da legislação em vigor”. O Art. 489 do mesmo decreto ainda

estabelece que “São obrigatórias as provas biológicas para diagnósticos de tuberculose e brucelose, praticadas tantas vezes quantas necessárias nos estabelecimentos que produzem leite. Essas provas só podem ser feitas por veterinário oficial ou por veterinário particular habilitado que obedeça integralmente aos planos oficialmente adotados”.

Em 2002 foi publicada a Instrução Normativa (IN) número 51, revogada pela IN62 em dezembro de 2011. Dentre outras exigências, a IN62 regulamenta a conservação, coleta e transporte de leite cru refrigerado. Preconiza, ainda, que o leite deverá ser refrigerado e atingir a temperatura de 4°C (tanques de expansão) ou 7°C (tanques de imersão), nas propriedades de origem, num período não superior a três horas após o término da ordenha. Também há a permissão de tanques resfriadores coletivos, para atender a demanda dos pequenos produtores (BRASIL, 2011a). Ademais, a IN62 exige que os produtores de leite do Brasil estejam alinhados com as prerrogativas do PNCEBT, o qual determina os métodos de diagnóstico e eutanásia de bovinos e bubalinos acometidos pela tuberculose e/ou brucelose, visando reduzir a prevalência da doença no país (BRASIL, 2006).

Contudo, segundo Nero et al. (2004), a venda ilegal de leite cru no varejo para o consumo humano ainda representa um mercado alternativo importante porque há um consumo bem estabelecido no país, tanto por suas características organolépticas como pelo baixo preço. Segundo estes autores, 35,6 a 42% do leite produzido no Brasil em 1998 e 2001 não foram inspecionados por nenhuma autoridade sanitária federal, estadual ou municipal.

O risco de se contrair *M. bovis* pela ingestão de carne contaminada é relativamente incomum devido à baixa incidência do agente em tecidos musculares e o hábito de não se comer carne crua em muitos países (SALAZAR & GUIMARÃES, 2006). Entretanto, esta fonte não deve ser ignorada, especialmente quando se considera o grande número de abates clandestinos de animais positivos descartados (ABRAHÃO et al., 2005).

Relativo a esta informação, embora o Brasil detenha o maior rebanho bovino comercial do mundo, com aproximadamente 172 milhões de cabeças (IBGE, 2008), sendo o principal exportador de carne bovina *in natura*, estima-

se que o abate clandestino coloque no mercado varejista cerca de 30% da carne bovina comercializada (REIS et al., 2001), podendo chegar a 60% em locais com menor fiscalização (ABRAHÃO et al., 2005).

As principais causas de tuberculose associada a *M. bovis* atualmente, segundo THOEN et al. (2006) estão associadas à: re-emergência desta infecção em humanos em regiões onde a tuberculose bovina ainda é prevalente; ocorrência da doença em função de reativação ou infecção primária em pacientes imunossuprimidos (HIV positivos, por exemplo), com surtos de cepas resistentes; epizootias em animais domésticos e silvestres que podem transmitir a infecção para o ser humano e forma respiratória adquirida como doença ocupacional em trabalhadores de fazendas e da indústria da carne.

Dados sobre a prevalência da tuberculose humana causada pelo *M. bovis* são desconhecidos em muitas regiões (ABRAHÃO, 1999). No Brasil, estima-se que ocorreram 80.000 novos casos de tuberculose em humanos em 2007 (CIMIERI, 2009). Dados da Organização Mundial da Saúde estimam que a infecção por *M. bovis* possa ser responsável por cerca de 5% dos casos de tuberculose humana no país.

A maioria dos casos de tuberculose zoonótica registrados em pacientes da área urbana e rural, devida ao agente etiológico *Mycobacterium bovis*, deve-se ao consumo de leite e derivados crus (GUIMARÃES & LANGONI, 2009).

M. bovis não resiste a fervura ou a pasteurização do leite. No entanto, em produtos lácteos produzidos de leites originários de vacas naturalmente infectadas ou experimentalmente contaminados, o micro-organismo persistiu viável por 153 dias em, 47 e 62 dias em queijos respectivamente dos tipos Camembert e Cheddar e 14 dias no iogurte (MITSCHERLICH & MARTH, 1984).

Aproximadamente 1% das vacas tuberculosas eliminam o bacilo no leite, de forma intermitente (GRANGE e YANTES, 1994). A mastite tuberculosa é de difícil diagnóstico, pois dependendo do estágio da doença não altera as características físicas ou organolépticas do leite. *M. bovis* raramente causa mastite (CORRÊA e CORRÊA, 1992), e não responde a tratamentos com antibióticos (PHILPOT e NICKERSON, 2002).

Estes resultados são muito preocupantes, especialmente se considerarmos que o leite é a principal via de transmissão de *M. bovis* para os humanos. Pardo et al. (2001) analisaram 780 amostras de leite de 52 vacas positivas ou suspeitas ao teste tuberculínico, provenientes de 6 propriedades produtoras de leite no Estado de São Paulo. Foram isoladas micobactérias em 78 amostras (10%) de 19 animais (36,5%) que continham *M. bovis* (5,3%), *M. avium* (5,3%), *M. fortuitum* (10,5%) e *Mycobacterium* spp. (78,9%).

Franco et al. (2013) realizaram isolamento micobacteriano em tanques de expansão e leite informal e obtiveram isolamento micobacteriano em 24 (8%) das 300 amostras processadas, representados por 15 espécies do gênero *Mycobacterium*, dentre os quais apenas um pertencia ao complexo *M. tuberculosis*, a subespécie *M. bovis* subsp *bovis*. A maioria dos estudos investigando a detecção de *Mycobacterium* spp. em leite tem utilizado amostras experimentalmente inoculadas (PÉREZ et al., 2002; DIB et al., 2006; MESSELHÄUSSER et al., 2012), em detrimento do diagnóstico de micro-organismos ambientais ou decorrentes de infecção natural.

2.2 Brucelose

As bactérias do gênero *Brucella* são pequenas bactérias Gram-negativas (0,6 x 0,6 x 1,5 µm), cocobacilares e imóveis. Como não se descoram pelo ácido acético a 0,5% na técnica de coloração de Ziehl-Neelsen modificado (ZNM), são classificadas como ZNM-positivos. São aeróbicas, capnofílicas e catalase-positivas. Apresentam reação positiva à oxidase, com exceção de *B. ovis* e de *B. neotomae*. Todas as outras espécies de *Brucella* são urease-positivas, exceto *B. ovis*. Alguns biotipos de *B. abortus* e *B. ovis* requerem 5 a 10% de CO₂ para isolamento primário. Meios de cultura necessitam ser enriquecidos com sangue ou soro para o cultivo (QUINN et al., 2007).

Atualmente são reconhecidas 10 espécies de *Brucella*, classificadas com base em seus hospedeiros preferenciais. A *B. melitensis* acomete preferencialmente caprinos e ovinos; *B. abortus* bovinos e bubalinos; *B. suis* suídeos, lebres, renas e roedores; *B. neotomae* rato do deserto; *B. canis* caninos; *B. ovis* ovinos; *B. ceti* cetáceos; *B. pinnipedialis* pinípedes e *B. microti*

camundongo de campo (POESTER, 2009). Recentemente foi isolada e caracterizada por SCHOLZ et al. (2010) *Brucella inopinata* em infecção de implante mamário em humano e Eisenberg et al. (2012) isolaram de sapo uma bactéria semelhante a *B. inopinata* que potencialmente pode ser uma nova espécie de *Brucella* spp.

As brucelas não são espécie-específicas, portanto podem ser transmitidas a outras espécies animais (POESTER, 2009).

As espécies *B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus*, *B. canis* e *B. ovis* possuem biotipos e são classificadas de acordo com a caracterização fenotípica, sorotipagem, fagotipagem, sensibilidade a corantes, necessidade de CO₂ para crescimento, produção de H₂S, multiplicação na presença de tionina e fucsina básica e aglutinação com anti-soros monoespecíficos (A, M, R) (CLOECKAERT & VIZCAÍNO, 2004; POESTER, 2009). *B. abortus* possui sete biotipos, designados 1 a 6 e 9; *B. melitensis* três biotipos 1 a 3 e *B. suis* cinco biotipos designados de 1 a 5. A diferenciação dessas variantes é de grande importância epidemiológica e em menor extensão quanto à gravidade da doença em seres humanos (CORBEL et al., 2006).

A brucelose é uma zoonose de âmbito internacional de extrema relevância em termos de saúde pública. A doença, em humanos, já foi identificada em todo o mundo, mas especialmente na bacia do Mediterrâneo, na península arábica, no subcontinente indiano, e partes do México, da América Central e do Sul.

Atualmente e de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), julga-se que, mesmo nos países desenvolvidos, a verdadeira incidência da brucelose não é precisa devido à falta de diagnósticos precisos e a não notificação de casos, que deveriam ser de caráter compulsório. A incidência humana varia de acordo com a densidade populacional dos rebanhos locais, o grau de endemia animal, o nível socioeconômico e os hábitos alimentares da população (CARVALHO et al., 1995).

Além da acentuada assimetria regional, a brucelose também apresenta disparidade na distribuição por sexos, constatando-se maior incidência no sexo masculino, com uma razão de 2:1, com principal faixa etária dos 55 aos 64

anos, sendo rara na infância (provavelmente, por menor exposição deste grupo etário à contaminação cutânea e respiratória). Aparentemente, é uma zoonose dos meses de primavera, com um pico de diagnóstico de novos casos nos meses de abril, maio e junho, coincidindo com o aumento do número de partos animais (em especial dos pequenos ruminantes) e, também, com o aumento da quantidade de leite cru disponível para consumo (PESSEGUEIRO, 2003).

Nos animais, a brucelose é caracterizada por uma infecção de caráter crônico e persistente. A localização da brucela preferencialmente em órgãos reprodutores é responsável pelas principais manifestações clínicas, que são esterilidade e abortamento (YOUNG, 1983). As brucelas podem ser encontradas em grande quantidade no leite, urina e produtos de abortamento oriundo de animais infectados. Conseqüentemente, a brucelose tornou-se uma doença ocupacional para agricultores, veterinários, trabalhadores dos centros de abate e técnicos de laboratório (YOUNG, 1975).

As vias de transmissão para a espécie humana incluem o contato direto com animais ou o contato com as suas secreções, por meio de soluções de continuidade cutâneas, aerossóis contaminados, inoculação no saco conjuntival ou ingestão de produtos não pasteurizados, em torno de 25% dos casos (SYRJAMAKI, 1984). Neste último caso, a brucela pode permanecer viável de duas semanas até três meses (CARVALHO, 1995), por isso, a ingestão de produtos lácteos contaminados é considerada a via de transmissão mais importante para humanos. Os principais alimentos implicados na transmissão de *Brucella abortus* aos humanos são leite cru e queijos processados com leite cru (LANGONI et al., 2000; NAMIDURU et al., 2003). O consumo de produtos lácteos e queijo do México implicaram em 45% dos casos humanos reportados na Califórnia de 1973 a 1992 (CHOMEL et al., 1994).

A ingestão de carne é uma via de transmissão pouco habitual, devido à baixa concentração do micro-organismo na musculatura (ENRIGHT, 1990). Em temperaturas abaixo de 5° C, o seu crescimento e multiplicação são inibidos, mas persistem mesmo a temperaturas de congelamento. Outro condicionante da viabilidade da *Brucella* é a acidez, sendo a bactéria inativada em pH inferior a 4.2. É inativada em 15 segundos à temperatura de 72° C e em três minutos a

62-63° C (pasteurização). No entanto, em zonas endêmicas, é preconizado o uso de temperaturas mais elevadas (85° C), para garantir a inocuidade, dado que o período de tempo decorrido desde a obtenção do produto e o seu processamento pode ser grande e a sua conservação insuficiente, permitindo, dessa forma, proliferação elevada das bactérias. A presença de *Brucella* em queijo curado permanece controversa. Apesar de alguns autores terem identificado bactérias viáveis em queijos até 100 dias (CARVALHO, 1983) parece ser aceitável considerar 60 dias de cura como tempo suficiente para garantir a inocuidade do produto.

Outra das formas de apresentação de queijo, o requeijão se mostrou seguro quando obtido pela acidificação do leite. No entanto, se obtido do leite coalhado com coalho, as brucelas podem estar viáveis por até 30 dias (CARVALHO, 1983).

Há outras formas de transmissão humana possíveis, mas muito improváveis, salientando-se a contaminação dos vegetais por fezes e urina de animais infectados (CARVALHO, 1983). A transmissão inter-humana é rara. Todavia, foram identificados casos de transmissão sexual, intrauterina e por aleitamento materno (RUBIN et al., 1991; BARNETT, 1996).

A brucelose tem impacto importante no mundo inteiro sobre a saúde humana e a indústria animal. Na maioria dos países, a brucelose é uma doença de notificação obrigatória (PAHO, 2000).

De acordo com a Portaria do Ministério da Saúde nº 104, de 25 de janeiro de 2011, os surtos de brucelose, assim como os surtos de outras doenças de veiculação hídrica e alimentar, são enquadrados como eventos de potencial relevância em saúde pública quando existe alteração no padrão epidemiológico da doença (BRASIL, 2011b).

Dessa forma, no Brasil, quanto à notificação, não é obrigatória quando ocorrem casos isolados, mas na vigência de surtos, deve ser notificada, realizada a investigação epidemiológica e adotadas as medidas de controle indicadas (BRASIL, 2010).

No entanto, no estado do Tocantins (2010), há determinação para que todos os casos suspeitos de brucelose humana sejam notificados, conforme o

Protocolo de Direcionamento para Suspeita Clínica, Diagnóstico, Tratamento e Acompanhamento dos Casos de Brucelose Humana. Este documento objetiva orientar os profissionais da rede estadual de atenção do SUS e das áreas técnicas de vigilância estadual para o manejo dos casos em sua área de abrangência.

B. abortus, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis* e brucelas de mamíferos marinhos são considerados importantes patógenos humanos. Nos seres humanos, brucelose pode ser uma enfermidade séria, debilitante e, por vezes, doença crônica que pode afetar uma variedade de órgãos. A maioria dos casos ocorre devido à exposição ocupacional ou a ingestão de produtos lácteos não pasteurizados (ACHA E SZYFRES, 2003; MEGID et al., 2010).

A brucelose é caracterizada como uma enfermidade de caráter febril, com evolução aguda ou subaguda, geralmente marcado por febre intermitente acompanhada por mal-estar, anorexia, prostração, e que, na ausência de um tratamento específico, pode persistir durante semanas ou meses. Em geral, alguns sinais mais específicos podem ocorrer, porém a hepatoesplenomegalia e linfadenomegalia presentes são extremamente inespecíficos e podem ocorrer em diversas enfermidades. A fase aguda pode progredir para uma crônica com recaída, levando a um quadro denominado "síndrome da fadiga crônica" (CORBEL et al., 2006).

O período de incubação é de 1-3 semanas, podendo se estender até vários meses. *B. melitensis* é a causa mais importante da brucelose humana em todo o mundo, e está associada com infecção aguda, que apresenta manifestações clínicas em um período inferior a dois meses, enquanto que a infecção com outras espécies de *Brucella* é geralmente subaguda, manifestando clínica entre dois meses a um ano ou crônica, que inicia os sintomas com mais de um ano pós infecção (CORBEL, 2006; MEGID et al., 2010).

3 OBJETIVOS

- determinar a situação epidemiológica da Brucelose e Tuberculose no rebanho bovino leiteiro do município de Botucatu-SP por meio de testes diagnósticos preconizados pelo PNCEBT;
- avaliar o conhecimento e orientar os produtores acerca dessas enfermidades e dos riscos à saúde humana.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP-Botucatu, sob o protocolo nº 166/2012.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Neste estudo foi avaliada a prevalência de brucelose e tuberculose bovina, em propriedades fornecedoras de leite para o programa “Laticínio Escola” do município de Botucatu-SP, utilizando exame sorológico para brucelose e imunoalérgico para tuberculose.

Foi avaliado o conhecimento dos produtores rurais acerca destas enfermidades e questões sobre manejo e manipulação dos animais e seus subprodutos.

4.3 PROPRIEDADES RURAIS

O estudo foi conduzido em pequenas propriedades rurais do município de Botucatu-SP, inserido no maior mercado nacional consumidor do produto, a região Sudeste. Utilizaram-se 22 propriedades, onde todos os animais foram testados, com exceção dos menores de dois meses de idade e vacas no periparto.

4.4 ANIMAIS

Foram utilizados animais da raça Holandesa, Girolanda, Jersey ou mestiças com aptidão leiteira, com produção média de 10 a 20 litros/dia distribuídas pelo município de Botucatu.

4.5 ESCOLHA DAS PROPRIEDADES

Foram selecionadas 22 propriedades vinculadas ao Projeto Municipal denominado “Laticínio Escola”. Este projeto é uma parceria entre a Prefeitura Municipal de Botucatu, a Secretaria Estadual de Agricultura e Abastecimento, representada pela Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI), a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, a Associação Leite São Paulo e os produtores rurais de Botucatu. Esse projeto visa agregar valor à produção e abastecer as creches, escolas, asilos e outras instituições da cidade e é um componente importante na estratégia de estruturação da inspeção sanitária municipal, já que se fazem necessárias atividades de formação continuada dos produtores rurais, garantindo sempre a qualidade do leite, além de servir como um local de ensino, pesquisa e extensão, onde os produtores e estudantes terão aulas práticas com orientação dos professores.

4.6 AVALIAÇÃO DE CONHECIMENTO E ORIENTAÇÃO AO PRODUTOR

Realizou-se um questionário ao produtor a fim de obter o conhecimento acerca destas enfermidades e seu risco à saúde pública (Anexo 1). Com base no conhecimento do produtor foi realizada orientação técnica sobre todos os tópicos presentes no questionário, informações adicionais sobre as

enfermidades e como adotar medidas sanitárias de prevenção e controle da Brucelose e Tuberculose.

4.7 TESTES DIAGNÓSTICOS

4.7.1 Brucelose

Provas Sorológicas

Para a realização das provas sorológicas, foram utilizados antígenos adquiridos junto ao Escritório de Defesa Agropecuária na cidade de Botucatu-SP.

Prova do Antígeno Tamponado Acidificado (ATA)

Foram realizadas com base na metodologia do PNCEBT (BRASIL, 2006), utilizando-se antígeno constituído por suspensão celular inativada de *B. abortus* (amostra 1119-3), na concentração de 8%, pH 3,65, corado com rosa bengala.

O soro e o antígeno permaneceram em temperatura ambiente por 30 minutos antes da realização da prova. Em placa quadriculada padrão foi depositado 30 μ L do soro teste e ao seu lado 30 μ L do antígeno, que foram homogeneizados com auxílio de um bastão de vidro, formando círculos de aproximadamente 2cm de diâmetro. A placa foi agitada com movimentos oscilatórios, numa frequência de aproximadamente 30 movimentos por minuto, de modo a permitir a mistura soro-antígeno. A placa foi agitada continuamente por 4 minutos, e então realizada a leitura em caixa de fundo escuro.

Os resultados foram interpretados a partir da reação de aglutinação, indicados pela formação de grumos nos animais positivos e ausência dos mesmos nos animais negativos.

Soroaglutinação lenta em tubos (SAL)

A metodologia foi baseada na técnica descrita pelo PNCEBT (BRASIL, 2006). Utilizou-se antígeno constituído de suspensão inativada de *B. abortus* amostra (1119-3), na concentração de 4,5%.

O soro e o antígeno permaneceram por 30 minutos em temperatura ambiente antes da realização da prova. O antígeno para soroaglutinação lenta em tubos foi diluído 100 vezes em solução salina a 0,85% contendo 0,5% de fenol, sendo a concentração final de 0,045%.

Utilizaram-se tubos de vidro dispostos em bancada apropriada, sendo colocado no primeiro tubo 0,08mL, no segundo tubo 0,04mL, no terceiro 0,02, no quarto 0,01mL do soro testado. Esses tubos foram acrescidos de 2mL do antígeno diluído 1:100 (0,045% de células) em salina fenicada (0,5% de fenol).

Os tubos foram homogeneizados e as estantes com as amostras incubadas em estufa à temperatura de 37°C por um período de 48 horas, após o qual foi realizada a leitura.

Foi considerada como reação completa aquela em que o sobrenadante da mistura soro-antígeno apareceu translúcido, com formação de película no fundo do tubo e com agitação suave se observou presença de grumos que não se rompiam; reação incompleta, quando o sobrenadante estivesse parcialmente translúcido, com formação de película no fundo do tubo e com agitação suave quando se observou a presença de grumos que não se rompiam; reação negativa, quando o sobrenadante apareceu turvo e agitação suave não revelou grumos. Foram utilizados soros positivos e negativos como controle.

2-Mercaptoetanol (2-ME)

A metodologia foi baseada na técnica descrita pelo PNCBET (BRASIL, 2006).

O antígeno para soroglutinação lenta em tubos foi diluído 50 vezes em solução salina a 0,85% sem adição de fenol, sendo a concentração final de 0,09%. A solução de 2 ME a 0,1 M foi preparada misturando-se 7,8 mL de 2-ME a 992,20mL de solução salina 0,085% sem fenol, ou volumes menores, proporcionalmente.

Foram utilizados tubos de vidro dispostos em bancada apropriada, sendo colocado no primeiro tubo 0,08mL, no segundo tubo 0,04mL, no terceiro 0,02, no quarto 0,01mL do soro a ser testado. Esses tubos foram acrescidos de 1mL solução de 2-ME 0,1M (diluído em salina sem fenol). As misturas foram homogeneizadas e as estantes com as amostras deixadas em repouso durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Após 30 minutos foi adicionado a cada tubo da fileira 1mL do antígeno diluído 1:50 (0,09% de células) em solução salina fisiológica (sem fenol), sendo a concentração final do antígeno na solução de 0,045% e do 2-ME de 0,05M.

As misturas foram homogeneizadas e incubadas à temperatura de 37°C por um período de 48 horas, após o qual foi realizada a leitura dos mesmos.

Foi considerada como reação completa aquela em que o sobrenadante da mistura soro-antígeno apareceu translúcido, com formação de película no fundo do tubo e com agitação suave se observou presença de grumos que não se rompiam; reação incompleta, quando o sobrenadante estivesse parcialmente translúcido, com formação de película no fundo do tubo e com agitação suave quando se observou a presença de grumos que não se rompiam; reação negativa, quando o sobrenadante apareceu turvo e agitação suave não revelou grumos. Foram utilizados soros positivos e negativos como controle.

Os animais reagentes inconclusivos foram submetidos ao segundo exame sorológico após 60 dias. Os que apresentaram resultado inconclusivo novamente foram considerados positivos.

Os animais reagentes positivos foram retirados da propriedade no prazo de sete dias e conduzidos ao Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da UNESP - campus de Botucatu, por

ambulância da mesma instituição. Foram realizadas eutanásia e exames necroscópicos.

4.7.2 Tuberculose

Diagnóstico Alérgico

A metodologia foi baseada na técnica descrita pelo PNCEBT (BRASIL, 2006). Utilizaram-se tuberculinas *Purified Protein Derivative* (Derivado Proteico Purificado - PPD) bovina e aviária, produzida segundo as normas do MAPA. Foram adquiridas junto ao Escritório de Defesa Agropecuária na cidade de Botucatu-SP.

As normas do PNCBT permitem a realização de três testes de tuberculinização intradérmica em bovinos. Teste da prega ano caudal (TPC), que é indicado apenas para rebanhos bovinos de corte; teste cervical simples (TCS) e teste cervical comparativo (TCC) que é o teste confirmatório utilizado em animais reagentes ao TCS e TPC.

Utilizaram-se o TCC em todos os animais testados. Para o TCC, as tuberculinas foram inoculadas por via intradérmica na dosagem de 0,1mL, sendo o PPD aviário inoculado cranialmente e o PPD bovino caudalmente.

A inoculação da tuberculina PPD aviária foi realizada na região cervical, na junção do terço anterior e do terço médio e a distância igual das bordas superior e inferior do pescoço, ou escapular, à frente da espinha da escápula, e a 20cm acima da cernelha. A tuberculina PPD bovina foi inoculada na região cervical, na junção do terço médio e terço posterior e a distância igual das bordas superior e inferior do pescoço, ou escapular atrás da espinha da escápula, e a 20cm da cernelha, havendo distância mínima de 15 a 20cm entre as duas inoculações.

Os locais foram demarcados por tricotomia, evitando áreas com lesão ou nódulos de ectoparasitas. A espessura da dobra da pele foi determinada com o auxílio de cutímetro antes da inoculação. As medidas da dobra da pele do local

da inoculação da tuberculina PPD aviária e da tuberculina PPD bovina foram anotadas nos respectivos campos no formulário para exame de brucelose e tuberculose.

Leitura e interpretação dos resultados

Após 72 ± 6 horas da inoculação, foi realizada nova medida da dobra da pele no local de inoculação da tuberculina PPD aviária e da tuberculina PPD bovina, sendo os resultados anotados nos respectivos campos do formulário para exame de brucelose e tuberculose.

O aumento da espessura da dobra da pele foi calculado da seguinte maneira: da medida da dobra da pele 72 horas após a inoculação, subtraiu-se a medida da dobra da pele tomada no dia da inoculação para a tuberculina PPD aviária (ΔA) e a tuberculina PPD bovina (ΔB). Os resultados foram anotados nos respectivos campos no formulário para exame de brucelose e tuberculose. A diferença de aumento da dobra da pele provocado pela inoculação da tuberculina PPD bovina (ΔB) e da tuberculina PPD aviária (ΔA) foi calculada subtraindo-se ΔA de ΔB . Os resultados das diferenças ($\Delta B - \Delta A$) foram interpretados de acordo com os critérios definidos pelo Regulamento Técnico do PNCEBT.

Tabela 1. Interpretação de resultados do TCC, segundo o PNCEBT.

	$\Delta B - \Delta A$	Interpretação
ΔB	-	NEGATIVO
ΔB	< 0	NEGATIVO
ΔB	0,0 a 1,9	NEGATIVO
ΔB	2,0 a 3,9	INCONCLUSIVO
ΔB	$\geq 4,0$	POSITIVO

Os animais reagentes inconclusivos foram submetidos ao segundo TCC em 60 dias. Os animais que apresentaram resultado inconclusivo novamente foram considerados positivos.

Retirada dos animais positivos das propriedades

Os animais reagentes positivos foram retirados da propriedade no prazo de sete dias e conduzidos ao Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da UNESP - campus de Botucatu, por ambulância da mesma instituição. Foram realizados eutanásia e exames necroscópicos.

Foi realizada eutanásia dos animais positivos utilizando-se metodologia química recomendada pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) em guia brasileiro de boas práticas para a eutanásia de animais, resolução nº 714, publicada em 20 de junho de 2002 (CFMV, 2002). Realizado inicialmente sedação com xylazina 20 mg para cada 100 kg de peso vivo por via intramuscular profunda, seguida de tiopental na dosagem de 1 grama para cada 100 kg de peso vivo por via intravenosa e cloreto de potássio a 19,1% na dosagem de 19.100 mg para cada 100 kg de peso vivo, também por via intravenosa.

4.8 Análise estatística

Estatísticas descritivas foram produzidas para caracterizar a população de rebanhos e animais incluídos neste estudo. As prevalências de brucelose e tuberculose em nível de rebanho (porcentagem de rebanhos com pelo menos um animal positivo) e animais (porcentagem de animais positivos dentro de cada rebanho). Também foi determinada a porcentagem de respostas fornecidas pelos produtores.

5 RESULTADOS

5.1 Testes diagnósticos de Brucelose e Tuberculose

Visitaram-se 22 propriedades neste estudo, onde se realizaram testes diagnósticos em 736 animais para Tuberculose e em 512 animais para Brucelose. Os resultados estão expressos na Tabela 2. Encontraram-se 36,4% (8/22) das propriedades com positividade a uma das duas enfermidades. Para a Tuberculose, 13,6% (3/22) das propriedades havia bovinos positivos, e para Brucelose 31,8% (7/22). Dos animais testados para Tuberculose encontraram-se prevalência de 0,8% (6/736) e 2,3% (12/512) para Brucelose.

Tabela 2. Propriedades visitadas e resultados dos exames de Tuberculina e soroaglutinação para Brucelose. Botucatu, 2014.

Propriedade Rural	Quantidade de animais testados		Reagentes ao teste de Tuberculina	Reagentes aos testes sorológicos de Brucelose	Total de animais retirados da propriedade
	Brucelose	Tuberculose			
1	11	18	0	0	0
2	19	26	0	0	0
3	45	67	0	0	0
4	22	32	1	1	2
5	13	15	0	0	0
6	52	84	1	0	1
7	12	27	4	2	4
8	33	59	0	0	0
9	14	17	0	0	0
10	26	32	0	0	0
11	14	18	0	0	0
12	13	26	0	0	0
13	3	3	0	0	0
14	15	19	0	0	0
15	54	62	0	2	2
16	28	38	0	0	0
17	21	27	0	1	1
18	31	54	0	0	0
19	8	10	0	2	2
20	29	37	0	0	0
21	10	14	0	1	1
22	39	51	0	3	3
TOTAL	512	736	6	12	16

5.2 Questionário realizado aos produtores rurais

A partir do questionário (Anexo 1) aplicado aos produtores rurais obtiveram-se as seguintes informações:

- 81,8% (18/22) dos produtores criavam gado leiteiro há mais de 10 anos;

- 72,7% (16/22) dos produtores tinham a produção leiteira como única fonte de renda;
- 90,9% (20/22) das propriedades realizavam ordenha manual para extração do leite;
- 95,4% (21/22) dos produtores já ouviram falar sobre Brucelose bovina;
- 59,1% (13/22) dos produtores possuíam conhecimento do caráter zoonótico a Brucelose bovina;
- 59,1% (13/22) dos produtores manipulavam ou já havia manipulado feto e restos placentários sem a utilização de luvas;
- 95,5% (21/22) dos produtores consumiam leite *in natura*;
- 86,4% (19/22) dos produtores realizavam processamento de queijo na propriedade;
- 86,36% (19/22) dos produtores já ouviram falar sobre Tuberculose bovina;
- 27,3%% (6/22) dos produtores possuíam conhecimento do caráter zoonótico a Tuberculose bovina;
- 18,2% (4/22) das propriedades possuíam assistência veterinária periódica;
- 86,4% (19/22) dos produtores nunca realizaram testes diagnósticos de Brucelose e Tuberculose;

5.3 Necropsia dos animais positivos para Tuberculose

Ao exame necroscópico dos animais positivos para Tuberculose, observaram-se lesões características em pulmão e linfonodos conforme ilustrado nas Figuras 1 a 5. Notaram-se tubérculos de diversos tamanhos, com conteúdo caseoso, pontos de calcificação, diversos pontos de aderência pulmonar à cavidade torácica e fibrose.



Figura 1. Linfonodo pré-escapular tubérculo caseoso com pontos de calcificação. Serviço de Enfermidades Infecciosas dos Animais do Depto. de Higiene Veterinária e Saúde Pública da FMVZ/UNESP, Botucatu.



Figura 2. Aderência pulmonar à parede torácica. Serviço de Enfermidades Infecciosas dos Animais do Depto. de Higiene Veterinária e Saúde Pública da FMVZ/UNESP, Botucatu.



Figura 3. Tubérculo de 15cm retirado de lobo pulmonar esquerdo, com aspecto caseoso e fibrosado. Serviço de Enfermidades Infecciosas dos Animais do Depto. de Higiene Veterinária e Saúde Pública da FMVZ/UNESP, Botucatu.

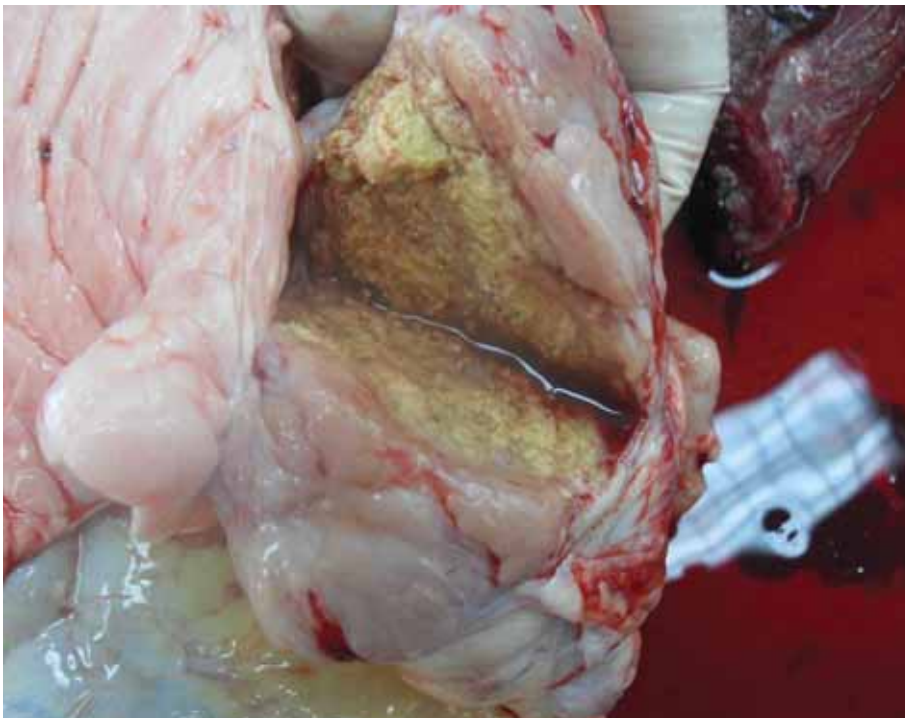


Figura 4. Tubérculo de 8cm localizado em lobo pulmonar direito, aspecto caseoso. Serviço de Enfermidades Infecciosas dos Animais do Depto. de Higiene Veterinária e Saúde Pública da FMVZ/UNESP, Botucatu.



Figura 5. Linfonodo mesentérico com lesões caseosas. Serviço de Enfermidades Infecciosas dos Animais do Depto. de Higiene Veterinária e Saúde Pública da FMVZ/UNESP, Botucatu.

6 DISCUSSÃO

6.1 Tuberculose

Neste trabalho, encontrou-se prevalência de 0,8% de animais reagentes ao teste de tuberculose, não diferindo da situação epidemiológica nacional constatada entre 1989 e 1998 (BRASIL, 2006). A tuberculose se mostrou presente na população estudada no presente estudo, mas não em níveis alarmantes. No entanto, tratando-se de enfermidade de caráter crônico, infecto-contagiosa e com grande poder de disseminação entre os animais, qualquer foco encontrado na região pode se tornar problema sanitário e sócio-econômico, com proporções muito maiores do que os dados observados.

Em 1999, no Triângulo Mineiro, examinaram-se 1.600 propriedades e 23.000 animais. Constatou-se prevalência de 0,8% de bovinos infectados e 5% de propriedades com animais reagentes ao teste imunoalérgico. Outro estudo sobre a tuberculose bovina foi realizado em 2004, no Distrito Federal, com o objetivo de determinar a prevalência da doença e das características produtivas do rebanho bovino na região. O Distrito Federal possui um rebanho bovino de cerca de 120.000 cabeças, das quais foram amostradas 2.019 em 278 propriedades, observando-se prevalência de 0,4% de propriedades positivas e 0,03% de bovinos positivos (BRASIL, 2006).

6.2 Brucelose

Neste estudo, encontrou-se prevalência de 2,3% (12/512) de animais e 31,6% (7/22) de focos positivos para Brucelose bovina, enquanto Kuroda et al. (2004) descreveram prevalência de 42,7% de focos e 3,6% para animais na microrregião da Serra de Botucatu, mostrando menores índices de positividade na população testada da mesma região.

Em 2009 foram concluídos estudos de prevalência da brucelose bovina em 15 unidades federativas (POESTER et al., 2009b), com os seguintes

resultados de prevalência para focos e animais respectivamente: Bahia com 4,2% e 0,66% (ALVES et al., 2009); Goiás com 17,5% e 3% (ROCHA et al., 2009); Mato Grosso com 41,2% e 10,2% (NEGREIROS et al., 2009); Rio de Janeiro com 15,4% e 4,1% (KLEIN-GUNNEWIEK et al., 2009); Santa Catarina com 0,32% e 0,06% (SIKUSAWA et al., 2009); Tocantins com 21,2% e 4,4% (OGATA et al., 2009); Distrito Federal com 2,5% e 0,16% (GONÇALVES et al., 2009a); Minas Gerais com 6,0% e 1,1% (GONÇALVES et al., 2009b); Rio Grande do Sul com 2,1% e 1,0% (MARVULO et al., 2009); São Paulo com 9,7% e 3,8% (DIAS et al., 2009a); Espírito Santo com 9,0% e 3,5% (AZEVEDO et al., 2009); Mato Grosso do Sul com 41,5% e 12,6% (CHATE et al., 2009); Paraná com 4,0% e 1,7% (DIAS et al., 2009b); Rondônia com 35,2% e 6,2% (VILLAR et al., 2009) e Sergipe com 12,6% e 3,4% (SILVA et al., 2009).

A presença de elevado percentual de rebanhos infectados na região estudada é preocupante especialmente por se caracterizar predominantemente por pequenos produtores e propriedades de subsistência.

6.3 Necropsia

As lesões necroscópicas encontradas nos animais positivos ao teste imunoalérgicos foram sugestivas de tuberculose, condizendo com os dados encontrados na literatura. Conforme descrito por Menin et al. (2013), que analisaram 247 animais positivos ao teste de tuberculina, 92% apresentavam alguma sintomatologia clínica evidente, porém encontraram-se extensas lesões características no exame *post-mortem*. Segundo estes autores, a ausência de sinais clínicos não exclui a possibilidade de o animal estar infectado pelo bacilo da tuberculose, o que é comprovado pelo teste imunoalérgico e reafirmado pela necropsia. Isto corrobora com os achados neste trabalho, que de quatro animais positivos ao teste, nenhum deles manifestava qualquer sinal clínico e todos demonstraram alterações necroscópicas.

A maior incidência de lesões pulmonares e em linfonodos satélites se deve ao fato da doença respiratória ser a forma mais frequentemente observada, visto que a inalação é a principal porta de entrada do microorganismo. O complexo primário em geral, localiza-se nos pulmões com envolvimento de linfonodos mediastínicos ou bronquiais (PAES, 2010).

O aspecto da lesão pulmonar varia com o tempo de evolução da lesão. Inicialmente há formação de pequenos nódulos branco-amarelados únicos ou múltiplos não encapsulados (WHIPPLE et al., 1996). Estes nódulos possuem o centro necrótico amarelado e caseoso e os mais antigos podem ranger ao corte devido à calcificação. O tamanho das lesões pulmonares pode variar de acordo com a evolução, de milímetros a cerca de 30 ou 40cm de diâmetro. Estes focos iniciais podem se alastrar gradativamente, levando a pneumonia caseosa com envolvimento da pleura, que adquire padrão nodular (RADOSTITIS et al., 2007). Nos animais do presente estudo foram encontradas lesões de diferentes tamanhos e aspectos, principalmente devido ao tempo de evolução da enfermidade.

6.4 Questionário realizado aos produtores rurais

Quanto ao questionário realizado com os pequenos produtores, notou-se que grande parte da população estudada apresentou o agronegócio leiteiro como única fonte de renda, e pertence ao ramo há pelo menos 10 anos.

A ordenha manual foi predominante entre eles, visto que se trata de pequenos produtores, que não possuem poder aquisitivo para investir em tecnologias para aumentar o seu rendimento.

Apenas pequena parcela dos produtores possui algum tipo de assistência médica veterinária em suas propriedades, demonstrando desconhecimento sobre a importância de ajuda profissional especializada para a manutenção da sanidade e qualidade do rebanho. Em 86,4% (19/22) das propriedades nunca foram realizados testes diagnósticos de tuberculose e brucelose, e os produtores encararam como gasto desnecessário, visto que 90,9% (20/22) das propriedades entregavam leite aos laticíneos que não exigiam estes testes para receber o leite antes de comercializar, gerando comodidade e contribuindo para o desconhecimento da necessidade de exames sanitários periódicos no rebanho.

O consumo de leite cru foi frequente entre os produtores rurais, realizado por 95,5% (21/22), o que denota o total desconhecimento quanto aos diversos patógenos que podem ser veiculados por este alimento.

A brucelose bovina é conhecida por quase todos os produtores (21/22), com exceção de um deles que desconhecia a existência da enfermidade. Apesar de conhecer esta doença nos bovinos, pouco mais da metade dos entrevistados sabia do caráter zoonótico e dos riscos que a enfermidade representa à saúde humana (13/22). Isto pode ser comprovado pela negligência na manipulação de fetos ou produtos de abortamento sem proteção de luvas, o que ocorreu em mais da metade da população em questão (13/22).

A tuberculose bovina é conhecida por 86,36% (19/22) dos produtores, porém apenas 27,3% (6/22) destes desconheciam que a enfermidade possa ser transmitida à espécie humana, aumentando as possibilidades de contaminação pelo desconhecimento de seu caráter zoonótico.

6.5 Limitações do PNCEBT

O PNCEBT foi implantado há mais uma década com o objetivo de diminuir a incidência destas enfermidades e estabelecer medidas sanitárias de controle, porém desde a sua criação a prevalência encontrada neste trabalho se manteve semelhante na região de Botucatu.

O pouco conhecimento e falta de subsídios dos pequenos produtores dificulta o sucesso do Programa Nacional de Controle. O desconhecimento da gravidade da enfermidade, de sua capacidade de disseminação e do seu caráter zoonótico faz com que os produtores não tenham a preocupação em realizar periodicamente os testes preconizados.

Outro fator limitante quanto execução do programa é que os animais positivos devem ser sacrificados. Caso isto não ocorra, a propriedade deverá ser interditada até a retirada do bovino infectado, conforme estabelecido em normativa. Porém, não há nenhum tipo de benefício financeiro ou assistência governamental, que contemple os produtores que seguem as recomendações do Programa Nacional. Assim, o descarte dos animais, a princípio, é visto como prejuízo econômico pelo produtor. O desconhecimento e falta de instruções impossibilitam os proprietários de reconhecer os benefícios a médio e longo prazo de se realizar os testes diagnósticos e o manejo sanitário adequado do rebanho.

A lei 569 de 21 de dezembro de 1948 prevê no artigo 3º que deve ser pago a indenização devida pelo sacrifício do animal em casos de tuberculose. A avaliação deverá ser feita por uma comissão, composta de um representante do Governo Federal, obrigatoriamente profissional em veterinária, um representante do Governo Estadual e um representante das Associações Rurais criadas pelo Decreto-lei nº 7.449, de 9 de abril de 1945, substituído o último nas zonas ou regiões onde não existirem tais entidades, por um ruralista de reconhecida capacidade técnica, indicado pela parte interessada. Do laudo emitido caberá recurso, dentro do prazo de trinta dias para o Ministro da Agricultura, devendo ser interposto pelo representante do Governo Federal, quando este considerar excessiva a avaliação ou incabível a indenização; pelo proprietário do animal, coisas ou instalações rurais, quando for negada a indenização ou reputada insuficiente a avaliação. A indenização deverá ser paga pelo Governo da União à conta da dotação consignada em orçamento especialmente para esse fim de crédito adicional a que se dê o mesmo destino ou da dotação orçamentária destinada às despesas com a profilaxia e combate a epizoonias. Quando houver acordo ou convênio entre o Governo da União e o do Estado com a contribuição de uma ou outra entidade, para execução de serviços públicos de defesa sanitária animal um terço da indenização sairá da contribuição estadual, saindo da contribuição federal os dois terços restantes. O direito de pleitear a indenização prescreverá em 180 (cento e oitenta) dias, contados da data em que for sacrificado o animal (BRASIL, 1948).

Em termos legais, há lei sancionada e em vigor que ampare os produtores em casos de perdas financeiras nos casos de tuberculose. Porém todos os pré-requisitos necessários para a aplicabilidade desta lei tornam de difícil execução e na maioria dos casos, inviável para pequenos produtores, que apresentam pouco ou nenhum conhecimento jurídico e difícil acesso a pessoas capacitadas que possam lhes fornecer informações técnicas.

O descarte dos animais positivos também é um empecilho encontrado pelos produtores. Enquanto não for realizado a descarte sanitário dos animais tuberculosos e/ou brucélicos, a propriedade ficará interdita pelas autoridades sanitárias. O PNCEBT preconiza que esses animais sejam preferencialmente encaminhados ao abate sanitário em estabelecimentos com

serviço de inspeção de carcaças (BRASIL, 2006). Porém existe grande dificuldade de encontrar frigoríficos que aceitem animais infectados, pois é necessário parar a linha de abate rotineira para realizar corretamente o abate sanitário e desinfecção do local após esse procedimento. Em geral os frigoríficos cobram dos produtores para abater animais enfermos, gerando custos ao produtor que já teve o prejuízo com a perda do animal.

Como alternativa descrita pelo PCNEBT eles ainda poderão ser destruídos na própria unidade de criação, desde que acompanhada pelo serviço oficial de defesa sanitária animal. Deverá ser realizada preferencialmente dentro da cova que o animal será enterrado. A cova deve ser feita em terreno estável e seco, distante de poços e cursos de água, de nascentes e de bebedouros, para evitar a contaminação do lençol freático. A carcaça deverá ser recoberta por um estrato de terra de aproximadamente dois metros para impedir que animais escavadores e minhocas veiculem os patógenos para a superfície (BRASIL, 2006).

O descarte sanitário na propriedade também é oneroso para o produtor, fazendo com que muitos pequenos produtores não tenham condições financeiras de realizar tais procedimentos. A adesão ao programa e a realização dos testes diagnósticos não é medida obrigatória, portanto grande parcela dos produtores opta por não realizarem os testes diagnósticos em vista das dificuldades que encontrarão frente a um animal positivo a um dos testes.

O PNCEBT possui importantes limitações quanto à erradicação destas enfermidades, visto que qualquer programa em que haja somente exigências sem incentivo tem chances reduzidas de sucesso.

É de extrema importância a realização de projetos da educação continuada em saúde pública, especialmente relacionados ao consumo de produtos de origem animal não inspecionados e não submetidos a nenhum tipo de tratamento térmico. Além disso, devem-se enfatizar os cuidados a serem tomados na manipulação destes produtos e no manejo de animais, minimizando assim riscos para a saúde humana.

7 CONCLUSÃO

A prevalência de tuberculose e brucelose observadas neste trabalho corroboraram com os dados obtidos na literatura em âmbito nacional após a implementação do PNCBET, com prevalência de 0,8% para tuberculose bovina e 2,3% de brucelose bovina.

O questionário realizado com os produtores rurais demonstrou pouco conhecimento sobre as enfermidades, seu poder zoonótico e de disseminação no rebanho.

8 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. 1999.
- ABRAHÃO, R. M. C. M.; NOGUEIRA, P. A.; MALUCELLI, M. I. C. O comércio clandestino de carne e leite no Brasil e o risco da transmissão da tuberculose bovina e de outras doenças ao homem: um problema de saúde pública. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 10, n. 2, p. 1-17. 2005.
- ABRAHÃO, R.M.C.M. **Tuberculose humana causada pelo *Mycobacterium bovis*: considerações gerais e a importância dos reservatórios animais**. 1998. 318 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.
- ALMEIDA, M.A.Z. Tuberculose. In: NAPOLI, L.; SARTOR, D.R.; MARTINS, J.P. (Orgs.). **Manual de Zoonoses**. Porto Alegre: Programa de Zoonoses Região Sul, 2009. v.1, p.143-163.
- ALMÉRI, N. Menos Leite Informal. Disponível em <www.hojeemdia.com.br>. Acesso em: 20 jan. 2014.
- ALVES, S.J.A.; GONÇALVES, V.S.P.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LÔBO, J.R.; BAHIENSE, L.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J.S.; DIAS, R.A. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado da Bahia. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, supl.1, p.6-13, 2009.
- AZEVEDO, S.S.; FERREIRA NETO, J.S.; DIAS, R.A.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LÔBO, J.R.; GONÇALVES, V.S.P.; SOUZA, A.C.; VASCONCELLOS, S.A. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Espírito Santo. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, supl.1, p.19-26, 2009.
- BARNETT B: Brucellosis. Congenital transmission in Galveston. **Disease Prevention News**. Texas Department of Health 1996; 56: 1-2.
- BENNETT, A. Milk & Dairy Products. 2008. Disponível em <www.fao.org>. Acesso em: 20 jan. 2014.
- BIET, F.; BOSCHIROLI, M. L.; THOREL, M. F.; GUILLOTEAU, L. A. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare*

- BRASIL. Lei 569, de 21 de dezembro de 1948. Estabelece medidas de defesa sanitária animal, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 21 de dezembro de 1948. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/1930-1949/L0569.htm. Acesso em: 18/12/2014.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Instrução Normativa nº2, de 10 de janeiro de 2001. Institui o Programa Nacional de Erradicação da Brucelose e Tuberculose. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 11 jan. 2001. Seção 1, p.5.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Instrução Normativa 51, de 20 de setembro de 2002. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 21 set. 2002. Seção 1, p.13.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. **Manual técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal**. Brasília, 2006.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Decreto nº 30.691 de 29 de março de 1952**. Aprova o novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Brasília, 1952.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, p. 6, 29 dez. 2011a. Seção 1.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – Manual Técnico**. Brasília, 2006. 184p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Morbidade do SUS por local de residência: Lista morbidade CID-10: Brucelose**. Internações, Óbitos e Média de permanência em internação por ano processamento segundo Região. 2011b.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 104 de 25 de janeiro de 2011**. Define as terminologias adotadas em legislação nacional, conforme o disposto no Regulamento Sanitário Internacional 2005 (RSI 2005), a relação de doenças, agravos e eventos em saúde pública de notificação compulsória em todo o território nacional e estabelece fluxo, critérios, responsabilidades e atribuições aos profissionais e serviços de saúde. Brasília, 2011a

- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. 8. ed. rev. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. 448p.
- CARVALHO MS, BARROSO MR, PINHAL F, MOTA TAVARES F. Brucelose, alguns aspectos epidemiológicos. **Medicina Interna**. 1995; 2 (4): 259-261.
- CFMV – Conselho Federal de Medicina Veterinária, 2012. Disponível em: http://www.cfmv.gov.br/portal/doc/guiabbp_eutan%C3%A1sia_animal.pdf. Acesso 18/12/2014.
- CHATE, S.C.; DIAS, R.A.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; MORAES, G.M.; COSTA NETO, A.A.; MONTEIRO, L.A.R.C.; LÔBO, J.R.; FIGUEIREDO, V.C.F.; GONÇALVES, V.S.P.; FERREIRA NETO, J.S. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Mato Grosso do Sul. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, supl.1, p.46-55, 2009.
- CHOMEL, B.; DEBESS, E.; MANGIAMELE, D.; REILLY, K.; FARVER, T.; SUN, R.; BARRETT, L.R. Changing trends in the epidemiology of human brucellosis in California from 1973 to 1992: a shift toward foodborne transmission. **J. Infect. Dis.**, v.170, p.1216-1223, 1994.
- CIMIERI, F. Incidência de tuberculose no Brasil diminuiu. Disponível em: <http://www.estadao.com.br/noticias/geral,correcao-incidencia-de-tuberculose-no-brasil-diminuiu,344203,0.html>. Acesso em 18 mar 2012.
- CLOECKAERT, A.; VIZCAÍNO, N. DNA Polymorphism and Taxonomy of Brucella Species. In: LÓPEZ-GOÑI, I.; MORIYÓN, I. (Eds.). **Brucella: molecular and cellular biology**. Pamplona: Horizon Bioscience, 2004. p.1-23.
- CORBEL, M.J.; ARIZA, J.; BANAI, M.; COSIVI, O.; DIAZ, R.; DRANOVSKAYA, E.A.; ELBERG, S.S.; GARIN-BASTUJI, B.; KOLAR, J.; MACMILLAN, A.P.; MANTOVANI, A.; MORIYON, I.; MOUSA, A.; NICOLETTI, P.; SEMEINIS, A.; YOUNG, E.J. **Brucellosis in humans and animals**. Produced by the World Health Organization in collaboration with the Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Organization for Animal Health. Genève: World Health Organization, 2006. 92p.
- CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.N.M. **Enfermidades infecciosas dos animais domésticos**. 2 ed. p. 843, 1992.

- CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.N.M. Tuberculose humana por bacilo bovino em São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.41, n.3, p.131-134. 1974.
- 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**, v. 4, p. 59-70. 1998.
- DE LA RUA-DOMENECH, R. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures, and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 86, p. 77-109. 2006.
- DIAS, J.A.; MÜLLER, E.E.; FREITAS, J.C.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; SILVA, M.C.P.; LÔBO, J.R.; FIGUEIREDO, V.C.F.; GONÇALVES, V.S.P.; FERREIRA NETO, J.S. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Paraná. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, supl.1, p.66-76, 2009b.
- DIAS, R.A.; GONÇALVES, V.S.P.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LÔBO, J.R.; LIMA, Z.M.B.; PAULIN, L.M.S.; GUNNEWIEK, M.F.K.; AMAKU, M.; FERREIRA NETO, J.S.; FERREIRA, F. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de São Paulo. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, supl.1, p.118-125, 2009a.
- DIB, C.C.; MORAIS, Z.M.; DE SOUZA, G.O.; AMAKU, M.; BENITES, N.R.; PINHEIRO, S.R. Utilização de uma técnica rápida para o diagnóstico de *Mycobacterium bovis* em amostras de leite experimentalmente inoculadas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, n.2, p.149-155. 2006.
- EMBRAPA GADO DE LEITE. VILELA, D. 2011. Disponível em: <http://www.cnpql.embrapa.br/sistemaproducao/>. Acesso em 20/11/2014.
- ENRIGHT FM. The pathogenesis and pathobiology of *Brucella* infection in domestic animals. In: Nielson K, Duncan JR, eds. **Animal Brucellosis**. Boca Raton, Fla: CCR Press 1990: 301-320.
- FRANCO, M.M.J.; PAES A.C.; RIBEIRO, M.G.; PANTOJA, J.C.F.; SANTOS, A.C.B.; MIYATA, M.; LEITE, C.Q.F.; MOTTA, R.G.; LISTONI, F.J.P. Occurrence of mycobacteria in bovine milk samples from both individual and

- collective bulk tanks at farms and informal markets in the southeast region of Sao Paulo, Brazil. **BMC Veterinary Research** v.9 (85), p.1-8, 2013.
- FREITAS, J.A. et al. Risco de brucelose zoonótica associado a suínos de abate clandestino. **Revista de Saúde Pública**, Belém, p.101-102, 2001.
- GONÇALVES, D.D.; BENITEZ, A.; LOPES-MORI, F.M.; ALVES, L.A.; FREIRE, R.L.; NAVARRO, I.T.; SANTANA, M.A.Z.; SANTOS L.R.A.; CARREIRA, T.; VIEIRA, M.L.; FREITAS, J.C. Zoonoses in humans from small rural properties in Jataizinho, Parana, Brazil **Brazilian Journal of Microbiology** v.44, n.1, p.125-131, 2013.
- GONÇALVES, D.D.; TELES, P.S.; REIS, C.R.; LOPES, F.M.R.; FREIRE, R.L.; NAVARRO, I.T.; ALVES, L.A.; MULLER, E.E.; FREITAS, J.C. Seroepidemiology and occupational and environmental variables for leptospirosis, brucellosis and toxoplasmosis in slaughterhouse workers in the Paraná State, Brazil. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.** v.48, n.3, p.135-140, 2006.
- GONÇALVES, V.S.; BELCHIOR, A.P.C.; RODRIGUES NETO, A.; LEITE, R.C. An exploratory survey of bovine tuberculosis in the State of Minas Gerais, Brazil. In: SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA Y ECONOMIA VETERINÁRIA, 10. 2003, Viña del Mar, Chile. **Anais...** Viña del Mar: La Asociación, 2003. p.804.
- GONÇALVES, V.S.P.; RIBEIRO, L.A.; CALDAS, R.A.; FRANCISCO, P.F.C.; DIAS, R.A.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; FERREIRA NETO, J.S.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LÔBO, J.R.; BORGES, J.R.J. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Distrito Federal. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, supl.1, p.14-18, 2009a.
- GONÇALVES, V.S.P.; DELPHINO, M.K.V.C.; DIAS, R.A.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; FERREIRA NETO, J.S.; PORTO, T.B.; ALVES, C.M.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LÔBO, J.R. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado De Minas Gerais. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, supl.1, p.53-45, 2009b.
- GRANGE, J.M. & YATES, M.D. Zoonotic aspects of Mycobacterium bovis infection. **Veterinary Microbiology**, v.40, p.137-151, 1994.
- GUIMARÃES, F. F.; LANGONI, H. Leite: alimento imprescindível, mas com riscos para a saúde pública. **Vet Zootec** v. 16, p. 38-51, 2009.

- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Produção da Pecuária Municipal. Volume 38. 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/ppm2010.pdf>. Acesso 20/11/2014.
- KLEIN-GUNNEWIEK, M.F.C.; AMAKU, M.; DIAS, R.A.; FERREIRA, F.; GITTI, C.B.; PEREIRA, L.A.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LÔBO, J.R.; GONÇALVES, V.S.P.; FERREIRA NETO, J.S. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Rio de Janeiro. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, supl.1, p.77-84, 2009.
- KURODA, R.B.S.; PAULIN, L.M.S.; NOZAKI, C.N.; SILVA JUNIOR, F.F.; GERONUTTI, L.; MEGID, J. Prevalência da brucelose bovina na microrregião da Serra de Botucatu – estudo comparativo dos resultados das técnicas de soroaglutinação lenta em tubos, 2-Mercaptoetanol. **Revista arquivos do Instituto Biológico.**, v. 71, n. 2, 2004.
- LANGONI, H.; ICHIHARA, S.M.; SILVA, A.V.; PARDO, R.B.; TONIN, F.B.; MENDONÇA, L.J.P.; MACHADO, J.A.D. Isolation of Brucella spp from milk of brucellosis positive cows in São Paulo and Minas Gerais states. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.37 ,n.6, 2000.
- LÔBO, J.R. **Análise custo-benefício da certificação de propriedades livres de tuberculose bovina**. 2008. 84f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília, 2008.
- MARVULO, M.F.V.; FERREIRA, F.; DIAS, R.A.; AMAKU, M.; GROFF, A.C.M.; GONÇALVES, V.S.P.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LÔBO, J.R.; FERREIRA NETO, J.S. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Rio Grande do Sul. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, supl.1, p.126-134, 2009.
- MEGID, J., MATHIAS A., ROBLES, C. A. Clinical Manifestations of Brucellosis in Domestic Animals and Humans. **The Open Veterinary Science Journal**, 2010, 4, 119-126.
- MENIN, I., FLEITH, R., RECK, C., MARLOW, M., FERNANDES, P., PILATI, C., BÁFICA, A. Asymptomatic Cattle Naturally Infected with Mycobacterium bovis Present Exacerbated Tissue Pathology and Bacterial Dissemination. **PLOS ONE**. V. 8, n. 1 p.1-11. 2013.
- MESSELHÄUSSER, U.; KÄMPF, P.; HÖRMANSDORFER, S.; WAGNER, B.; SCHALCH, B.; BUSCH, U.; HÖLLER, C.; WALLNER, P.; BARTH, G.;

- RAMPP, A. Culture and Molecular Method for Detection of Mycobacterium tuberculosis Complex and Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Milk and Dairy Products. **Applied Environmental Microbiology**. v. 78, n. 1, p.295-297. 2012.
- MODA, G.; DABORN, C. J.; GRANGE, J. M.; COSIVI, O. The zoonotic importance of Mycobacterium bovis. **Tubercle and Lung Disease**, Avenel, v. 77, p. 103-108. 1996.
- MÜLLER, E.E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção de mastite. In: **Anais do II Sul-Leite: Simpósio sobre sustentabilidade de pecuária leiteira na Região Sul do Brasil**, p. 206-217, 2002.
- NAMIDURU, M.; GUNGOR, K.; DIKENSO, Y.O.; BAYDAR, I.; EKINCI, E.; DAROGLAN, I.; BEKIR, N.A. Epidemiological, clinical and laboratory features of brucellosis: a prospective evaluation of 120 adult patients. **Int. J. Clin. Pract.**, v.51, p.20-24, 2003.
- NEGREIROS, R.L.; DIAS, R.A.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J.S.; GONÇALVES, V.S.P.; SILVA, M.C.P.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LÔBO, J.R.; FREITAS, J.; AMAKU, M. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Mato Grosso. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, supl.1, p.56-65, 2009.
- NERO L.A.; MATTOS, M.R.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F; NETTO, D.P.; PINTO, J.P.A.N.; ANDRADE, N.J.; SILVA, W.P.; FRANCO, B.D.G. M. Hazards in non-pasteurized milk on retail sale in Brazil: prevalence of Salmonella spp., Listeria monocytogenes and chemical residues. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 211-215. 2004.
- OIE - WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2014. Disponível em: <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2014/>. Acesso em 18/12/2014.
- O'REILLY, L. M.; DABORN, C. J. The epidemiology of Mycobacterium bovis infections in animals and man: a review. **Tubercle and Lung Disease**, Anenel, v. 76 (Supplement 1), p. 1-46, 1995.
- OGATA, R.A.; GONÇALVES, V.S.P.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LÔBO, J.R.; RODRIGUES, A.L.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J.S.;

- DIAS, R.A. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Tocantins. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, supl.1, p.126-134, 2009.
- PAES, A.C. Tuberculose bovina. In: **Bovinocultura de corte**. Piracicaba: FEALQ, p.993-1017. 2010.
- PAHO - PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Case Definitions: Anthrax, Brucellosis and Rabies. **Epidemiological Bulletin**, Washington, v. 21, n. 3, p. 12-14, 2000.
- PARDO, R.B.; LANGONI, H.; MENDONÇA, L.J.P.; CHI, K.D. Isolation of *Mycobacterium* spp in milk from cows suspected or positive to tuberculosis. **Braz. J. of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 38, n.6, p. 284-287, 2001.
- PÉREZ, A.; RENIERO, A.; FORTEIS, A.; MEREGALLI, S.; LÓPEZ, B.; RITACCO, V. Study of *Mycobacterium bovis* in milk using bacteriological methods and the polymerase chain reaction. **Revista Argentina de Microbiologia**. v. 34, n.1, p.45-51. 2002.
- PESSEGUEIRO, P., BARATA, C., CORREIA, J. Brucelose – uma revisão sistematizada. **Medicina Interna**. v. 10, n. 2, p. 91-100, 2003.
- POESTER, F.P. Brucelose. In: NAPOLI, L.; SARTOR, D.R.; MARTINS, J.P. (Orgs.). **Manual de Zoonoses**. Porto Alegre: Programa de Zoonoses Região Sul, 2009a. v.1. p.9-21.
- POESTER, F.; FIGUEIREDO, V.C.R.; LÔBO, J.R.; GONÇALVES, V.S.P.; LAGE, A.P.; ROXO, E.; MOTA, P.M.P.C.; MÜLLER, E.E.; FERREIRA NETO, J.S. Estudos de prevalência da brucelose bovina no âmbito do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose: Introdução. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, supl.1, p.1-5, 2009b.
- QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.C.; LEONARD, F.C.; MAGUIRE, D. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512p.
- RADOSTITS, M.O.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W.; CONSTABLE, P.D. Disease associated with bacteria – IV. In: **Veterinary medicine: a textbook of the disease of cattle, horses, sheep, pigs, and goats**. 10.ed. New York: Saunders,. p.1007-1060, 2007.

- REIS, D. O.; ALMEIDA, L. P.; PIMENTA, A.; VIEIRA, R. L. Zoonoses Reemergentes: um estudo com bovinos abatidos em frigorífico da região Sudeste do Brasil. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.15, n.82, p.23-27. 2001.
- RUBIN B, BAND JD, WONG P et al. Person-to-person transmission of *Brucella melitensis*. **Lancet**. v.1, p.14-15, 1991.
- SALAZAR, F. H. P.; GUIMARÃES, E. B. Tuberculose bovina. In: LEMOS, R. A. A. (Org.) **Brucelose bovina, tuberculose bovina**. Série Qualificação Rural. Volume 4. Campo Grande, MS: Ed. UFMS, p. 59-106. 2006.
- SCHOLZ, H.C.; NÖCKLER, K.; GÖLLNER, C.; BAHN, P.; VERGNAUD, G.; TOMASO, H.; DAHOUK, S.A.; KÄMPFER, P.; CLOECKAERT, A.; MAQUART, M.; ZYGMUNT, M.S; WHATMORE, A.M.; PFEFFER, M.; HUBER, B.; BUSSE, H.J.; DE, B.K. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.60. p.801-808, 2010.
- SIKUSAWA, S.; AMAKU, M.; DIAS, R.A.; FERREIRA NETO, J.S.; MARTINS, C.; GONÇALVES, V.S.P.; FIGUEIRESO, V.C.F.; LÔBO, J.R.; FERREIRA, F. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Santa Catarina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, supl.1, p.103-108, 2009.
- SILVA, V.G.S.O.; DIAS, R.A.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; COSTA, E.L.S.; LÔBO, J.R.; FIGUEIREDO, V.C.F.; GONÇALVES, V.S.P.; FERREIRA NETO, J.S. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Sergipe. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, supl.1, p.109-117, 2009.
- SMITH, N.H.; GORDON, S.V.; DE LA RUA-DOMENECH, R.; CLIFTON-HADLEY, R.S.; HEWINSON, R.G. Bottlenecks and broomsticks: the molecular evolution of *Mycobacterium bovis*. **Nat. Rev. Microbiol.**, v.4, p.670-681, 2006.
- SYRJAMAKI C, MIGLIAZZA A, YARBOROUGH JW et al. *Brucella abortus* endocarditis following ingestion of cow's blood. **Nebr Med J**. v.69, p.141-143, 1984.
- THOEN, C.; LOBUE, P.; KANTOR, I. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. **Veterinary Microbiology**, v. 112, p. 339-345, 2006.
- VILLAR, K.S.; AMAKU, M.; DIAS, R.A., FERREIRA NETO, J.S.; BENITEZ, F.; GONÇALVES, V.S.P.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LÔBO, J.R.; FERREIRA, F.

- Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Rondônia. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, supl.1, p.85-92, 2009.
- WHIPPLE, D.L., BOLIN, C.A., MILLER, J.M. Distribution of lesions in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. **J Vet Diagn Invest.** v.8, p.351-354, 1996.
- YOUNG E.J. Human Brucellosis. **Infectious Disease.** v.5, p.321-342, 1983.
- YOUNG E.J., SUVANNOPARRAT U. Brucellosis outbreak attributed to ingestion of unpasteurized goat cheese. **Arch Intern Med.** v.135, p. 240-243, 1975.
- ZANINI, M.S. Polimorfismo de DNA em *M. bovis* e sensibilidade à isoniazida no Brasil. **J. Clin. Microbiol.**, v.39, n.10, p.3075-3708, 2001.

9 ARTIGO CIENTÍFICO

Trabalho enviado para **Pesquisa Veterinária Brasileira**.

Os trabalhos para submissão devem ser enviados por via eletrônica, através do e-mail <jurgen.dobereiner@terra.com.br>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word. Havendo necessidade (por causa de figuras “pesadas”), podem ser enviados em CD pelo correio, com uma via impressa, ao Dr. Jürgen Döbereiner, Revista PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA, Caixa Postal 74.591, Seropédica, RJ 23890-000. Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista (www.pvb.com.br) e o modelo em Word (PDF no site). Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação.

Apesar de não serem aceitas comunicações (Short communications) sob forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo. Trabalhos sobre Anestesiologia e Cirurgia serão recebidos para submissão somente os da área de Animais Selvagens. Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (peer review).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista (impressa e online) e distribuição via correio é cobrada taxa de publicação (page charge) no valor de R\$ 250,00 por página editorada e impressa, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes dois últimos), Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o Título do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) Autor(es) deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto P.V.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F.; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores;

c) o ABSTRACT deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de "INDEX TERMS" ou "TERMOS DE INDEXAÇÃO", respectivamente;

d) o RESUMO deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) a INTRODUÇÃO deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

f) em MATERIAL E MÉTODOS devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em RESULTADOS deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na DISCUSSÃO devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as CONCLUSÕES devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

j) Agradecimentos devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de REFERÊNCIAS, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do “Style Manual for Biological Journals” (American Institute for Biological Sciences), o “Bibliographic Guide for Editors and Authors” (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:

a) os trabalhos devem ser submetidos seguindo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob “Instruções aos Autores” (www.pvb.com.br). A digitalização deve ser na fonte Cambria, corpo 10, entrelinha simples; a página deve ser no formato A4, com 2cm de margens (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta “Inserir” do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o

trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo e todos os autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails dos demais autores (para eventualidades e confirmação de endereço para envio do fascículo impresso);

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; trabalhos de até três autores serão citados pelos nomes dos três, e com mais de três, pelo nome do primeiro, seguido de “*et al.*”, mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”; a referência do trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Christian & Tryphonas 1971, Priester & Haves 1974, Lemos *et al.* 2004, Krametter-Froetcher *et. al.* 2007);

f) a Lista das REFERÊNCIAS deverá ser apresentada isenta do uso de caixa alta, com os nomes científicos em itálico (grifo), e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica. Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão “jpg”), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. Nesse caso, cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra “pé”. Os gráficos devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos (“slides”). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope. Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, com independência do texto) e serão apresentadas no final do trabalho.

5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e colocados no final do texto. Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas. Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando, se possível, com “a” em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.

Trabalho 4076LD

Situação epidemiológica da brucelose e tuberculose bovina em propriedades fornecedoras de leite para o programa "Laticínio Escola" do município de Botucatu – SP¹

Anna P. V. Maurelio*²; Bianca P. Santarosa³; Acácia F. Vicenti², Fernando J. P. Listoni², Jane Megid²; Antonio C. Paes²

ABSTRACT.- Maurelio A.P.V, Santarosa B.P., Vicenti A.F., Listoni F.J.P., Megid J. & Paes A.C. 2014. [Epidemiological situation of bovine brucellosis and tuberculosis in properties that supply milk for the "Dairy School" of Botucatu-SP.] Situação epidemiológica da brucelose e tuberculose bovina em propriedades fornecedoras de leite para o programa "Laticínio Escola" do município de Botucatu-SP. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu. Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu, SP 18618-970, Brazil. E-mail: anninhavitty@hotmail.com

Brucellosis and tuberculosis are chronic infectious diseases and considered as zoonosis, which represent large economic losses to dairy cattle and public health. Our objectives were to study the epidemiological situation of these diseases in the properties that supply milk to the Municipal Program of Botucatu entitled "Dairy School"; determine the degree of knowledge of small farmers about these diseases through a questionnaire prepared for this purpose. At the end of the questionnaire the producers received technical instruction on the topics and we performed a social work awareness of zoonotic importance and health. The study was conducted in 22 small dairy farms of Botucatu-SP, which provide milk for kindergartens and public schools. The tests performed were those recommended by the National Program for Control and Eradication of Brucellosis and Tuberculosis (PNCEBT), which are serologic for brucellosis and tuberculosis imunoalergic. Reagents animals to both tests were removed from the property, taken to the Veterinary Hospital of FMVZ/UNESP, Botucatu, to perform necropsies. The total number of animals tested for tuberculosis was 736, and for brucellosis 512. It has been found Brucellosis at least one positive for tuberculosis in 13.6% (3/22) of properties, for brucellosis in 31.8% (7/22). The prevalence of disease observed was 0.8% (6/736) and 2.3% (12/512) for tuberculosis and brucellosis, respectively. Data from this study were similar to those in regional work of the national literature. Therefore, in the micro region of Botucatu, these diseases still represent very important socio-economic, health and public health.

INDEX TERMS: brucellosis; dairy cattle; prevalence; tuberculosis.

RESUMO.- A brucelose e tuberculose são enfermidades infectocontagiosas de evolução crônica, de caráter zoonótico, que representam grandes prejuízos econômicos à bovinocultura leiteira e saúde pública. Os objetivos deste trabalho foram: estudar a situação epidemiológica destas enfermidades nas propriedades fornecedoras de leite para o Programa Municipal de Botucatu intitulado "Laticínio Escola"; determinar o grau de conhecimento dos pequenos produtores acerca destas doenças através de um questionário elaborado para essa finalidade. Ao final do questionário os produtores receberam instruções técnicas sobre os temas abordados e foi realizado um trabalho social de conscientização sobre a importância zoonótica e sanitária. O estudo foi conduzido em 22 pequenas propriedades leiteiras do município de Botucatu-SP, que fornecem leite para creches e

¹Recebido em

Aceito para publicação em

Parte da Dissertação da primeira autora. Bolsa de Mestrado concedida pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processo n. 2012/10446-3.

²Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de Botucatu, Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu, SP 18618-970, Brasil.

*Autor para correspondência: anninhavitty@hotmail.com

³Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de Botucatu, Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu, SP 18618-970, Brasil.

escolas municipais. Os testes realizados foram os preconizados pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), que são sorológicos para brucelose e imunoalérgico para tuberculose. Os animais reagentes a ambos os testes foram retirados da propriedade, levados ao Hospital Veterinário da FMVZ/UNESP, campus de Botucatu, para realização de exame necroscópico. O total de animais testados para Tuberculose foi 736, e para Brucelose 512. Encontrou-se pelo menos um bovino positivo para tuberculose em 13,6% (3/22) das propriedades, e para brucelose em 31,8% (7/22). A prevalência das enfermidades observada foi de 0,8% (6/736) e 2,3% (12/512) para tuberculose e brucelose, respectivamente. Os dados deste estudo foram semelhantes aos encontrados em trabalhos regionais da literatura nacional. Portanto, na microrregião de Botucatu-SP, estas enfermidades ainda representam grande relevância socioeconômica, sanitária e de saúde pública.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: bovinocultura de leite; Brucelose; prevalência; Tuberculose.

INTRODUÇÃO

O efetivo de bovinos em 2010 teve aumento de 2,1% em relação a 2009 e foi de 209,541 milhões de cabeças. A Região Norte tem apresentado crescimento no rebanho superior às demais regiões desde 2009, revertendo a queda observada em 2007. No Sudeste, o avanço das lavouras de cana e grãos sobre as pastagens em São Paulo contribuiu para a redução da taxa de crescimento do rebanho. A produtividade de leite no Brasil (em litros/vaca/ano) cresceu 12% no período de 2005 a 2010. Ganhos significativos de produtividade ocorreram em todas as regiões, merecendo destaques os crescimentos observados no Sul (19,1%) e no Norte (12,5%) do País (IBGE, 2010). Em 2010 a produção mundial de leite foi de 695,7 bilhões de litros, dos quais o Brasil contribuiu com 4,42% ou 30,7 bilhões de litros. Entre 2000 e 2010 a produção cresceu em média 4,4% ao ano, a segunda maior taxa anual de crescimento do mundo. O primeiro lugar foi da China, com 17,61% (EMBRAPA, 2011).

No Brasil e em outros países da América Latina, onde a febre aftosa está em fase avançada de erradicação, o controle da tuberculose e brucelose está se tornando prioritário, pois se espera que elas sejam as próximas doenças a tornar-se alvo das exigências sanitárias internacionais (Lôbo, 2008). Assim, essas enfermidades devem ter controle prioritário nos sistemas produtivos de bovino. Além dos possíveis prejuízos ao comércio internacional, elas estão amplamente distribuídas no território brasileiro e são enfermidades infecciosas de caráter zoonótico, o que as torna importante problema em saúde pública (Valente et al. 2011).

Na pecuária bovina leiteira, a tuberculose constitui um problema muito antigo. Os prejuízos são muito grandes em virtude da drástica diminuição da produção de leite, perda de bezerras e perda com descarte dos animais adultos reagentes positivos (Paes 2010). A enfermidade também possui importante caráter zoonótico, principalmente através da excreção do bacilo no leite e por secreções nasais, pois mesmo em estágios iniciais da infecção, sem a ocorrência de alterações pulmonares aparentes os animais podem produzir aerossóis infectantes (Acha & Szyfres 2003). A manifestação clínica em bovinos inclui sintomatologia predominantemente respiratória causada pelo quadro de broncopneumonia crônica, porém podemos observar em menor escala manifestações intestinais, reprodutivas e mastite (Radostits et al. 2007).

A brucelose é caracterizada como uma enfermidade de caráter febril, com evolução aguda ou subaguda, geralmente marcado por febre intermitente acompanhada por mal-estar, anorexia, prostração, e que, na ausência de um tratamento específico, pode persistir durante semanas ou meses. Em geral, alguns sinais mais específicos podem ocorrer, porém a hepatoesplenomegalia e linfadenomegalia presentes são extremamente inespecíficos e podem ocorrer em diversas enfermidades. A fase aguda pode progredir para uma crônica com recaída, levando a um quadro denominado "síndrome da fadiga crônica" (Corbel et al. 2006).

O conhecimento da real situação epidemiológica das enfermidades por estados e regiões é de extrema importância quando se pretende estabelecer um programa de controle e erradicação, pois permite escolher as melhores estratégias e acompanhar o andamento do programa, julgando se há necessidade de promover correções, evitando o desperdício de tempo e recurso (Poester et al. 2009a).

São enfermidades de notificação obrigatória, da lista B da OIE (World Organization for Animal Health), que designa a lista de enfermidades transmissíveis consideradas importantes sob o ponto de vista socioeconômico e/ou sanitário a nível nacional, e cujas repercussões no comércio internacional de animais e produtos de origem animal são consideráveis. Estas enfermidades

geralmente são objeto de informe anual, ainda que em alguns casos possam ser realizados informes mais frequentes (OIE, 2014).

Foi instituído em 2001 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) o Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT). O objetivo deste programa foi diminuir o impacto dessas zoonoses na saúde humana e animal, além de promover a competitividade da pecuária nacional, e teve como pretensão a erradicação das enfermidades após 20 anos de implementação do programa (BRASIL, 2001). São enfermidades de notificação obrigatória, de acordo com art. 5º, do Decreto 5.741/2006 e a Instrução Normativa 30/2006 do MAPA que disciplina a habilitação de Médicos Veterinários que atuam no setor privado para participarem da execução do PNCEBT.

Educação continuada é a principal diretriz para o sucesso do programa e o primeiro passo nesse sentido é fornecer aos proprietários informações relativas ao caráter zoonótico das enfermidades, ao risco a saúde humana e a importância dos animais como fontes de infecção e responsáveis pela manutenção da enfermidade no rebanho justificando, portanto a necessidade de eliminação dos animais positivos, esclarecendo que, a médio e longo prazo, o saneamento do rebanho é promissor se refletindo em melhoria para a saúde humana e animal e maior produtividade dos animais.

Os objetivos deste trabalho foram: estudar a situação epidemiológica destas enfermidades nas propriedades fornecedoras de leite para o Programa Municipal de Botucatu intitulado "Laticínio Escola"; determinar o grau de conhecimento dos pequenos produtores acerca destas doenças através de um questionário elaborado para essa finalidade.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP- Botucatu, sob o protocolo nº 166/2012.

Neste estudo foi avaliada a prevalência de brucelose e tuberculose bovina, em propriedades fornecedoras de leite para o programa "Laticínio Escola" do município de Botucatu-SP, utilizando exame sorológico para brucelose e imunoalérgico para tuberculose. Investigou-se a espécie de *Brucella* isolada a partir de fragmentos de órgãos de animais soropositivos aos exames sorológicos através do cultivo microbiológico. O estudo foi conduzido em pequenas propriedades rurais do município de Botucatu-SP, inserido no maior mercado nacional consumidor do produto, a região Sudeste. Utilizaram-se 22 propriedades, onde todos os animais foram testados, com exceção dos menores de dois meses de idade e vacas no periparto. Foram utilizados animais das raças: Holandesa, Girolanda, Jersey ou mestiças com aptidão leiteira, com produção média de 10 a 20 litros/dia distribuídas pelo município de Botucatu.

Foram selecionadas 22 propriedades vinculadas ao Projeto Municipal denominado "Laticínio Escola". Este projeto é uma parceria entre a Prefeitura Municipal de Botucatu, a Secretaria Estadual de Agricultura e Abastecimento, representada pela Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI), a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP, a Associação Leite São Paulo e os produtores rurais de Botucatu. Esse projeto visa agregar valor à produção e abastecer as creches, escolas, asilos e outras instituições da cidade e é um componente importante na estratégia de estruturação da inspeção sanitária municipal, já que se fazem necessárias atividades de formação continuada dos produtores rurais, garantindo sempre a qualidade do leite, além de servir como um local de ensino, pesquisa e extensão, onde os produtores e estudantes terão aulas práticas com orientação dos professores.

Realizou-se um questionário ao produtor a fim de obter o conhecimento acerca destas enfermidades e seu risco à saúde pública. Com base no conhecimento do produtor, informou-se sobre todos os tópicos presentes no questionário, informações adicionais sobre as enfermidades e como adotar medidas sanitárias de prevenção e controle da Brucelose e Tuberculose.

Testes Diagnósticos - Brucelose

Para a realização das provas sorológicas, foram utilizados antígenos adquiridos junto ao Escritório de Defesa Agropecuária na cidade de Botucatu-SP.

Prova do Antígeno Tamponado Acidificado (ATA)

Foram realizadas com base na metodologia do PNCEBT (Brasil, 2006), utilizando-se antígeno constituído por suspensão celular inativada de *B. abortus* (amostra 1119-3), na concentração de 8%, pH 3,65, corado com rosa bengala.

O soro e o antígeno permaneceram em temperatura ambiente por 30 minutos antes da realização da prova. Em placa quadriculada padrão foi depositado 30µL do soro teste e ao seu lado 30µL do antígeno, que foram homogeneizados com auxílio de um bastão de vidro, formando círculos de aproximadamente 2cm de diâmetro. A placa foi agitada com movimentos oscilatórios, numa frequência de aproximadamente 30 movimentos por minuto, de modo a permitir a mistura soro-antígeno. A placa foi agitada continuamente por 4 minutos, e então realizada a leitura em caixa de fundo escuro.

Os resultados foram interpretados a partir da reação de aglutinação, indicados pela formação de grumos nos animais positivos e ausência dos mesmos nos animais negativos.

Soroaglutinação lenta em tubos (SAL)

A metodologia foi baseada na técnica descrita pelo PNCEBT (Brasil, 2006). Utilizou-se antígeno constituído de suspensão inativada de *B. abortus* amostra (1119-3), na concentração de 4,5%.

O soro e o antígeno permaneceram por 30 minutos em temperatura ambiente antes da realização da prova. O antígeno para soroaglutinação lenta em tubos foi diluído 100 vezes em solução salina a 0,85% contendo 0,5% de fenol, sendo a concentração final de 0,045%.

Utilizaram-se tubos de vidro dispostos em bancada apropriada, sendo colocado no primeiro tubo 0,08mL, no segundo tubo 0,04mL, no terceiro 0,02, no quarto 0,01mL do soro testado. Esses tubos foram acrescidos de 2mL do antígeno diluído 1:100 (0,045% de células) em salina fenicada (0,5% de fenol).

Os tubos foram homogeneizados e as estantes com as amostras incubadas em estufa à temperatura de 37°C por um período de 48 horas, após o qual foi realizada a leitura.

Foi considerada como reação completa aquela em que o sobrenadante da mistura soro-antígeno apareceu translúcido, com formação de película no fundo do tubo e com agitação suave se observou presença de grumos que não se rompiam; reação incompleta, quando o sobrenadante estivesse parcialmente translúcido, com formação de película no fundo do tubo e com agitação suave quando se observou a presença de grumos que não se rompiam; reação negativa, quando o sobrenadante apareceu turvo e agitação suave não revelou grumos. Foram utilizados soros positivos e negativos como controle.

2-Mercaptoetanol (2-ME)

A metodologia foi baseada na técnica descrita pelo PNCBET (BRASIL 2006).

O antígeno para soroaglutinação lenta em tubos foi diluído 50 vezes em solução salina a 0,85% sem adição de fenol, sendo a concentração final de 0,09%. A solução de 2 ME a 0,1 M foi preparada misturando-se 7,8 mL de 2-ME a 992,20mL de solução salina 0,085% sem fenol, ou volumes menores, proporcionalmente.

Foram utilizados tubos de vidro dispostos em bancada apropriada, sendo colocado no primeiro tubo 0,08mL, no segundo tubo 0,04mL, no terceiro 0,02, no quarto 0,01mL do soro a ser testado. Esses tubos foram acrescidos de 1mL solução de 2-ME 0,1M (diluído em salina sem fenol). As misturas foram homogeneizadas e as estantes com as amostras deixadas em repouso durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Após 30 minutos foi adicionado a cada tubo da fileira 1mL do antígeno diluído 1:50 (0,09% de células) em solução salina fisiológica (sem fenol), sendo a concentração final do antígeno na solução de 0,045% e do 2-ME de 0,05M.

As misturas foram homogeneizadas e incubadas à temperatura de 37°C por um período de 48 horas, após o qual foi realizada a leitura dos mesmos.

Foi considerada como reação completa aquela em que o sobrenadante da mistura soro-antígeno apareceu translúcido, com formação de película no fundo do tubo e com agitação suave se observou presença de grumos que não se rompiam; reação incompleta, quando o sobrenadante estivesse parcialmente translúcido, com formação de película no fundo do tubo e com agitação suave quando se observou a presença de grumos que não se rompiam; reação negativa, quando o sobrenadante apareceu turvo e agitação suave não revelou grumos. Foram utilizados soros positivos e negativos como controle.

Os animais reagentes inconclusivos foram submetidos ao segundo exame sorológico após 60 dias. Os que apresentaram resultado inconclusivo novamente foram considerados positivos.

Os animais reagentes positivos foram retirados da propriedade no prazo de sete dias e conduzidos ao Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da UNESP - campus de Botucatu, por ambulância da mesma instituição. Foram realizados eutanásia e exames necroscópicos.

Foi realizada eutanásia dos animais positivos utilizando-se metodologia química recomendada pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) em guia brasileiro de boas práticas para a eutanásia de animais, resolução nº 714, publicada em 20 de junho de 2002 (CFMV, 2002). Realizado inicialmente sedação com xilazina 20mg/100kg de peso vivo (PV) por via intramuscular profunda, seguida de tiopental na dosagem de 1g/100 kg de PV por via intravenosa e cloreto de potássio a 19,1% na dosagem de 19,1g/100 kg de PV, também por via intravenosa.

Testes Diagnósticos - Tuberculose

Diagnóstico Alérgico

A metodologia foi baseada na técnica descrita pelo PNCEBT (BRASIL, 2006). Utilizaram-se tuberculinas Purified Protein Derivative (Derivado Proteico Purificado - PPD) bovina e aviária, produzida segundo as normas do MAPA. Foram adquiridas junto ao Escritório de Defesa Agropecuária na cidade de Botucatu-SP.

As normas do PNCEBT permitem a realização de três testes de tuberculinização intradérmica em bovinos. Teste da prega ano caudal (TPC), que é indicado apenas para rebanhos bovinos de corte; teste cervical simples (TCS) e teste cervical comparativo (TCC) que é o teste confirmatório utilizado em animais reagentes ao TCS e TPC.

Utilizaram-se o TCC em todos os animais testados. Para o TCC, as tuberculinas foram inoculadas por via intradérmica na dosagem de 0,1mL, sendo o PPD aviário inoculado cranialmente e o PPD bovino caudalmente.

A inoculação da tuberculina PPD aviária foi realizada na região cervical, na junção do terço anterior e do terço médio e a distância igual das bordas superior e inferior do pescoço, ou escapular, à frente da espinha da escápula, e a 20cm acima da cernelha. A tuberculina PPD bovina foi inoculada na região cervical, na junção do terço médio e terço posterior e a distância igual das bordas superior e inferior do pescoço, ou escapular atrás da espinha da escápula, e a 20cm da cernelha, havendo distância mínima de 15 a 20cm entre as duas inoculações.

Os locais foram demarcados por tricotomia, evitando áreas com lesão ou nódulos de ectoparasitas. A espessura da dobra da pele foi determinada com o auxílio de cutímetro antes da inoculação. As medidas da dobra da pele do local da inoculação da tuberculina PPD aviária e da tuberculina PPD bovina foram anotadas nos respectivos campos no formulário para exame de brucelose e tuberculose.

Após 72 ± 6 horas da inoculação, foi realizada nova medida da dobra da pele no local de inoculação da tuberculina PPD aviária e da tuberculina PPD bovina, sendo os resultados anotados nos respectivos campos do formulário para exame de brucelose e tuberculose.

O aumento da espessura da dobra da pele foi calculado da seguinte maneira: da medida da dobra da pele 72 horas após a inoculação, subtraiu-se a medida da dobra da pele tomada no dia da inoculação para a tuberculina PPD aviária (ΔA) e a tuberculina PPD bovina (ΔB). Os resultados foram anotados nos respectivos campos no formulário para exame de brucelose e tuberculose. A diferença de aumento da dobra da pele provocado pela inoculação da tuberculina PPD bovina (ΔB) e da tuberculina PPD aviária (ΔA) foi calculada subtraindo-se ΔA de ΔB . Os resultados das diferenças ($\Delta B - \Delta A$) foram interpretados de acordo com os critérios definidos pelo Regulamento Técnico do PNCEBT.

Os animais reagentes inconclusivos foram submetidos ao segundo TCC em 60 dias. Os animais que apresentaram resultado inconclusivo novamente foram considerados positivos.

Os animais reagentes positivos foram retirados da propriedade no prazo de sete dias e conduzidos ao Hospital Veterinário da FMVZ da UNESP, campus de Botucatu, por ambulância da mesma instituição. Foram realizados eutanásia e exames necroscópicos.

Análise estatística

Estatísticas descritivas foram produzidas para caracterizar a população de rebanhos e animais incluídos neste estudo. As prevalências de brucelose e tuberculose em nível de rebanho (porcentagem de rebanhos com pelo menos um animal positivo) e animais (porcentagem de animais positivos dentro de cada rebanho). Também foi determinada a porcentagem de respostas fornecidas pelos produtores.

RESULTADOS

Visitaram-se 22 propriedades neste estudo, onde se realizaram testes diagnósticos em 736 animais para Tuberculose e em 512 animais para Brucelose. Os resultados estão expressos no Quadro 1. Encontraram-se 36,4% (8/22) das propriedades com positividade a uma das duas enfermidades. Para a Tuberculose, 13,6% (3/22) das propriedades havia bovinos positivos, e para Brucelose 31,8% (7/22). Dos animais testados para Tuberculose encontraram-se prevalência de 0,8% (6/736) e 2,3% (12/512) para Brucelose.

A partir do questionário aplicado aos produtores rurais obtiveram-se as seguintes informações: 81,8% (18/22) dos produtores criavam gado leiteiro há mais de 10 anos; 72,7% (16/22) dos produtores tinham a produção leiteira como única fonte de renda; 90,9% (20/22) das propriedades realizavam ordenha manual para extração do leite; 95,4% (21/22) dos produtores já ouviram falar sobre Brucelose bovina; 59,1% (13/22) dos produtores possuíam conhecimento do caráter zoonótico a Brucelose bovina; 59,1% (13/22) dos produtores manipulavam ou já havia manipulado feto e restos placentários sem a utilização de luvas; 95,5% (21/22) dos produtores consumiam leite in natura; 86,4% (19/22) dos produtores realizavam processamento de queijo na propriedade; 86,36% (19/22) dos produtores já ouviram falar sobre Tuberculose bovina; 27,3% (6/22) dos produtores possuíam conhecimento do caráter zoonótico a Tuberculose bovina; 18,2% (4/22) das propriedades possuíam assistência veterinária periódica; 86,4% (19/22) das propriedades nunca realizaram testes diagnósticos de Brucelose e Tuberculose; 9,1% (2/22) das propriedades entregavam leite para laticínio que exige testes diagnósticos de Brucelose e Tuberculose.

Ao exame necroscópico dos animais positivos para Tuberculose, observaram-se lesões características em pulmão e linfonodos, conforme ilustrado nas Figuras 1, 2 e 3. Notaram-se tubérculos de diversos tamanhos, com conteúdo caseoso, pontos de calcificação, diversos pontos de aderência pulmonar à cavidade torácica e fibrose.

DISCUSSÃO

Neste trabalho, encontrou-se prevalência de 0,8% de animais reagentes ao teste de tuberculose, não diferindo da situação epidemiológica nacional constatada entre 1989 e 1998 (BRASIL, 2006). A tuberculose se mostrou presente na população estudada no presente estudo, mas não em níveis alarmantes. No entanto, tratando-se de enfermidade de caráter crônico, infecto-contagiosa e com grande poder de disseminação entre os animais, qualquer foco encontrado na região pode se tornar problema sanitário e sócio-econômico, com proporções muito maiores do que os dados observados.

Em 1999, no Triângulo Mineiro, examinaram-se 1.600 propriedades e 23.000 animais. Constatou-se prevalência de 0,8% de bovinos infectados e 5% de propriedades com animais reagentes ao teste imunoalérgico. Outro estudo sobre a tuberculose bovina foi realizado em 2004, no Distrito Federal, com o objetivo de determinar a prevalência da doença e das características produtivas do rebanho bovino na região. O Distrito Federal possui um rebanho bovino de cerca de 120.000 cabeças, das quais foram amostradas 2.019 em 278 propriedades, observando-se prevalência de 0,4% de propriedades positivas e 0,03% de bovinos positivos (BRASIL 2006).

Neste estudo, encontrou-se prevalência de 2,3% (12/512) de animais e 31,6% (7/22) de focos positivos para Brucelose bovina, enquanto Kuroda et al. (2004) descreveram prevalência de 42,7% de focos e 3,6% para animais na microrregião da Serra de Botucatu, mostrando menores índices de positividade na população testada da mesma região.

Em 2009 foram concluídos estudos de prevalência da brucelose bovina em 15 unidades federativas (Poester et al. 2009b), com os seguintes resultados de prevalência para focos e animais respectivamente: Bahia com 4,2% e 0,66% (Alves et al. 2009); Goiás com 17,5% e 3% (Rocha et al. 2009); Mato Grosso com 41,2% e 10,2% (Negreiros et al. 2009); Rio de Janeiro com 15,4% e 4,1% (Klein-Gunnewiek et al. 2009); Santa Catarina com 0,32% e 0,06% (Sikusawa et al. 2009); Tocantins com 21,2% e 4,4% (Ogata et al. 2009); Distrito Federal com 2,5% e 0,16% (Gonçalves et al., 2009a); Minas Gerais com 6,0% e 1,1% (Gonçalves et al. 2009b); Rio Grande do Sul com 2,1% e 1,0% (Marvulo et al. 2009); São Paulo com 9,7% e 3,8% (Dias et al. 2009a); Espírito Santo com 9,0% e 3,5% (Azevedo et al. 2009); Mato Grosso do Sul com 41,5% e 12,6% (Chate et al. 2009); Paraná com 4,0% e 1,7% (Dias et al. 2009b); Rondônia com 35,2% e 6,2% (Villar et al. 2009) e Sergipe com 12,6% e 3,4% (Silva et al. 2009).

A presença de elevado percentual de rebanhos infectados na região estudada é preocupante especialmente por se caracterizar predominantemente por pequenos produtores e propriedades de subsistência.

As lesões necroscópicas encontradas nos animais positivos ao teste imunoalérgico foram sugestivas de tuberculose, condizendo com os dados encontrados na literatura. Conforme descrito por Menin et al. (2013), que analisaram 247 animais positivos ao teste de tuberculina, 92% apresentavam alguma sintomatologia clínica evidente, porém encontraram-se extensas lesões características no exame post-mortem. Segundo estes autores, a ausência de sinais clínicos não exclui a possibilidade de o animal estar infectado pelo bacilo da tuberculose, o que é comprovado pelo teste imunoalérgico e reafirmado pela necropsia. Isto corrobora com os achados neste trabalho, que de quatro animais positivos ao teste, nenhum deles manifestava qualquer sinal clínico e todos demonstraram alterações necroscópicas.

A maior incidência de lesões pulmonares e em linfonodos satélites se deve ao fato da doença respiratória ser a forma mais frequentemente observada, visto que a inalação é a principal porta de entrada do microorganismo. O complexo primário em geral, localiza-se nos pulmões com envolvimento de linfonodos mediastínicos ou bronquiais (Paes 2010).

O aspecto da lesão pulmonar varia com o tempo de evolução da lesão. Inicialmente há formação de pequenos nódulos branco-amarelados únicos ou múltiplos não encapsulados (Whipple et al. 1996). Estes nódulos possuem o centro necrótico amarelado e caseoso e os mais antigos podem ranger ao corte devido à calcificação. O tamanho das lesões pulmonares pode variar de acordo com a evolução, de milímetros a cerca de 30 ou 40cm de diâmetro. Estes focos iniciais podem se alastrar gradativamente, levando a pneumonia caseosa com envolvimento da pleura, que adquire padrão nodular (Radostitis et al., 2007). Nos animais do presente estudo foram encontradas lesões de diferentes tamanhos e aspectos, principalmente devido ao tempo de evolução da enfermidade.

Quanto ao questionário realizado com os pequenos produtores, notou-se que grande parte da população estudada apresentou o agronegócio leiteiro como única fonte de renda, e pertence ao ramo há pelo menos 10 anos.

A ordenha manual foi predominante entre eles, visto que se trata de pequenos produtores, que não possuem poder aquisitivo para investir em tecnologias para aumentar o seu rendimento.

Apenas pequena parcela dos produtores possui algum tipo de assistência médica veterinária em suas propriedades, demonstrando desconhecimento sobre a importância de ajuda profissional especializada para a manutenção da sanidade e qualidade do rebanho. Em 86,4% (19/22) das propriedades nunca foram realizados testes diagnósticos de tuberculose e brucelose, e os produtores encararam como gasto desnecessário, visto que 90,9% (20/22) das propriedades entregavam leite aos laticíneos que não exigiam estes testes para receber o leite antes de comercializar, gerando comodidade e contribuindo para o desconhecimento da necessidade de exames sanitários periódicos no rebanho.

O consumo de leite cru foi frequente entre os produtores rurais, realizado por 95,5% (21/22), o que denota o total desconhecimento quanto aos diversos patógenos que podem ser veiculados por este alimento.

A brucelose bovina é conhecida por quase todos os produtores (21/22), com exceção de um deles que desconhecia a existência da enfermidade. Apesar de conhecer esta doença nos bovinos, pouco mais da metade dos entrevistados sabia do caráter zoonótico e dos riscos que a enfermidade representa à saúde humana (13/22). Isto pode ser comprovado pela negligência na manipulação de fetos ou produtos de abortamento sem proteção de luvas, o que ocorreu em mais da metade da população em questão (13/22).

A tuberculose bovina é conhecida por 86,36% (19/22) dos produtores, porém apenas 27,3% (6/22) destes desconheciam que a enfermidade possa ser transmitida à espécie humana, aumentando as possibilidades de contaminação pelo desconhecimento de seu caráter zoonótico.

O PNCEBT foi implantado há mais uma década com o objetivo de diminuir a incidência destas enfermidades e estabelecer medidas sanitárias de controle, porém desde a sua criação a prevalência encontrada neste trabalho se manteve semelhante na região de Botucatu.

O pouco conhecimento e falta de subsídios dos pequenos produtores dificulta o sucesso do Programa Nacional de Controle. O desconhecimento da gravidade da enfermidade, de sua capacidade de disseminação e do seu caráter zoonótico faz com que os produtores não tenham a preocupação em realizar periodicamente os testes preconizados.

Outro fator limitante quanto execução do programa é que os animais positivos devem ser sacrificados. Caso isto não ocorra, a propriedade deverá ser interditada até a retirada do bovino

infectado, conforme estabelecido em normativa. Porém, não há nenhum tipo de benefício financeiro ou assistência governamental, que contemple os produtores que seguem as recomendações do Programa Nacional. Assim, o descarte dos animais, a princípio, é visto como prejuízo econômico pelo produtor. O desconhecimento e falta de instruções impossibilitam os proprietários de reconhecer os benefícios a médio e longo prazo de se realizar os testes diagnósticos e o manejo sanitário adequado do rebanho.

A lei 569 de 21 de dezembro de 1948 prevê no artigo 3º que deve ser pago a indenização devida pelo sacrifício do animal em casos de tuberculose. A avaliação deverá ser feita por uma comissão, composta de um representante do Governo Federal, obrigatoriamente profissional em veterinária, um representante do Governo Estadual e um representante das Associações Rurais criadas pelo Decreto-lei nº 7.449, de 9 de abril de 1945, substituído o último nas zonas ou regiões onde não existirem tais entidades, por um ruralista de reconhecida capacidade técnica, indicado pela parte interessada. Do laudo emitido caberá recurso, dentro do prazo de trinta dias para o Ministro da Agricultura, devendo ser interposto pelo representante do Governo Federal, quando este considerar excessiva a avaliação ou incabível a indenização; pelo proprietário do animal, coisas ou instalações rurais, quando for negada a indenização ou reputada insuficiente a avaliação. A indenização deverá ser paga pelo Governo da União à conta da dotação consignada em orçamento especialmente para esse fim de crédito adicional a que se dê o mesmo destino ou da dotação orçamentária destinada às despesas com a profilaxia e combate a epizoonias. Quando houver acordo ou convênio entre o Governo da União e o do Estado com a contribuição de uma ou outra entidade, para execução de serviços públicos de defesa sanitária animal um terço da indenização sairá da contribuição estadual, saindo da contribuição federal os dois terços restantes. O direito de pleitear a indenização prescreverá em 180 (cento e oitenta) dias, contados da data em que for sacrificado o animal (BRASIL 1948).

Em termos legais, há lei sancionada e em vigor que ampare os produtores em casos de perdas financeiras nos casos de tuberculose. Porém todos os pré-requisitos necessários para a aplicabilidade desta lei tornam de difícil execução e na maioria dos casos, inviável para pequenos produtores, que apresentam pouco ou nenhum conhecimento jurídico e difícil acesso a pessoas capacitadas que possam lhes fornecer informações técnicas.

O descarte dos animais positivos também é um empecilho encontrado pelos produtores. Enquanto não for realizado a realizado a descarte sanitário dos animais tuberculosos e/ou brucélicos, a propriedade ficará interdita pelas autoridades sanitárias. O PNCEBT preconiza que esses animais sejam preferencialmente encaminhados ao abate sanitário em estabelecimentos com serviço de inspeção de carcaças (BRASIL 2006). Porém existe grande dificuldade de encontrar frigoríficos que aceitem animais infectados, pois é necessário parar a linha de abate rotineira para realizar corretamente o abate sanitário e desinfecção do local após esse procedimento. Em geral os frigoríficos cobram dos produtores para abater animais enfermos, gerando custos ao produtor que já teve o prejuízo com a perda do animal.

Como alternativa descrita pelo PCNEBT eles ainda poderão ser destruídos na própria unidade de criação, desde que acompanhada pelo serviço oficial de defesa sanitária animal. Deverá ser realizada preferencialmente dentro da cova que o animal será enterrado. A cova deve ser feita em terreno estável e seco, distante de poços e cursos de água, de nascentes e de bebedouros, para evitar a contaminação do lençol freático. A carcaça deverá ser recoberta por um estrato de terra de aproximadamente dois metros para impedir que animais escavadores e minhocas veiculem os patógenos para a superfície (BRASIL 2006).

O descarte sanitário na propriedade também é oneroso para o produtor, fazendo com que muitos pequenos produtores não tenham condições financeiras de realizar tais procedimentos. A adesão ao programa e a realização dos testes diagnósticos não é medida obrigatória, portanto grande parcela dos produtores opta por não realizarem os testes diagnósticos em vista das dificuldades que encontrarão frente a um animal positivo a um dos testes.

O PNCEBT possui importantes limitações quanto à erradicação destas enfermidades, visto que qualquer programa em que haja somente exigências sem incentivo tem chances reduzidas de sucesso.

É de extrema importância a realização de projetos da educação continuada em saúde pública, especialmente relacionada ao consumo de produtos de origem animal não inspecionados e não submetidos a nenhum tipo de tratamento térmico. Além disso, devem-se enfatizar os cuidados a serem tomados na manipulação destes produtos e no manejo de animais, minimizando assim riscos para a saúde humana.

A prevalência de tuberculose e brucelose observadas neste trabalho corroboraram com os dados obtidos na literatura em âmbito nacional após a implementação do PNCBET, com prevalência de 0,8% para tuberculose bovina e 2,3% de brucelose bovina. O questionário realizado com os produtores rurais demonstrou pouco conhecimento sobre as enfermidades, seu poder zoonótico e de disseminação no rebanho.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela Bolsa de Mestrado concedida. À FMVZ/UNESP, campus Botucatu, pela infraestrutura utilizada para realização deste projeto. Aos produtores rurais por disponibilizarem seus animais para este estudo. À Prefeitura Municipal de Botucatu pela parceria no projeto “Lactícnio Escola”.

REFERÊNCIAS

- Alves S.J.A., Gonçalves V.S.P., Figueiredo V.C.F., Lôbo J.R., Bahiense L., Amaku M., Ferreira F., Ferreira Neto J.S. & Dias R.A. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado da Bahia. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 61(supl.1): 6-13.
- Azevedo S.S., Ferreira Neto J.S., Dias R.A., Ferreira F., Amaku M., Figueiredo V.C.F., Lôbo J.R., Gonçalves V.S.P., Souza A.C. & Vasconcellos S.A. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Espírito Santo. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 61(Supl.1): 19-26.
- Bennett A. Milk & Dairy Products. 2008. Disponível em <www.fao.org>. Acesso em: 20 jan. 2014.
- BRASIL. Lei 569, de 21 de dezembro de 1948. Estabelece medidas de defesa sanitária animal, e dá outras providências. *Diário Oficial da União, Brasília, DF, 21 de dezembro de 1948.* Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/1930-1949/L0569.htm. Acesso em: 18/12/2014.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Instrução Normativa nº2, de 10 de janeiro de 2001. Institui o Programa Nacional de Erradicação da Brucelose e Tuberculose. *Diário Oficial da União, Brasília, DF, 11 jan. 2001. Seção 1, p.5.*
- BRASIL. 2006. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Manual técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal. Brasília, CFMV (Conselho Federal de Medicina Veterinária) 2012. Disponível em: http://www.cfmv.gov.br/portal/_doc/guiabbbp_eutan%C3%A1sia_animal.pdf. Acesso em: 18/12/2014.
- Chate, S.C.; Dias, R.A.; Amaku, M.; Ferreira, F.; Moraes, G.M.; Costa Neto, A.A.; Monteiro, L.A.R.C.; Lôbo, J.R.; Figueiredo, V.C.F.; Gonçalves, V.S.P.; Ferreira Neto, J.S. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Mato Grosso do Sul. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 61 (supl.1): 46-55.
- Corbel, M.J.; Ariza, J.; Banai, M.; Cosivi, O.; Diaz, R.; Dranovskaya, E.A.; Elberg, S.S.; Garin-Bastuji, B.; Kolar, J.; Macmillan, A.P.; Mantovani, A.; Moriyon, I.; Mousa, A.; Nicoletti, P.; Semeinis, A.; Young, E.J. 2006. *Brucellosis in humans and animals.* Produced by the World Health Organization in collaboration with the Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Organization for Animal Health. Genève: World Health Organization, 92p.
- Dias, R.A.; Gonçalves, V.S.P.; Figueiredo, V.C.F.; Lôbo, J.R.; Lima, Z.M.B.; Paulin, L.M.S.; Gunnewiek, M.F.K.; Amaku, M.; Ferreira Neto, J.S.; Ferreira, F. 2009a. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de São Paulo. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.61, supl.1, p.118-125,
- Dias, J.A.; Müller, E.E.; Freitas, J.C.; Amaku, M.; Ferreira, F.; Silva, M.C.P.; Lôbo, J.R.; Figueiredo, V.C.F.; Gonçalves, V.S.P.; Ferreira Neto, J.S. 2009b. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Paraná. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 61(Supl.1): 66-76.
- EMBRAPA GADO DE LEITE. Vilela D. 2011. Disponível em: <http://www.cnppl.embrapa.br/sistemaproducao/> Acesso em 20/11/2014.
- Gonçalves, V.S.P.; Ribeiro, L.A.; Caldas, R.A.; Francisco, P.F.C.; Dias, R.A.; Ferreira, F.; Amaku, M.; Ferreira Neto, J.S.; Figueiredo, V.C.F.; Lôbo, J.R.; Borges, J.R.J. 2009a. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Distrito Federal. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 61(Supl.1): 14-18.
- Gonçalves, V.S.P.; Delphino, M.K.V.C.; Dias, R.A.; Ferreira, F.; Amaku, M.; Ferreira Neto, J.S.; Porto, T.B.; Alves, C.M.; Figueiredo, V.C.F.; Lôbo, J.R. 2009b. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado De Minas Gerais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 61(Supl.1): 53-45,

- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Produção da Pecuária Municipal. Volume 38. 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/ppm2010.pdf>. Acesso 20/11/2014.
- Klein-Gunnewiek, M.F.C.; Amaku, M.; Dias, R.A.; Ferreira, F.; Gitti, C.B.; Pereira, L.A.; Figueiredo, V.C.F.; Lôbo, J.R.; Gonçalves, V.S.P.; Ferreira Neto, J.S. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Rio de Janeiro. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 61(Supl.1): 77-84.
- Kuroda, R.B.S.; Paulin, L.M.S.; Nozaki, C.N.; Silva Junior, F.F.; Geronutti, L.; Megid, J. 2004. Prevalência da brucelose bovina na microrregião da Serra de Botucatu – estudo comparativo dos resultados das técnicas de soroprecipitação lenta em tubos, 2-Mercaptoetanol. Revista Arq. Inst. Biológico. 71(2): 137-142.
- Lôbo J.R. 2008. Análise custo-benefício da certificação de propriedades livres de tuberculose bovina. 84f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília.
- Marvulo, M.F.V.; Ferreira, F.; Dias, R.A.; Amaku, M.; Groff, A.C.M.; Gonçalves, V.S.P.; Figueiredo, V.C.F.; Lôbo, J.R.; Ferreira Neto, J.S. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Rio Grande do Sul. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 61(Supl.1): 126-134.
- Menin, I., Fleith, R., Reck, C., Marlow, M., Fernandes, P., Pilati, C., Báfica, A. 2013. Asymptomatic Cattle Naturally Infected with *Mycobacterium bovis* Present Exacerbated Tissue Pathology and Bacterial Dissemination. PLOS ONE. 8(1): 1-11.
- Müller E.E. 2002. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção de mastite. In: Anais do II Sul-Leite: Simpósio sobre sustentabilidade de pecuária leiteira na Região Sul do Brasil. p. 206-217.
- Negreiros, R.L.; Dias, R.A.; Ferreira, F.; Ferreira Neto, J.S.; Gonçalves, V.S.P.; Silva, M.C.P.; Figueiredo, V.C.F.; Lôbo, J.R.; Freitas, J.; Amaku, M. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Mato Grosso. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 61(Supl.1): 56-65.
- Nero L.A.; Mattos, M.R.; Beloti, V.; Barros, M.A.F; Netto, D.P.; Pinto, J.P.A.N.; Andrade, N.J.; Silva, W.P.; Franco, B.D.G.M. 2004. Hazards in non-pasteurized milk on retail sale in Brazil: prevalence of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and chemical residues. Brazilian Journal of Microbiology 35 (3): 211-215.
- Ogata, R.A.; Gonçalves, V.S.P.; Figueiredo, V.C.F.; Lôbo, J.R.; Rodrigues, A.L.; Amaku, M.; Ferreira, F.; Ferreira Neto, J.S.; Dias, R.A. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Tocantins. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 61(Supl.1): 126-134
- Paes A.C. 2010. Tuberculose bovina. In: Bovinocultura de corte. Piracicaba: FEALQ, p.993-1017.
- Poester F.P. 2009a. Brucelose. In: NAPOLI, L.; SARTOR, D.R.; MARTINS, J.P. (Orgs.). Manual de Zoonoses. Porto Alegre: Programa de Zoonoses Região Sul. 1: 9-21.
- Poester F.P.; Figueiredo, V.C.R.; Lôbo, J.R.; Gonçalves, V.S.P.; Lage, A.P.; Roxo, E.; Mota, P.M.P.C.; Müller, E.E.; Ferreira Neto, J.S. 2009b. Estudos de prevalência da brucelose bovina no âmbito do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose: Introdução. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 61(Supl.1): 1-5.
- Radostits, M.O.; Gay, C.C.; Hinchcliff, K.W.; Constable, P.D. 2007. Disease associated with bacteria – IV. In: Veterinary medicine: a textbook of the disease of cattle, horses, sheep, pigs, and goats. 10.ed. New York: Saunders, p.1007-1060.
- Sikusawa, S.; Amaku, M.; Dias, R.A.; Ferreira Neto, J.S.; Martins, C.; Gonçalves, V.S.P.; Figueireso, V.C.F.; Lôbo, J.R.; Ferreira, F. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Santa Catarina. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 61(Supl.1): 103-108.
- Silva, V.G.S.O.; Dias, R.A.; Ferreira, F.; Amaku, M.; Costa, E.L.S.; Lôbo, J.R.; Figueiredo, V.C.F.; Gonçalves, V.S.P.; Ferreira Neto, J.S. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Sergipe. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 61(Supl.1): 109-117.
- Villar, K.S.; Amaku, M.; Dias, R.A., Ferreira Neto, J.S.; Benitez, F.; Gonçalves, V.S.P.; Figueiredo, V.C.F.; Lôbo, J.R.; Ferreira, F. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Rondônia. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 61(Supl.1): 85-92.
- Whipple D.L., Bolin C.A. & Miller J.M. 1996. Distribution of lesions in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. J Vet Diagn Invest. 8: 351-354.

Legenda da Figura

Fig.1. Tubérculo de 15cm retirado de lobo pulmonar esquerdo, com aspecto caseoso e fibrosado. Serviço de Enfermidades Infecciosas dos Animais do Depto. de Higiene Veterinária e Saúde Pública da FMVZ/UNESP, Botucatu.

Fig. 2. Linfonodo pré-escapular tubérculo caseoso com pontos de calcificação. Serviço de Enfermidades Infecciosas dos Animais do Depto. de Higiene Veterinária e Saúde Pública da FMVZ/UNESP, Botucatu.

Fig. 3. Aderência pulmonar à parede torácica. Serviço de Enfermidades Infecciosas dos Animais do Depto. de Higiene Veterinária e Saúde Pública da FMVZ/UNESP, Botucatu.

Quadro 1. Propriedades visitadas e resultados dos exames de Tuberculina e soroaglutinação para Brucelose. Botucatu, 2014.

Propriedade Rural	Quantidade de animais testados		Reagentes ao teste de Tuberculina	Reagentes aos testes sorológicos de Brucelose	Total de animais retirados da propriedade
	Brucelose	Tuberculose			
1	11	18	0	0	0
2	19	26	0	0	0
3	45	67	0	0	0
4	22	32	1	1	2
5	13	15	0	0	0
6	52	84	1	0	1
7	12	27	4	2	4
8	33	59	0	0	0
9	14	17	0	0	0
10	26	32	0	0	0
11	14	18	0	0	0
12	13	26	0	0	0
13	3	3	0	0	0
14	15	19	0	0	0
15	54	62	0	2	2
16	28	38	0	0	0
17	21	27	0	1	1
18	31	54	0	0	0
19	8	10	0	2	2
20	29	37	0	0	0
21	10	14	0	1	1
22	39	51	0	3	3
TOTAL	512	736	6	12	16

Figura 1.

Figura 2.



Figura 3.



ANEXOS

ANEXO I - QUESTIONÁRIO

1. Propriedade:
2. Proprietário:
3. Há funcionários? Quantos?
4. Quantidade de animais
5. Origem dos animais
6. Quanto tempo faz a criação?
7. É a única fonte de renda?
8. Quantos animais em lactação?
9. Quantidade de machos, quantidade de fêmeas:
10. Qual o tipo de ordenha?
11. Qual o tipo de alimentação?
12. Qual a fonte da água?
13. Compra e vende animais?
14. Data da última compra
15. Data da última venda
16. Qual laticínio que entrega o leite?
17. Faz processamento de queijo?
18. Já ouviu falar em Brucelose?
19. Ela pode ser transmitida ao homem?
20. Quando auxilia em partos ou manipula restos de placenta ou feto utiliza luvas?
21. Já ouviu falar em Tuberculose?
22. Ela pode ser transmitida ao homem?
23. A propriedade tem assistência veterinária periódica
24. Vacinas realizadas
25. Já realizou testes de tuberculose e brucelose? Com que frequência?
26. O laticínio que recebe o leite exige atestado de brucelose e tuberculose?