



LAURA THAYSE FARIA

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NO REHAGRO E
NO LABORATÓRIO DE ZONÓSES BACTERIANAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**LAVRAS - MG
2023**

LAURA THAYSE FARIA

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NO REHAGRO E NO
LABORATÓRIO DE ZOONOSES BACTERIANAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO**

Relatório de Estágio Supervisionado apresentado à
Universidade Federal de Lavras como parte das
exigências do Curso de Medicina Veterinária, para a
obtenção do título de Bacharel.

Prof. Dra. Elaine Maria Seles Dorneles
Orientadora

**LAVRAS- MG
2023**

LAURA THAYSE FARIA

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NO REHAGRO E NO
LABORATÓRIO DE ZONOSSES BACTERIANAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO**

**SUPERVISED INTERNSHIP CARRIED OUT AT REHAGRO AND IN THE
LABORATORY OF BACTERIAL ZONOSSES AT THE UNIVERSITY OF SÃO
PAULO**

Relatório de Estágio Supervisionado apresentado à
Universidade Federal de Lavras como parte das
exigências do Curso de Medicina Veterinária, para a
obtenção do título de Bacharel.

APRESENTADO em 27 de junho de 2023.

Dra. Elaine Maria Seles Dorneles	UFLA
Dra. Rafaella Silva Andrade	UFLA
Msc. Maysa Serpa Gonçalves	UFLA

Prof. Dra. Elaine Maria Seles Dorneles
Orientadora

**LAVRAS- MG
2023**

AGRADECIMENTOS

À Deus e a Nossa Senhora, por todas as graças recebidas;

Aos meus pais, Marcelo e Aparecida, por todo amor, apoio e incentivo; Ao meu irmão, Arthur, por todo carinho;

Ao meu namorado, Vitor, por sempre acreditar em meu potencial e por todo amor a mim dado;

A toda minha família, que mesmo de longe sempre torceram por mim;

À Isabella, Paola e Tonho, por todos os momentos compartilhados durante a graduação, desde as alegrias até as incertezas;

À Cecília, que me fez companhia em nossa casa em Lavras, por toda amizade, conversas e momentos alegres divididos;

Aos grupos que fiz parte, em especial a Terra Júnior e o GERE;

À professora Elaine, por todas as oportunidades e ajuda concedida em diversos momentos, desde a primeira vez em que conversamos;

À Erika, Maysa e Rafaella, que mesmo em pouco tempo de convívio no laboratório me estenderam a mão em todas as vezes que precisei;

À Universidade Federal de Lavras, por ter me ajudado a crescer como profissional;

À Rehagro, por todas as oportunidades, em especial ao meu tutor, Bruno Guimarães, um grande exemplo de profissional;

Ao LZB, em especial ao professor Marcos Bryan, Gisele Oliveira e Denise, por todo o aprendizado;

A todos que de alguma forma tocaram o meu caminho, moldando minha vida em diversos aspectos.

RESUMO

A disciplina PRG107 é realizada no último período do curso de graduação em medicina veterinária na Universidade Federal de Lavras, última etapa necessária para a obtenção do diploma. Este relatório tem como objetivo descrever as atividades realizadas durante o estágio obrigatório que foi feito em duas etapas, ambos sob orientação da docente Prof. Dra. Elaine Maria Seles Dorneles, totalizando 408 horas. A primeira parte foi realizada no Rehagro – recursos humanos no agronegócio, entre 23/03/2023 e 28/04/2023, com a supervisão de Bruno Marinho Mendonça Guimarães, e a segunda no Laboratório de Zoonoses bacterianas da Universidade de São Paulo, entre 02/05/2023 e 14/06/2023, supervisionado pelo Prof. Dr. Marcos Bryan Heinemann. Ambos os momentos foram muito importantes para a consolidação de conhecimentos adquiridos ao longo da graduação, principalmente aos voltados a bovinocultura leiteira, zoonoses e métodos diagnósticos usados em laboratório, além de trazerem à tona aspectos relacionados ao mercado de trabalho, auxiliando em uma boa formação para a futura carreira.

Palavras-chave: Bovinocultura leiteira. Diagnóstico. Zoonoses.

ABSTRACT

The PRG107 discipline is carried out in the last period of the graduation course in veterinary medicine at the Federal University of Lavras, the last step necessary to obtain the diploma. This report aims to describe the activities carried out during the mandatory internship, which was carried out in two stages, both under the guidance of Professor Prof. Dr. Elaine Maria Seles Dorneles, totaling 408 hours. The first part was held at Rehagro – human resources in agribusiness, between 03/23/2023 and 04/28/2023, supervised by Bruno Marinho Mendonça Guimarães, and the second at the Bacterial Zoonoses Laboratory of the University of São Paulo, between 05/02/2023 and 06/14/2023, supervised by Prof. doctor Mark Bryan Heinemann. Both moments were very important for the consolidation of knowledge acquired during graduation, especially those related to dairy cattle, zoonoses and diagnostic methods used in the laboratory, in addition to bringing up aspects related to the job market, helping in a good training for the future career.

Keywords: Dairy cattle. Diagnosis. Zoonoses.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Encontro online de estagiários para discussão de exercícios e troca de experiências.	14
Figura 2 – Amostra pronta para a análise na Penn State.	16
Figura 3 – Aferição da umidade em grãos.	17
Figura 4 – Animal acometido por mastite grave, vindo a óbito posteriormente.	19
Figura 5 – CMT sendo realizado pela estagiária.	20
Figura 6 – Vista da entrada principal do VPS.	23
Figura 7 – Vista da entrada principal do LZB.	24
Figura 8 – Sala principal.	25
Figura 9 – Sala de biologia molecular.	26
Figura 10 – Meio EMJH turvo, mostrando resultado positivo para Leptospirose.	28
Figura 11 – EMJH pronto para uso, com aspecto límpido, mostrando que ainda não foi utilizado.	29
Figura 12 – Parte do processo de extração sendo realizado pela estagiária.	30
Figura 13 – Kit comercial PureLink Genomic DNA Mini kit da Invitrogen.	30
Figura 14 – Termociclador utilizado para amplificação do DNA.	32
Figura 15 – Cuba utilizada para eletroforese em gel de agarose.	33
Figura 16 – Fotodocumentador utilizado para leitura do gel.	33
Figura 17 – Preparo para realização da titulação.	34
Figura 18 – Fragmento recebido para análise com lesão sugestiva de tuberculose.	37
Figura 19 – Tecidos macerados sendo diluídos em solução salina.	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Reagentes utilizados no mix para PCR para <i>Leptospira</i> spp.	31
Tabela 2 – Sorovares utilizados na soroaglutinação microscópica.	35

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

AINE	Anti-inflamatório não esteroide
ATB	Antibiótico
CBT	Contagem bacteriana total
CCS	Contagem de células somáticas
CMT	Californian mastitis test
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EMJH	Ellighausen, McCullough, Johnson e Harris
EPI's	Equipamentos de proteção individual
FDNfe	Fibra fisicamente efetiva
HPC	Cloreto de hexadecilpiridínio
LZB	Laboratório de Zoonoses Bacterianas
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
PNCEBT	Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal
PTH	Paratormônio
SAM	Soroaglutinação Microscópica
VPS	Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	CAPÍTULO 1. REHAGRO – RECURSOS HUMANOS NO AGRONEGÓCIO	13
2.1	Descrição da empresa e atividades desenvolvidas	13
2.2	Visitas técnicas	15
2.3	Ensino Leite.....	21
3	CAPÍTULO 2. LABORATÓRIO DE ZOONOSES BACTERIANAS – USP	23
3.1	Descrição do Laboratório	23
3.2	Descrição das atividades realizadas.....	26
3.3	Leptospirose	27
3.3.2	Reação em cadeia da polimerase	29
3.3.3	Teste de Soroaglutinação Microscópica	34
3.4	Tuberculose	36
3.4.1	Técnica de descontaminação e cultura bacteriana	37
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1 INTRODUÇÃO

A disciplina PRG107, estágio supervisionado, é a última etapa para a conclusão do curso de medicina veterinária na Universidade Federal de Lavras, sendo realizada no último período da graduação. São 408 horas práticas e 68 teóricas, estas últimas direcionadas a escrita do relatório de estágio. É um momento importante, onde o aluno pode direcionar seus esforços para as áreas que mais tenha interesse, buscando uma melhor capacitação profissional.

O aluno escolheu dois locais para realização do estágio supervisionado, definidos pela afinidade nas áreas durante a graduação, ambos com a orientação da docente Prof. Dra. Elaine Maria Seles Dorneles. A primeira parte foi realizada na empresa Rehagro – Recursos Humanos no Agronegócio, com a supervisão de Bruno Marinho Mendonça Guimarães, totalizando 200 horas. O estagiário foi alocado na equipe Leite, voltada a bovinocultura leiteira. Diversas atividades foram desenvolvidas, como: visitas técnicas, auxílio na parte de ensino, reuniões para discussão de casos e execução de exercícios semanais com temas pertinentes a atividade leiteira.

Em um segundo momento, com a supervisão do Prof. Dr. Marcos Bryan Heinemann, o estágio teve continuidade no laboratório de zoonoses bacterianas da Universidade de São Paulo – USP, com duração de 208 horas. O estagiário desenvolveu um trabalho previamente descrito em um plano de trabalho proposto pelo supervisor, em atividades laboratoriais envolvendo as doenças Leptospirose e Tuberculose.

As duas partes do estágio supervisionado descritas no relatório foram muito proveitosas para o aluno, envolvendo assuntos muito pertinentes para as áreas de interesse do mesmo: o agronegócio e a saúde pública. Foi um momento importante para colocar em prática a teoria aprendida durante os anos de graduação, além de conhecer melhor o mercado de trabalho e fazer contatos importantes para a futura carreira. O objetivo deste relatório é relatar as atividades desenvolvidas durante o estágio supervisionado.

2 CAPÍTULO 1. REHAGRO – RECURSOS HUMANOS NO AGRONEGÓCIO

O agronegócio é responsável por grande parte do PIB brasileiro, representando em 2022, 24,8% do total (CEPEA, 2023), e a cadeia leiteira tem grande participação neste número. Atualmente, o Brasil é o terceiro maior produtor de leite no mundo, produzindo em 2021, segundo dados do IBGE, mais de 30 bilhões de litros, com uma produtividade por animal de 2.500 litros vaca/ano (IBGE, 2021). E, ao longo das últimas duas décadas, o setor vem passando por grandes transformações, que aumentaram em praticamente 80% da produção de leite, com quase o mesmo número de animais ordenhados (EMBRAPA, 2020).

Investimentos em genética, buscando melhorar cada vez mais o rebanho, e a preocupação com o bem-estar animal, são exemplos de transformações que vem ocorrendo na cadeia produtiva. Isso engloba a formação de bons técnicos, que saibam unir os conhecimentos teóricos a prática e levem esses ensinamentos para o produtor, para que juntos possam trabalhar buscando melhores resultados na produção leiteira. Essa é justamente uma das maiores preocupações da empresa Rehagro em relação aos seus estagiários, conseguir unir teoria à prática. O processo seletivo de estágio é bem estabelecido, a princípio os candidatos assistem palestras e participam de resoluções de exercícios de fazendas reais atendidas pelo grupo. Ao serem selecionados, essa prática continua, com resolução de exercícios semanais e encontros mensais para discussão de temas relevantes para a cadeia leiteira. Em paralelo, ocorrem as visitas as fazendas com os técnicos, que auxiliam na melhor compreensão da teoria, bem como o que é discutido em reuniões é colocado em prática nas consultorias.

Essa primeira parte do estágio obrigatório foi muito importante para a consolidação dos conhecimentos acerca da pecuária leiteira, com diversas oportunidades de troca de conhecimentos não apenas com os colaboradores Rehagro, mas também com produtores, funcionários das propriedades e alunos da pós-graduação e da capacitação, que são oferecidos pela empresa.

2.1 Descrição da empresa e atividades desenvolvidas

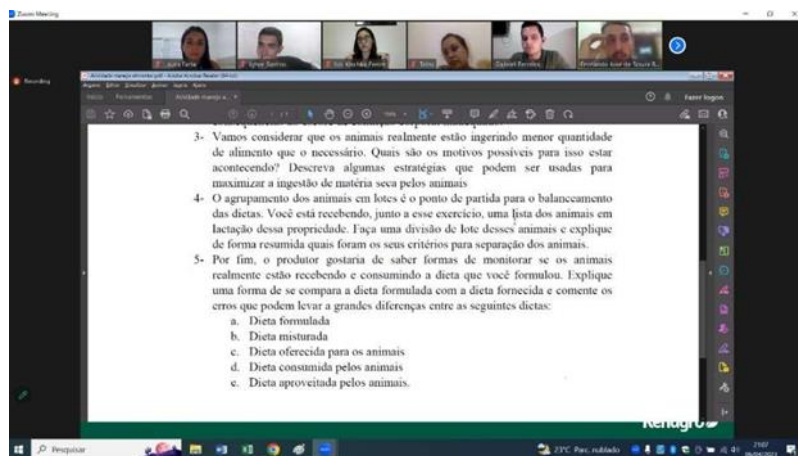
A primeira parte do estágio obrigatório foi realizado no Rehagro – Recursos humanos no agronegócio, de 23/03/2023 a 28/04/2023, totalizando 200 horas, com supervisão do tutor Bruno Marinho Mendonça Guimarães, médico veterinário e técnico na empresa. O grupo, fundado em 2002, tem sede em Belo Horizonte e filial em Lavras – Minas Gerais. A consultoria e faculdade Rehagro contam com quatro grandes frentes: bovinocultura leiteira, bovinocultura

de corte, grãos e cafeicultura. É uma empresa de caráter privado, que tem como objetivo levar conhecimento ao campo de forma simples e acessível, e conta com técnicos que atendem diversos estados do país. Atualmente a empresa atende mais de 130 propriedades leiteiras, totalizando mais de um milhão de litros de leite por dia (REHAGRO, 2023).

Ao ingressar na empresa, após uma seleção por processo seletivo, o estagiário é designado a um tutor, que será o responsável por traçar os passos do mesmo durante a permanência na empresa. As atividades desenvolvidas no estágio foram realizadas na Equipe Leite, com maior foco na área do ensino (Faculdade Rehagro), e acompanhamento de técnicos a visitas em propriedades atendidas pela empresa. Dentre as atividades realizadas, havia a resolução semanal de exercícios com casos reais de fazendas atendidas pela empresa. Os temas eram diversos com ênfase para a área técnica, como, por exemplo, exercícios de nutrição e reprodução animal, e gestão, com objetivo de aperfeiçoar o uso das ferramentas Excel e Ideagri (software usado nas fazendas para o lançamento de dados).

Além disso, em torno de duas vezes ao mês encontros eram realizados para a discussão dos exercícios e trocas de experiências entre os estagiários (Figura 1), sempre acompanhado por um técnico com expertise na área referente ao tema proposto nos últimos dois exercícios. Uma oportunidade interessante foi a realização de uma apresentação em dupla para os colegas de estágio, com o tema “Doenças metabólicas no período de transição”, no qual resultou em discussões interessantes e conhecimento aprofundado sobre o tema.

Figura 1 – Encontro online de estagiários para discussão de exercícios e troca de experiências.



Fonte: Da autora, 2023.

2.2 Visitas técnicas

Duas rodadas de visitas técnicas foram realizadas. Em um primeiro momento, foram visitadas fazendas na região do Vale do Paranaíba – São Paulo, com a técnica Júlia Dias, entre os dias 29 e 31/03/2023. E em um segundo momento, fazendas da região de Serrania – Minas Gerais, com a técnica Gabriela Magioni, de 12 a 15/04/2023.

Foram três dias de visitas a região do Vale do Paranaíba, acompanhando a técnica especializada em nutrição de bovinos leiteiros, Júlia Dias. Em todas as fazendas, as dietas do rebanho inteiro já estavam estabelecidas, e o objetivo das visitas era verificar a aceitação pelos animais e acompanhamento de rotina da parte nutricional das fazendas. O acompanhamento dos índices zootécnicos foi realizado observando os dados lançados no software Ideagri (ganho de peso diário das bezerras, por exemplo), como também em rondas pela fazenda, passando por todos os setores e observando se os animais estavam visivelmente bem.

Um ponto importante para evitar a seleção de alimentos pelos animais foi a observação do funcionamento do vagão misturador por um período de tempo, com intuito de verificar se a mistura estava sendo feita de forma correta e homogênea. Uma mistura bem-feita dos alimentos evita que os animais consigam separar os de sua preferência no cocho, o que traria prejuízos, pois a dieta não estaria sendo consumida da forma que foi esperada para o aumento da produção de leite. Outro problema seria a seleção dos concentrados, deixando o volumoso de lado, o que pode levar a quadros de acidose metabólica, pois pode ocorrer uma diminuição do pH ruminal. Além disso, uma ferramenta eficaz para o controle e verificação do teor de fibras da dieta das vacas leiteiras é a Penn State (Figura 2).

A Penn State é um conjunto de peneiras que conta com quatro repartições – superior, intermediária, inferior e fundo. Ela tem orifícios de 19 mm, 8 mm e de 4 mm, respectivamente. Com ela, é possível aferir a porção de fibra fisicamente efetiva (FDNfe) presente na dieta, responsável por garantir o bom funcionamento do rúmen. Esse separador foi criado na Pennsylvania State University, em meados da década de 90, com o intuito de determinar, à campo, o tamanho das partículas usadas na dieta, mimetizando o aparelho usado em laboratórios na época para essa finalidade (LAMMERS, 1996).

Figura 2 – Amostra pronta para a análise na Penn State.



Fonte: Da autora, 2023.

O tamanho das partículas afeta a ruminação, a qual é importante para a fragmentação dos alimentos para que os microrganismos do rúmen consigam aproveitá-los. Outro fator importante é a produção de saliva, que é uma substância tampão para o rúmen, rica em bicarbonato, ajudando na neutralização do pH do líquido ruminal, e a sua produção é estimulada pela mastigação dos animais (WELCH, 1986). Estes fatores citados, são estimulados pela FDNfe, sendo o tamanho das fibras responsáveis por tal correspondentes ao tamanho dos orifícios presentes nas peneiras.

Outro ponto verificado nas visitas foi a aferição da matéria seca, muito importante de ser realizada, já que uma dieta não deve ser calculada em matéria natural. Com isso, é tida a certeza de que os alimentos que estão sendo usados na preparação da ração estão sendo colocados em quantidades necessárias para suprir as necessidades dos animais e aumentar a produção de leite. A matéria seca de um alimento é bem simples de ser calculada, e nesse caso usou-se um aparelho chamado Koster, onde em alguns minutos após o ingrediente ser colocado, toda a água é retirada e a matéria seca pode ser medida. Primeiro, a peneira do aparelho é pesada e seu peso anotado.

Em seguida, a balança é tarada e cem gramas da amostra é pesada. A peneira é encaixada no Koster, e o aparelho fica ligado por cerca de cinquenta minutos, e, após esse período, as amostras são pesadas algumas vezes de dois em dois minutos, até o peso ficar estável. Esse

peso tido por último deve ser descontado do valor da peneira anotado inicialmente, e assim será encontrado o valor referente a matéria seca do alimento, em porcentagem.

Nas fazendas visitadas a silagem de milho e o milho rehidratado foram os alimentos usados nos testes, e eram buscados números em torno de 30% e 35 % de matéria seca (GONÇALVES et al., 2009), para a silagem e o rehidratado, respectivamente. Para os milhos em grãos, um aparelho de medição de umidade foi utilizado (Figura 3), buscando por resultados em torno de 13% (EMBRAPA, 2011), o que foi encontrado nas fazendas.

Figura 3 – Aferição da umidade em grãos.



Fonte: Da Autora, 2023.

No caso de animais alocados no pré-parto, a dieta realizada é a chamada aniônica, para diminuir o risco de hipocalcemia pós-parto e conseqüentemente outras doenças metabólicas, problemas que ainda são um grande gargalo na produção leiteira. Para entender se a dieta está funcionando, a aferição do pH de urina é um ponto chave, pois animais nesta dieta entram em uma leve acidose metabólica, o que leva a uma diminuição do pH, sendo entre 5 e 7 os números esperados para considerar a dieta como eficiente.

O paratormônio (PTH) é o responsável por estimular o envio de cálcio das células para o sangue, e em meio ácido, a ativação do PTH é aumentada. Ou seja, o objetivo da dieta é produzir uma leve diminuição do pH sanguíneo, através de uma dieta baseada em aumento de ânions (que tem carga negativa), levando o organismo a reter cátions (carga positiva),

principalmente o hidrogênio (H⁺). A diminuição do pH sanguíneo leva conseqüentemente a diminuição do pH da urina, como já citado (RAMELLA et al., 2021).

Algo de extrema importância realizado durante as visitas é a conversa com os funcionários de todos os setores. Durante essas conversas, ter uma escuta ativa, entender o que o funcionário quer dizer e quais são as implicações e dificuldades que ele tem para desempenhar o seu papel de uma melhor forma. Dessa forma, compreender e ensinar como melhorar tal função, trazendo as técnicas descritas em literatura de uma forma simples, fácil e acessível.

Já em outro momento, na segunda data estabelecida para visitas técnicas, entre 12 a 15/04/2023, o trabalho acompanhado foi na região de Serrania -MG, em um projeto desenvolvido junto a um laticínio da região (Corples). O projeto é voltado a qualidade do leite, sendo a técnica da Rehagro especializada no assunto, Gabriela Magioni, responsável pelas consultorias, e elas são desenvolvidas nos produtores que demonstrarem interesse e se propuserem a realizar o que é aconselhado durante as visitas. Caso eles mostrem essa disponibilidade, o laticínio cobre todos os custos, ficando o produtor isento desse valor.

As visitas consistem em acompanhar as ordenhas, observar pontos de falha e realizar coletas ou o teste CMT (Californian Mastitis Test), quando necessário. O equipamento de ordenha sempre é averiguado, pois um mau funcionamento leva a lesões de teto e a ordenha incompleta, além da falta de higiene culminar em mastite e ao aumento de CBT (contagem bacteriana total) no tanque. Quando é realizada a primeira visita na propriedade é coletado de todos os quatro quartos de teto de todos os animais em lactação amostras compostas, que são enviadas a um laboratório de confiança para procura dos patógenos causadores de mastite clínica e subclínica na fazenda, buscando principalmente o *Staphylococcus aureus*, microrganismo contagioso e com baixa taxa de cura, sem tratamentos eficazes comprovados atualmente. Quando um animal é identificado com este patógeno, a consultora se reúne com os proprietários da fazenda para discutir possíveis estratégias, que dependem principalmente do tamanho do rebanho. Em um rebanho maior, o mais aconselhado é o descarte do animal, pensando em não proliferar o problema. Mas, a maioria dos produtores atendidos pelo projeto são pequenos, com rebanhos com menos de 50 animais, inviabilizando esta alternativa. A solução nestes casos é realizar a linha de ordenha, deixando sempre esses animais para serem ordenhados por último, na tentativa de não espalhar o patógeno, não sendo realizado tratamento em caso de mastite subclínica.

Em caso de mastite clínica, a técnica estabelece protocolos para tratamento do rebanho, sendo as drogas eleitas em casos leves sempre a base de cefalosporinas ou penicilinas, com aplicação intramamária, além de também deixar descrito o complemento do tratamento em

casos moderados e graves, que consiste em AINE (anti-inflamatório não esteroide) + ATB (antibiótico) intramamário e AINE + ATB intramamário e intravenoso + soro, respectivamente. Em casos graves, o patógeno causador se espalhou pelo organismo, e o animal corre risco de ir a óbito, por isso o uso de antibióticos a nível intravenoso é aconselhado. Durante uma das visitas as fazendas, um animal com mastite grave foi atendido, porém, o tratamento não foi suficiente, vindo a óbito no dia seguinte (Figura 4).

Figura 4 – Animal acometido por mastite grave, vindo a óbito posteriormente.



Fonte: Da autora, 2023.

Em outras visitas, caso o produtor ainda não tenha se adaptado a realizar o CMT, ele será feito durante a visita (Figura 5). O objetivo principal é identificar os animais com mastite subclínica (vacas que tem uma CCS > 200 mil células somáticas por ML) e mensurar a ocorrência da mesma na fazenda, entendendo o possível impacto do leite desses animais na CCS do tanque. Os números buscados para a mastite subclínica em uma propriedade a nível mensal são de prevalência <20%, e incidência <10%, segundo dados fornecidos pela Rehagro.

Figura 5 – CMT sendo realizado pela estagiária.



Fonte: Da autora, 2023.

Um ponto muito frisado pela consultora é a rotina de ordenha, que tem os principais pontos, segundo a Rehagro, descritos a seguir:

- Manejo tranquilo de animais até a ordenha;
- Utilização de luvas;
- Teste da caneca, desprezando os três primeiros jatos de cada teta;
- Solução pré dipping cobrindo todo o teta, com ação de trinta segundos;
- Secagem da lateral e ponta dos tetos;
- Colocação das teteiras alinhadas, sem entrada de ar, de 60 a 90 segundos após a estimulação;
- Retirada das teteiras quando há redução do fluxo de leite;
- Solução pós dipping cobrindo todo o teta;
- Linha de ordenha.

Este projeto beneficia não apenas o produtor, mas também o laticínio, que visa entregar produtos de qualidade aos consumidores finais.

2.3 Ensino Leite

O foco maior durante o período de estágio foi no ensino, atuando principalmente na pós-graduação em bovinocultura leiteira (PL), e pontualmente na capacitação em pecuária leiteira (GPL).

A equipe ensino leite faz parte da faculdade Rehagro e é composta por técnicos da empresa que tenham experiências na área da consultoria, mas que também tenham apreço pela capacitação de pessoas. O fato de ser composta por técnicos com experiência a campo mostra como a empresa une teoria e prática, levando para os alunos os resultados comprovados que têm em seus clientes e parceiros.

Os produtos acompanhados pelo estagiário têm diferentes focos. A PL, é uma pós-graduação, com duração de dois anos, podendo ser feita apenas por pessoas que tenham o nível superior completo, e o nível dos assuntos abordados é mais aprofundado. Já a GPL, é uma capacitação com duração média de oito meses, podendo ser realizada por qualquer pessoa que tenha interesse na pecuária leiteira, independentemente do nível de conhecimento que tenha previamente. É um produto com linguagem mais básica e acessível, sem perder a qualidade.

Ambos são ministrados por técnicos da Rehagro com anos de experiência, unindo teoria e prática, além de contar com professores universitários convidados, renomados em sua área de pesquisa. As aulas são gravadas e liberadas por módulos, podendo ser acessadas a qualquer momento pela plataforma Canvas. Cada turma tem aulas ao vivo para tirar dúvidas do módulo do momento e discutir sobre o assunto. Geralmente elas acontecem a cada 21 dias, sendo o professor responsável pelo módulo o responsável pela videoconferência.

Os estagiários acompanham essas aulas todas as semanas, já que são diversas turmas acontecendo ao mesmo tempo. No dia do acompanhamento, o estagiário é responsável por abrir a chamada, iniciar a reunião, apresentar o professor que irá conduzi-la, e levar possíveis dúvidas que os alunos tenham no chat para o professor. Acompanhar as aulas é muito interessante para os estagiários, já que podem usar o momento não apenas para trabalhar, mas também para aprender junto com os alunos.

Também existe a escala para responder dúvidas dos alunos deixadas nas aulas gravadas na plataforma Canvas. No início do mês a escala era montada, com geralmente dois dias de “plantão” por semana. Ocorre da seguinte maneira: no dia previsto para a escala, o estagiário acessa a página e procura por perguntas dos alunos. Antes de responder, o estagiário assiste a aula referente a dúvida, elabora uma resposta e manda para a aprovação do tutor. Ele pode ou não fazer correções, e após isso, a resposta é enviada ao aluno.

Outro trabalho acompanhado foi a montagem de exercícios para a PL. São pequenas provas elaboradas para que os alunos respondam ao final dos módulos, que devem abordar todo o conteúdo ministrado. O estagiário deve assistir as aulas em questão, montar perguntas e enviar junto as respostas corretas, que serão mostradas quando o aluno finalizar o exercício. É um trabalho criterioso, sendo corrigido diversas vezes pelo tutor até chegar ao esperado.

O trabalho na equipe ensino é uma grande vantagem para o estagiário, visto que pode estar em contato com diversos professores, acompanhando suas aulas e aprendendo sobre os mais diversos assuntos de uma maneira muito acessível.

3 CAPÍTULO 2. LABORATÓRIO DE ZOONOSES BACTERIANAS – USP

3.1 Descrição do Laboratório

O laboratório de Zoonoses Bacterianas (LZB) faz parte do departamento de medicina veterinária preventiva e saúde animal (VPS) (Figura 6), localizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, em São Paulo/ SP, sendo de responsabilidade dos docentes Prof. Dr. Marcos Bryan Heinemann e Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto.

O laboratório realiza testes diagnósticos de rotina de amostras que chegam de todo o Brasil para algumas Zoonoses, sendo as principais a leptospirose e a tuberculose. Duas técnicas trabalham ativamente na rotina do laboratório realizando os testes diagnósticos, Gisele Oliveira de Souza e Lilian Abgail Ribeiro de Oliveira. Alguns estudantes da pós-graduação realizam suas pesquisas no laboratório. O estágio foi supervisionado pelo Prof. Dr. Marcos Bryan Heinemann.

Figura 6 – Vista da entrada principal do VPS.



Fonte: Da autora, 2023.

O LZB é um laboratório de biossegurança nível dois, sendo composto por um grande salão que é subdividido em quatro salas: principal, cultivo, lavagem e almoxarifado. Possui

ainda duas salas independentes, situadas no corredor, referentes a biologia molecular e a eletroforese (Figura 7).

Figura 7 – Vista da entrada principal do LZB.



Fonte: Da autora, 2023.

A sala principal é composta por uma bancada, onde alguns testes podem ser realizados, como o SAM (teste de soroprecipitação microscópica), por exemplo. Possui também microscópios de campo escuro para a visualização das bactérias do gênero *Leptospira* spp. e capela onde é realizada eutanásia de animais usados em experimentação. Uma capela está disponível para a manipulação das amostras que chegam. Além disso, possui freezers e geladeiras para armazenamento de amostras, e também mesas com computadores a disposição para uso (Figura 8).

Figura 8 – Sala principal.



Fonte: Da autora, 2023.

A sala de cultivo possui duas capelas, uma para distribuição de meios e outra para trabalhos com o agente *Mycobacterium* spp. Possui também estufas microbiológicas onde são mantidos meios de cultura e a coleção de isolados de *Leptospira* spp. do laboratório. A sala de lavagens possui duas autoclaves para a esterilização de meios de cultura, plásticos e vidrarias.

A sala de biologia molecular (Figura 9) conta com três capelas: para extração do DNA, para preparo do mix e para a junção do DNA ao mix. Também conta com termoblocos, termocicladores, centrifugas, freezers e geladeiras. A sala de eletroforese, onde o gel é preparado, conta com micro-ondas, cubas para eletroforese, fotodocumentador, notebook e um freezer.

Figura 9 – Sala de biologia molecular.



Fonte: Da autora, 2023.

3.2 Descrição das atividades realizadas

O estágio teve duração de 208 horas, indo de 02/05/2023 a 14/06/2023. Foi sugerido um plano de trabalho pelo supervisor do estágio, envolvendo trabalhos com os agentes da Leptospirose, Tuberculose e Brucelose. Porém, durante o período de estágio não foi possível realizar atividades voltadas a brucelose. Nesse sentido, na maioria do tempo, o estagiário acompanhou as técnicas do laboratório na rotina de testes para a Leptospirose e a Tuberculose, visto que houve uma grande ocorrência de recebimento de amostras para o diagnóstico destas doenças durante o período de estágio.

Todas as amostras recebidas no laboratório são registradas em cadernos específicos, sendo separadas por lotes, que recebem números para identificação. Após identificação cada amostra segue o destino específico, sendo direcionada para o teste solicitado. Durante o período de estágio, foram recebidas e processadas as amostras descritas a seguir:

Análise para leptospirose:

- 167 amostras de sangue de bovinos e 76 amostras de sangue de quatis, para realização do teste de soroglutinação microscópica;
- 39 amostras de urina de bovinos e 41 amostras de urina de quatis, para realização de PCR;

- 22 amostras de urina de quatis para realização de cultivo microbiológico;

Análise para tuberculose:

- 51 amostras de fragmentos de órgãos de bovinos e 5 amostras de fragmentos de órgãos de aves, para realização de cultivo microbiológico.

Além das amostras recebidas, diversos soros recebidos de bovinos provenientes do estado de Minas Gerais estavam sendo analisados através do SAM, para a realização de um projeto em parceria com outras duas universidades. Até o momento em que o estágio foi finalizado, cerca de 1.700 soros já haviam sido analisados no ano de 2023, de um montante de mais de 7.000 amostras.

3.3 Leptospirose

As leptospiras são bactérias flexíveis e delgadas, que podem medir de 0,1 μm de diâmetro a 20 μm de comprimento, e são observadas em microscópio de campo escuro. A família *Leptospiraceae* se divide em três gêneros: *Leptospira*, *Leptonema* e *Turneriella*, sendo a primeira diferenciada em patogênicas, não patogênicas e grupo intermediário. Esse gênero também se divide em sorogrupos, e os sorogrupos se dividem em sorovares, estes últimos alcançando o número de aproximadamente 260 (ADLER, 2015).

Os sintomas nas diversas espécies acometidas são variados, podendo levar a casos de febre, diarreia, icterícia, entre outros na fase aguda, e problemas reprodutivos na fase crônica: nascimento de crias fracas, natimortos, aborto, infertilidade. A contaminação ocorre através da exposição a urina, leite ou produtos do aborto de animais que tem a doença. A água pode ser uma grande fonte de disseminação, já que os fatores já citados podem contaminá-la, carreando os microrganismos para diversos locais. As leptospiras conseguem entrar no hospedeiro penetrando a pele, em pequenas lesões, ou mesmo em membranas e conjuntivas. É um potencial zoonose para o ser humano, podendo levar a casos graves, sendo o *Rattus norvegicus* (ratazana, rato) o principal reservatório responsável por transmitir a doença aos humanos.

Pensando em bovinos, a principal causadora de problemas na espécie é a sorovar Hardjo, com distribuição mundial, causando grandes prejuízos econômicos, já que os sintomas reprodutivos levam a grandes perdas econômicas no sistema de produção. Outro problema é a

queda súbita na produção de leite, nas vacas em lactação, ocorrendo também uma certa flacidez nos quartos mamários e um aspecto de colostro no leite, tomando uma cor amarelada. Geralmente a situação é resolvida espontaneamente entre 10 e 14 dias (ADLER, 2015).

3.3.1 Cultura e isolamento

Amostras de urina que chegam em quantidade ideal são semeadas no meio de cultura líquido EMJH (Ellighausen, McCullough, Johnson e Harris), e incubadas nas estufas bacteriológicas por um período de seis semanas. Após cinco dias já é possível perceber turbidez no meio, indicando o resultado positivo, e, apenas após as seis semanas elas podem ser consideradas negativas. Semanalmente, a turvação dos meios é observada em presença de luz (Figura 10), e também, lâminas são preparadas para visualização de possíveis leptospiros, sendo lidas em microscópio de campo escuro.

Figura 10 – Meio EMJH turvo, mostrando resultado positivo para Leptospirose.



Fonte: Da autora, 2023.

No laboratório, o meio EMJH é enriquecido de duas formas: soro de coelho 10% ou DIFCO – enriquecimento comercial que contém albumina, polissorbato 80 e fatores de crescimento para a *Leptospira* (Figura 11). Ele pode ser líquido, sendo usado para os testes de triagem e cultivo, ou adicionado de ágar, para manter a bateria de *leptospiras* do LZB.

Figura 11 – EMJH pronto para uso, com aspecto límpido, mostrando que ainda não foi utilizado.



Fonte: Da autora, 2023.

3.3.2 Reação em cadeia da polimerase

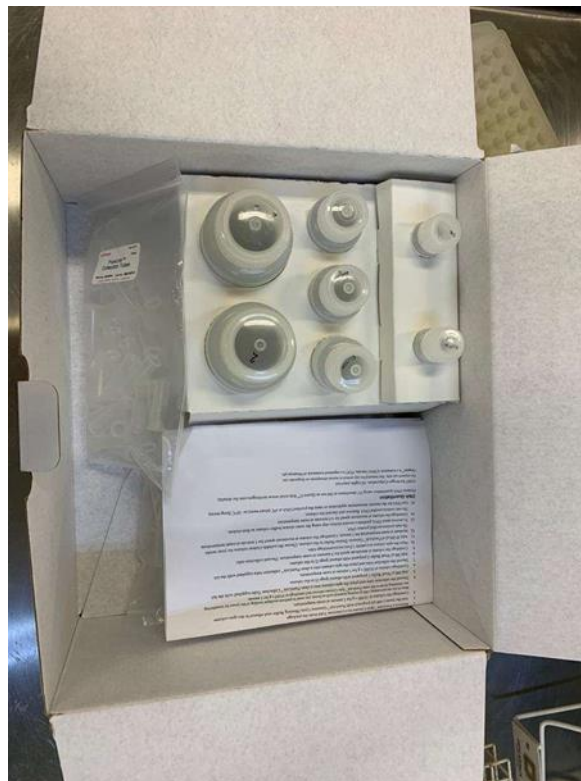
A PCR – reação em cadeia da polimerase, é uma técnica com capacidade de realizar milhares de cópias de fragmentos específicos do genoma. De início, é realizada a extração do DNA, com auxílio do kit comercial PureLink Genomic DNA Mini kit da Invitrogen. O processo é dividido em três etapas: lise, purificação e eluição, sendo eles realizados a partir de 200uL da amostra. O processo é todo realizado seguindo as instruções de um POP (procedimento operacional padrão) disponível na sala, sendo muito importante seguir todas as instruções descritas com cuidado, evitando possíveis contaminações (Figuras 12 e 13).

Figura 12 – Parte do processo de extração sendo realizado pela estagiária.



Fonte: Da autora, 2023.

Figura 13 – Kit comercial PureLink Genomic DNA Mini kit da Invitrogen.



Fonte: Da autora, 2023.

Uma amostra contendo 200uL do meio TE é utilizada como controle negativo na técnica, mostrando ao final de todo o processo se houve algum tipo de contaminação. O DNA extraído pode ser armazenado ou seguir para o próximo passo, a amplificação.

Neste segundo momento para a realização da amplificação, a utilização de um Mix é essencial, mix esse que contenha reagentes que junto a condições ideais de temperatura e pH, favoreçam a ocorrência da reação. Na Tabela 1 encontram-se os reagentes utilizados, bem como o volume necessário para cada um, para o PCR de *Leptospira*.

Tabela 1 – Reagentes utilizados no mix para PCR para *Leptospira* spp.

Reagentes	Volume por amostra
GoTaq DNA Polimerase	12,5uL
Primer forward (LEP1)	1,25uL
Primer reverse (LEP2)	1,25uL
DNA	2,5uL
Água ultrapura	7,5 uL
Volume final	25 uL

Fonte: LZB, 2023.

Desenvolvida pela empresa Promega, a GoTaq polimerase contém em sua composição glicerol, tampões com cloreto de magnésio, desoxirribonucleotídeos, corantes e a DNA polimerase, sendo esta a enzima responsável por sintetizar uma nova fita de DNA através de uma fita molde, tendo a variação de temperatura como auxiliar no processo. O MgCl₂ (cloreto de magnésio) fornece magnésio para a enzima, para que ela tenha substrato suficiente para agir e os dNTPs (desoxirribonucleotídeos) são usados por ela na síntese de novas fitas. Já os corantes são auxiliares na eletroforese, pois facilitam a observação da migração.

Os primers forward e reverse são fragmentos conhecidos de DNA fita simples, específicos para o DNA alvo buscado. A água ultrapura é utilizada para completar o volume final do Mix.

Os iniciadores usados no LZB são descritos por Mérien et al. (1992), possuindo como alvo as regiões Lep 1: 5' GGC GGC GCG TCT TAA ACA TG 3' e Lep 2: 3' TTC CCC CCA TTG AGC AAG ATT 5', amplificando uma região de 330 pb.

Esses reagentes descritos são adicionados de 2,5uL do DNA advindo da amostra, completando o Mix, que passa por ciclos de desnaturação, anelamento e extensão. Na

desnaturação a fita dupla se divide, no anelamento temos os primers se juntando as fitas e na extensão ocorre a adição de nucleotídeos pela DNA polimerase, constituindo a fita complementar. O fragmento de DNA sintetizado em um dado ciclo, serve como substrato para a formação de novos fragmentos no ciclo seguinte (Figura 14).

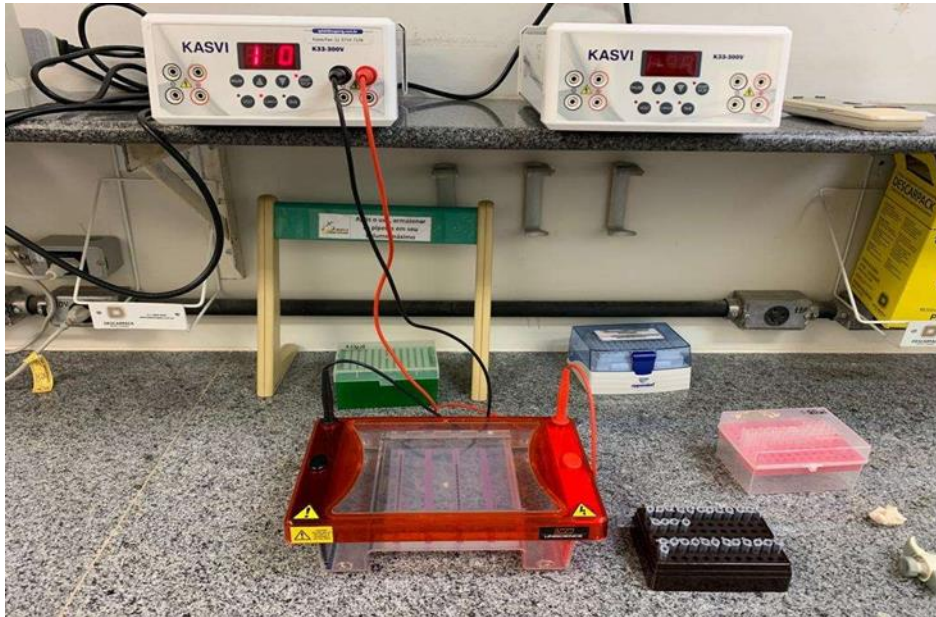
Figura 14 – Termociclador utilizado para amplificação do DNA.



Fonte: Da autora, 2023.

Obtido o amplificado da amostra de DNA, a eletroforese em gel de agarose é o próximo passo. O processo ocorre em uma cuba horizontal preenchida com solução tampão (TBE), que contém dois eletrodos em extremidades opostas, ligados a uma fonte elétrica. Por possuir carga elétrica negativa, o DNA é atraído de um lado ao outro. A velocidade com que o DNA corre pela malha depende de seu tamanho, quanto maior o peso molecular, mais lento o processo será. Para auxiliar na leitura, um marcador de peso molecular conhecido é utilizado no processo, o Ladder. Também é usado o corante Sybr safe, que se liga ao DNA e quando emitida a fluorescência os produtos amplificados podem ser visualizados. O fotodocumentador é responsável por fotografar o gel sob luz ultravioleta (Figuras 15 e 16).

Figura 15 – Cuba utilizada para eletroforese em gel de agarose.



Fonte: Da autora, 2023.

Figura 16 – Fotodocumentador utilizado para leitura do gel.



Fonte: Da autora, 2023.

3.3.3 Teste de Soroaglutinação Microscópica

Para o diagnóstico indireto da Leptospirose, o teste de soroaglutinação microscópica é utilizado no LZB, sendo ele responsável por detectar anticorpos anti – leptospira. O teste é realizado com 24 sorovares, descritas na tabela 2. Esses antígenos são advindos da bateria de *leptospiras* do laboratório, armazenadas em estufas. Em média a cada trinta dias, um repique destas amostras é feito, onde elas são transferidas para um novo meio EMJH, para que o substrato necessário para a sobrevivência das bactérias seja mantido.

O teste é realizado a partir de uma amostra de soro, sendo ela diluída em uma proporção 1:50 – 100 uL de soro para 4,9 uL de salina 0,85%. São utilizadas placas que contém 96 cavidades, que recebem 50 uL do soro diluído e 50 uL do antígeno vivo, completando a diluição 1:100. Após a etapa de distribuição, as placas ficam em incubação em temperatura ambiente, por no mínimo duas horas, sendo a leitura realizada após este período. Ela é realizada em microscópio de campo escuro, procurando por aglutinações em 50%, que determinam o diagnóstico positivo. As amostras que tem o resultado positivo são encaminhadas para a titulação.

A diluição na titulação é realizada de forma seriada na razão dois, em solução salina 0,85%, até alcançar a proporção 1:3.200, onde apenas os sorovares que reagiram positivamente na primeira etapa são usados na quantidade de 50ul, e as cavidades que apresentam resultado igual ou maior a 50% na maior diluição são considerados como título final (Figura 17).

Figura 17 – Preparo para realização da titulação.



Fonte: Da autora, 2023.

Tabela 2 – Sorovares utilizados na soroaglutinação microscópica.

Código	Sorogrupo	Variante Sorológica
1 – A	Australis	Australis
1 – B	Australis	Bratislava
2	Sejroe	Guaicura
2 – A	Autumnalis	Autumnalis
2- B	Autumnalis	Butembo
3	Ballum	Castellonis
4	Batavia	Bataviae
5	Canicola	Canicola
6	Celledoni	Whitcombi
7	Cynopteri	Cynopteri
8	Grippotyphosa	Grippotyphosa
9	Hebdomadis	Hebdomadis
10 – A	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni
10 – B	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae
11	Javanica	Javanica
12	Panama	Panama
13 – A	Pomona	Pomona
14	Pyrogene	Pyrogenes
15 – A	Sejroe	Hardjo (Hardjoprajitno)
15 - C	Sejroe	Hardjobovis
16	Shermani	Shermani
17	Tarassovi	Tarassovi
36	Pomona	Pomona
ST	Djasiman	Sentot

3.4 Tuberculose

A tuberculose é uma doença de caráter zoonótico causada por bactérias da família *Mycobacteriaceae*, do gênero *Mycobacterium*, bastonetes curtos aeróbicos que medem de 0,5 a 0,7 µm de comprimento e 0,3 µm de largura. Dentre as micobactérias, o *M. bovis* é principal causador da enfermidade em bovinos, podendo também afetar os humanos; o *M. tuberculosis* é o principal causador em humanos; e o *M. avium* causa problemas em diversas espécies de aves, sendo integrante do chamado complexo MAIS – *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. Scrofulaceum*, complexo este que está relacionado a infecções em humanos quando eles possuem problemas imunológicos (BRASIL, 2006).

A forma de infecção em bovinos tem maior frequência pela inalação de aerossóis contaminados com o microrganismo, sendo também a rota alimentar importante, pelo consumo de alimentos contaminados, principalmente o leite não pasteurizado e cru. Outras formas já foram citadas, como a cutânea, através de lesões, pelas veias umbilicais em fetos, genital, tanto em machos, como em fêmeas, e transmissão iatrogênica. A doença tem evolução crônica, com lesões granulomatosas que se localizam principalmente no trato respiratório e linfonodos traqueobrônquicos, ocorrendo também um infiltrado de células mononucleares, como, por exemplo, macrófagos. Outros locais também podem ser afetados, em uma menor ocorrência, como os linfonodos mesentéricos, por exemplo (NEILL et al., 1994).

É percebido que os animais infectados perdem de 10 a 25% de sua eficiência reprodutiva, gerando impactos econômicos significativos na cadeia de produção de bovinos, tanto a do leite, quanto a do corte. Na expectativa de controlar e erradicar a doença, o governo brasileiro, por meio do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) implantou o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT) no ano de 2001. O programa abrange não apenas a tuberculose, mas também a brucelose, outra enfermidade de caráter zoonótico. Através dele, um maior controle na movimentação de animais pôde ocorrer, além de maior vigilância em abatedouros e frigoríficos, bem como o sacrifício de animais que são positivos para a tuberculose. Além disso, o programa visa certificar as propriedades livres das enfermidades como uma forma de incentivo (BRASIL, 2006).

Para o diagnóstico da doença, o padrão ouro é a cultura pelos meios Stonebrink e Lowenstein – Jensen. Porém, para o sucesso da técnica os meios não podem ser contaminados, pois caso contrário os resultados podem ser mal interpretados gerando a necessidade de refazer

a cultura, trazendo atrasos para o resultado confirmatório. Por isso, todos os cuidados devem ser tomados ao distribuir os meios e ao cultivar as amostras (KASSAZA, 2014).

3.4.1 Técnica de descontaminação e cultura bacteriana

Para que as amostras possam ser cultivadas, primeiro precisam passar por um processo de descontaminação, para evitar o crescimento de outros microrganismos que não sejam o de interesse. O método usado no laboratório é o HPC – Hexadecylpyridinium chloride a 1,5 %.

As amostras são manipuladas no fluxo localizado na sala de cultivo, e é obrigatório o uso de EPI's (equipamentos de proteção individual, bem como pijama cirúrgico, avental impermeável descartável, gorro cirúrgico, óculos de proteção, máscara N95 e dois pares de luvas) para todos que forem manipula-las.

Em sua maioria, as amostras recebidas são fragmentos de órgãos com lesões granulomatosas sugestivas de tuberculose (Figura 18). Esses tecidos são macerados, diluídos em salina 0,85% e homogeneizados (Figura 19). Esse líquido é aliqotado em microtubos, na quantidade de 1 mL, e é adicionado 1 mL do HPC. Essas amostras devem ser incubadas por trinta minutos em temperatura ambiente e, após a incubação, devem ser centrifugadas por vinte minutos a 3.000 rpm.

Figura 18 – Fragmento recebido para análise com lesão sugestiva de tuberculose.



Fonte: Da autora, 2023.

Figura 19 – Tecidos macerados sendo diluídos em solução salina.



Fonte: Da autora, 2023.

Após a centrifugação, será gerado um líquido sobrenadante, que deverá ser descartado em solução de hipoclorito. A amostra será ressuspensa, acrescentando 1 mL de solução salina 0,85% no microtubo. 100 ul da amostra são cultivados em duplicata nos meios Stonebrink e Lowenstein – Jensen, incubados em estufa a 37 °C e deixados overnight com a tampa semiaberta, para evitar umidade no meio, e após esse período, as tampas são fechadas e permanecem por trinta a noventa dias em incubação, sendo consideradas como negativas após esse período máximo. As amostras positivas são submetidas a PCR, com a técnica semelhante à já descrita anteriormente (sendo apenas o kit e os primers usados diferentes), para identificar qual espécie cresceu nos meios de cultura.

Todo o material usado durante a extração, tanto EPI's, bem como o restante de tecidos excedentes, são colocados em sacos para autoclave, passando por um processo de autoclavagem a 120°C por uma hora. O restante, como, por exemplo, as pipetas, eram deixados no fluxo e expostos a luz ultravioleta acoplada no mesmo por 15 minutos. A sala onde o processo é realizado também possui luz ultravioleta, sendo também exposta pelo mesmo tempo.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ambos os momentos da disciplina PRG107 foram muito proveitosos. Esta última etapa auxiliou na sedimentação de conhecimentos adquiridos ao longo de toda a graduação, dando a chance de colocar em prática teorias vistas em sala de aula. Além disso, essa pequena experiência foi essencial para entender melhor o funcionamento do mercado de trabalho, fazer conexões importantes para a futura carreira e desenvolver as chamadas *soft skills*, ferramentas essas que não podem ser desenvolvidas apenas em sala de aula. Por fim, todos os conhecimentos e habilidades aprendidas durante o estágio obrigatório serão de grande valia não apenas para a carreira, mas também para o âmbito pessoal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT)**. Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2006. p. 188.
- CEPEA. Centro de Pesquisas Avançadas em Economia Aplicada. **PIB do agronegócio brasileiro**. Piracicaba, SP: CEPEA, ESALQ, USP, jun. 2023. Disponível em: <<https://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do-agronegocio-brasileiro.aspx#:~:text=Cepea%2C%2027%2F06%2F2023,no%20primeiro%20trimestre%20de%202023>>. Acesso em: 5 jun. 2023.
- CHARBONNEAU, E.; PELLERIN, D.; OETZEL, G. R. Impact of lowering dietary cation-anion difference in nonlactating dairy cows: A meta-analysis. **Journal of dairy science**, v. 89, n. 2, p. 537-548, 2006.
- CORRÊA, F. A. F. **Formas de diagnóstico de Mycobacterium tuberculosis e Mycobacterium bovis**. 2011. 40 f. Pós-Graduação (Disciplina de Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.
- GONÇALVES, L. C. et al. **Alimentação de Gado de Leite**. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2009. p. 412.
- GUEDES, I. B. **Pesquisa de Leptospira spp. em fêmeas bovinas pertencentes ao município de Novo Repartimento-Pará**. 2017. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.
- HEINRICHS, J.; JONES C. M. **Penn State Particle Separator**: The Forage and TMR Particle Separator was designed to help in determining the correct forage particle length needed to improve ruminant nutrition. Article Penn State Extension, dez. 2022. Disponível em: <<https://extension.psu.edu/penn-state-particle-separator>>. Acesso em: 5 de jun. 2023.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção de Leite no Brasil**. 2021. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/leite/br>>. Acesso em: 5 de jun. 2023.
- KASSAZA, K. et al. Lowenstein-Jensen selective medium for reducing contamination in Mycobacterium tuberculosis culture. **Journal of clinical microbiology**, v. 52, n. 7, p. 2671-2673, 2014.
- LAMMERS, B. P.; BUCKMASTER, D. R.; HEINRICHS, A. J. A simple method for the analysis of particle sizes of forage and total mixed rations. **Journal of dairy science**, v. 79, n. 5, p. 922-928, 1996.
- MENZIES, F. D.; NEILL, S. D. Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. **The Veterinary Journal**, v. 160, n. 2, p. 92-106, 2000.
- MERIEN, F. et al. Polymerase chain reaction for detection of Leptospira spp. in clinical samples. **Journal of clinical microbiology**, v. 30, n. 9, p. 2219-2224, 1992.

NEILL, S. D. et al. Pathogenesis of Mycobacterium bovis infection in cattle. **Veterinary microbiology**. v. 40, n. 1-2, p. 41–52, mai. 1994.

RAMELLA, K. D. C. L. et al. Prepartum anionic diet induces hyperchloremic acidosis in high-producing dairy cows without preventing subclinical hypocalcemia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 40, p. 875-881, 2021.

REHAGRO. **Cursos de Leite**. Especialidades, 2023. Disponível em: <<https://rehagro.com.br/especialidades/leite>>. Acesso em: 5 de jun. 2023.

ROCHA, D. T. et al. **Cadeia produtiva do leite no Brasil: produção primária**. Circular técnica, Juiz de Fora, 123 ed. 2020.

SILVA, S. C. G. et al. Isolation and identification of Mycobacterium bovis in cattle slaughtered from an abattoir in Garanhuns, Pernambuco. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 39, n. 1, p. 157-166, jan. 2018.

WELCH, J. G. Physical parameters of fiber affecting passage from the rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 69, n. 10, p. 2750-2754, 1986.

WILLIAN, A. E. Animal Leptospirosis. In: **Leptospira and Leptospirosis, Current Topics in Microbiology and Immunology**. v. 387, p. 99 – 137, nov. 2014.