



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



PRODUÇÃO DE BIOFILME, PERFIL DE SENSIBILIDADE E
ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE ESPÉCIES FÚNGICAS E
ALGAS DO GÊNERO *Prototheca* ISOLADAS DE CASOS DE
MASTITE BOVINA

TARSILA FRANCKIN

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia de Parasitas e Micro-organismos*.

Orientadora: Prof^a. Assist. Dr^a. Sandra de Moraes Gimenes Bosco

BOTUCATU – SP

2016



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

PRODUÇÃO DE BIOFILME, PERFIL DE SENSIBILIDADE E
ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE ESPÉCIES FÚNGICAS E
ALGAS DO GÊNERO *Prototheca* ISOLADAS DE CASOS DE
MASTITE BOVINA

TARSILA FRANCKIN

SANDRA DE MORAES GIMENES BOSCO

JOSÉ CARLOS DE FIGUEIREDO PANTOJA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia de Parasitas e Micro-organismos*.

Orientadora: Prof^a. Assist. Dr^a. Sandra de Moraes Gimenes Bosco

BOTUCATU – SP

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Franckin, Tarsila.

Produção de biofilme, perfil de sensibilidade e aspectos epidemiológicos de espécies fúngicas e algas do gênero *Prototheca* isoladas de casos de mastite bovina / Tarsila Franckin. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Sandra de Moraes Gimenes Bosco

Coorientador: José Carlos de Figueiredo Pantoja

Capes: 21200009

1. Bovino - Doenças. 2. Mastite. 3. Biofilme. 4. Alga.
5. Leveduras (Fungos)

Palavras-chave: Algas; Biofilme; Fluconazol; Leveduras; Mastite bovina.

“Desistir...

Eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério. É que tenho mais chão nos meus olhos do que cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça!”

Cora Coralina

Dedicatória

Aos meus avós!

A minha vó Adelaide e ao meu nono Antonio, que já não estão ao alcance dos meus olhos, mas que permanecem aqui, dentro do meu coração, por onde quer que eu vá. Tenho comigo a certeza de que estariam orgulhosos e de que me guiaram e protegeram ao longo dessa caminhada!

Ao vô Guilherme e à nona Hermínia! Porque os meus dias são mais felizes apenas por saber que os tenho comigo! Obrigada por tudo!

A cada um de vocês, meu amor e gratidão eternos!

Agradecimentos

A Deus! Por tantos momentos de alegria e pelos momentos difíceis que me fizeram crescer e me tornar a pessoa que sou hoje: alguém que entendeu que a vida pode ser maravilhosa e que isto só depende de nós mesmos!

Aos meus pais, Edson e Idê! Por toda a educação, apoio e conselhos. É por eles que cheguei até aqui e que desejo ser cada dia melhor! Espero ser sempre motivo de orgulho e nunca decepcioná-los! Incondicionalmente, amo vocês!

Ao meu irmão Vinícius, que chegou depois de nove anos para tirar meus benefícios de filha única (foi fácil não!), mas que hoje é meu “irmão-amigo”! Obrigada pelo apoio, pelas risadas garantidas e por me ajudar nos apuros das últimas semanas do mestrado. Orgulho imenso de tê-lo visto crescer e se tornar uma pessoa de caráter e que, agora, começa a trilhar seu próprio caminho!

Ao meu namorado, ao meu amor: Felipe A. Parise! Pelo carinho, incentivo, companheirismo e paciência (muita paciência!) ao longo desses quase sete anos. Agradeço a Deus por ter colocado alguém tão especial em minha vida, que foi essencial nessa caminhada e com quem eu sei que posso contar em todos os momentos! Muito obrigada pela imensa ajuda!

A todos os familiares e amigos que torceram e torcem por mim, em especial a minha tia e madrinha Celina, pelo apoio em momentos essenciais!

A minha orientadora, Sandra de Moraes Gimenes Bosco! Por me aceitar como sua aluna, mesmo eu não querendo trabalhar com o “fofo do Pythium insidiosum”, por acreditar em mim e ser muito mais que uma professora, uma amiga pra vida toda! Muito obrigada!

Ao meu co-orientador, José Carlos de Figueiredo Pantoja, por quem tenho uma admiração imensa! Obrigada por ter permitido que eu fizesse parte de sua equipe, por todo o aprendizado (e paciência!) e por ter confiado em mim em momentos em que eu mesma me perguntei se seria capaz!

A minha querida Jéssica L. Chechi! Como foi bom ter uma companheira de mestrado com quem dividi a casa, as maiores gordices, as alegrias e os perrengues! Obrigada pelas risadas (até mesmo quando o que queríamos era chorar!) e por toda a ajuda!

Às pessoas tão especiais que o mestrado me proporcionou conhecer ou me aproximar e que levarei pra sempre comigo: Mariana J. Gomes (e a nossa dog, Julie!), Fernanda B. Alves, Ana Carolina Alves, Tâmara H. R. Prandini, Juliana Azanha, Lidiane N. Barbosa, Bruna Andrade, Hans G. Garcés e Marluce Hrycyk! Obrigada por cada conversa (falando de coisa séria e de outras nem tão sérias assim!), por cada encontro, cada ajuda (as tantas caronas!), enfim, foi ótimo ter vocês!

Aos professores e colegas do Departamento de Microbiologia e Imunologia! Em especial ao professor Eduardo Bagagli, pelos anos de orientação durante a graduação e por todo o apoio e ajuda de sempre. E a todos os colegas do Laboratório de Biologia de Fungos e Laboratório de Micologia Médica!

À querida Ariane Nascimento, que tanto me ensinou quando iniciei meu caminho na área da Microbiologia! Muito obrigada!

Aos eternos amigos: Bruna L. Merlin, Natália R. Franckim, Mariana Ribeiro, Laura M. L. de Oliveira, Paulo H. Milanezi, André Amaro, Maiara Bertin e Claudia W. Garcia! Pode passar o tempo que for, o encontro com vocês é sempre especial!

A todos os amigos que já não são tão próximos, mas que fizeram parte da minha história até aqui! Afinal, como já dizia Antoine de Saint-Exupéry: “Aqueles que passam por nós não vão sós. Deixam um pouco de si e levam um pouco de nós.”

A todos que participaram da minha caminhada e que posso não ter mencionado aqui!

*À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pela bolsa de estudos concedida (**Processo 2014/ 03437-3**).*

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE FIGURAS	12
1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Mastite bovina.....	13
1.2. Mastite ambiental.....	14
1.3. Fungos como patógenos em mastite bovina.....	15
1.4. Microalgas do gênero <i>Prototheca</i> em casos de mastite bovina.....	16
1.5. A capacidade de produção de biofilme dos micro-organismos.....	17
1.6. Perfil de sensibilidade aos antifúngicos.....	18
1.7. Saúde pública.....	19
2. OBJETIVOS	20
2.1. Objetivos gerais.....	20
2.2. Objetivos específicos.....	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1. Aquisição de amostras.....	21
3.2. Identificação das espécies de leveduras.....	21
3.3. Identificação das espécies de <i>Prototheca</i>	22
3.4. Produção de biofilme em discos de inox.....	23
3.5. Avaliação da susceptibilidade antifúngica.....	23
3.6. Análise descritiva de variáveis epidemiológicas.....	24
3.7. Análises estatísticas.....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1. Identificação dos isolados.....	26
4.2. Produção de biofilme.....	30
4.3. Perfil de sensibilidade ao fluconazol.....	37
4.4. Análise descritiva de variáveis epidemiológicas.....	39
5. CONCLUSÕES	42
6. REFERÊNCIAS	44

RESUMO

Apesar de as bactérias serem os agentes mais prevalentes na mastite bovina, cada vez mais a literatura registra casos da doença ocasionados por fungos e algas do gênero *Prototheca*. O presente trabalho teve como objetivo gerar novos conhecimentos sobre a etiologia e patogenicidade dos agentes da mastite bovina causada por fungos e algas do gênero *Prototheca* a partir da identificação morfofisiológica e molecular, além de análises da capacidade de produção de biofilme e perfil de sensibilidade. Para isto, foram realizadas análises morfofisiológicas e moleculares de 33 isolados de leveduras e 40 algas do gênero *Prototheca* obtidos a partir de casos clínicos e subclínicos de mastite, colhidos sistematicamente em cinco propriedades leiteiras dos estados de São Paulo e Minas Gerais, como parte de seus respectivos programas de controle de mastite. Os resultados obtidos indicaram que todas as algas são pertencentes à espécie *Prototheca zopfii* e, entre as leveduras, foram identificadas as seguintes espécies: *Pichia kudriazevii* (n=16; 48,5%), *Candida akabanensis* (n=8; 24,2%), *Candida tropicalis* (n=3; 9,1%), *Cyberlindnera jadinii* (n=2; 6,1%), *Candida glabrata* (n=1; 3%), *Candida parapsilosis* (n=1; 3%), *Candida palmioleophila* (n=1; 3%) e *Candida haemulonis* (n=1; 3%), sendo que *Candida akabanensis*, *Candida palmioleophila* e *Cyberlindnera jadinii* nunca foram descritas em casos de mastite bovina. A diversidade de espécies de leveduras isoladas sugere que a utilização de técnicas moleculares tem permitido a realização de diagnósticos mais precisos, os quais não eram possíveis a partir das metodologias convencionais de identificação. Quanto à capacidade de produção de biofilme, os resultados demonstraram que tanto leveduras quanto *Prototheca zopfii* possuem esta habilidade, sendo este um fator de virulência importante para a persistência destes micro-organismos no ambiente de ordenha. A análise do perfil de sensibilidade dos isolados foi realizada com a utilização do antifúngico fluconazol. Todos os isolados da espécie *P. zopfii* mostraram-se resistentes à droga, enquanto que, para as leveduras, foram observados os três padrões de sensibilidade: sensível (n=6; 21,43%), sensibilidade dose-dependente (n= 21;75%) e resistente (n=1; 3,57%). Na análise epidemiológica realizada para uma das propriedades do estudo, verificou-se que não houve diferença estatística entre leveduras e *Prototheca zopfii* em relação às variáveis consideradas. Diante dos resultados, foi possível constatar a relevância destes micro-organismos em casos de mastite bovina e a importância de estudos para a identificação correta dos patógenos e soluções para o controle dos micro-organismos no ambiente de ordenha, considerando-se medidas de prevenção e tratamento.

ABSTRACT

Although bacteria are the most prevalent agents in bovine mastitis, increasingly literature reported cases of the disease caused by fungi and algae of the genus *Prototheca*. This study aimed to generate new knowledge about the etiology and pathogenicity of bovine mastitis agents caused by fungi and algae of the genus *Prototheca* from morphophysiological and molecular identification, besides analysis of biofilm production capacity and susceptibility profile. For this, morphophysiological and molecular analyzes were performed of 33 yeast isolates and 40 algae of the genus *Prototheca* obtained from clinical and subclinical mastitis cases, systematically collected in five dairy properties in the states of São Paulo and Minas Gerais, as part of their respective mastitis control programs. The results indicated that all algae are belonging to the species *Prototheca zopfii* and, among the yeasts, the following species have been identified: *Pichia kudriazevii* (n=16; 48.5%), *Candida akabanensis* (n=8; 24.2%), *Candida tropicalis* (n= 3; 9.1%), *Cyberlindnera jadinii* (n= 2; 6.1%), *Candida glabrata* (n= 1, 3%), *Candida parapsilosis* (n= 1, 3%), *Candida palmioleophila* (n= 1, 3%) and *Candida haemulonis* (n= 1, 3%). It is worth mentioning that *Candida akabanensis*, *Candida palmioleophila* and *Cyberlindnera jadinii* have never been described in cases of bovine mastitis. The diversity of yeasts species suggests that the use of molecular techniques has allowed the realization of more accurate diagnoses, which were not possible from conventional identification methods. For biofilm production capacity, the results showed that both yeasts as *Prototheca zopfii* have this ability, which is an important virulence factor for the persistence of these microorganisms in the milking environment. The susceptibility profile analysis was performed using the antifungal fluconazole. All isolates of the species *P. zopfii* were resistant to the drug, whereas for yeasts, three susceptibility patterns were observed: sensitive (n=6; 21.43%), dose-dependent susceptibility (n=21; 75%) and resistant (n=1; 3.57%). In epidemiological analysis for one of the dairy farms included in the study, there was no statistical difference between yeast and *Prototheca zopfii* in relation to variables considered. In front of these results, it was possible to observe the relevance of these micro-organisms in cases of bovine mastitis and the importance of studies for the identification of pathogens and solutions for the control of microorganisms in the milking environment, considering measures to prevent and treatment.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Resultados morfofisiológicos e moleculares para os isolados de leveduras obtidos a partir de casos de mastite bovina em diferentes propriedades do estado de São Paulo e Minas Gerais.....28
- Tabela 2.** Percentis 33 e 66%, mínimo e máximo da distribuição dos valores de densidade óptica para cada um dos grupos considerados: *Pichia kudriavzevii*, *Candida akabanensis*, Outras e *Prototheca zopfii*.....32
- Tabela 3.** Número de isolados para cada faixa de produção de biofilme determinada a partir dos percentis 33 e 66% e dos valores mínimo e máximo da distribuição dos valores de densidade óptica para cada um dos grupos considerados: *Pichia kudriavzevii*, *Candida akabanensis*, Outras e *Prototheca zopfii*.....32
- Tabela 4.** Resultados dos testes de sensibilidade para o antifúngico fluconazol, nas concentrações de 0,25 a 128µg/ ml. R = resistente; S = sensível; S-DD = sensibilidade dose dependente.....39
- Tabela 5.** Resultados da análise das variáveis epidemiológicas - DEL no momento do caso, número de tratamentos antimicrobianos nos últimos três meses anteriores ao caso (n casos), número total de infusões de antibiótico na lactação até a data do caso, protocolos de tratamento utilizados, paridade, produção de leite e quarto infectado - em relação ao rebanho de uma das propriedades incluídas no estudo.....40

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Gel de eletroforese evidenciando a amplificação dos isolados de leveduras obtidos a partir de casos de mastite bovina.....27
- Figura 2.** Gel de eletroforese evidenciando a amplificação dos isolados de *Prototheca* obtidos a partir de casos de mastite bovina.....30
- Figura 3.** Valores de densidade óptica para as espécies de leveduras isoladas.....31
- Figura 4.** Valores de densidade óptica para os isolados da espécie *Prototheca zopfii*.....31
- Figura 5.** Microscopia eletrônica de varredura do controle positivo ATCC SC-5314/ *Candida albicans*, evidenciando a adesão celular, formação de hifas e matriz.....33
- Figura 6.** Microscopia de fluorescência do controle positivo ATCC SC-5314/ *Candida albicans*.....33
- Figura 7.** Microscopia eletrônica de varredura de isolado da espécie *Candida akabanensis* sendo possível a observação da aglomeração celular e matriz. A: adesão celular e matriz do biofilme; B: menor aumento, evidenciando a adesão no disco de inox.....34
- Figura 8.** Microscopia eletrônica de varredura de isolado da espécie *Pichia kudriavzevii*, evidenciando a aglomeração das células e formação de hifas na superfície do disco de inox.....34
- Figura 9.** Microscopia eletrônica de varredura de isolado da espécie *Prototheca zopfii*, evidenciando-se a aglomeração das células e adesão no disco de inox.....36
- Figura 10.** Microscopia eletrônica de varredura de isolado da espécie *Prototheca zopfii*, evidenciando-se detalhes da aglomeração celular, com a observação dos endósporos.....36

1. INTRODUÇÃO

1.1. Mastite bovina

A mastite caracteriza-se pela inflamação da glândula mamária e é a doença que mais acarreta prejuízos para a bovinocultura de leite em todo o mundo, considerando-se a sua alta prevalência nos rebanhos (ZARAGOZA et al., 2011). A ocorrência da mastite bovina é desencadeada, principalmente, por falhas no manejo durante e entre as ordenhas (BECK et al., 1992). A diminuição na produção e o descarte de leite, os gastos com tratamentos e o descarte de animais são os principais prejuízos ocasionados pela mastite bovina (COSTA et al., 1998).

Vários micro-organismos estão envolvidos na etiologia de infecções intramamárias em bovinos, representada principalmente por bactérias, fungos e algas (LEBLANC et al., 2006), sendo as bactérias os agentes mais frequentemente isolados (COSTA, 1991). Comumente, a prevalência de bactérias é de mais de 90% em comparação aos outros micro-organismos envolvidos em episódios de mastite bovina. No Brasil, Saab et al. (2014) encontraram prevalência bacteriana de 96,8% em trabalho realizado no estado do Paraná, e Andrade et al. (1998), no estado de Goiás, relataram uma porcentagem de 97,8. Em outros países, também ocorre maior prevalência de bactérias: nos Estados Unidos, Wilson et al. (1997) relataram 97% isolados de espécies de bactérias e, em trabalho realizado na Jordânia, a prevalência bacteriana foi de 100% (HAWARI & AL-DABBAS, 2008). No entanto, em alguns casos específicos, como os surtos ocasionados por fungos, pode ser observada uma prevalência de mais de 20% destes patógenos (SANTOS & MARIN, 2005; SPANAMBERG et al., 2008).

A infecção intramamária bovina pode se apresentar de duas formas: a mastite subclínica, na qual podem ser observadas reações sem alterações macroscópicas visíveis, mas com alterações químicas e microbiológicas do leite; e a mastite clínica, caracterizada por respostas inflamatórias mais severas, que resultam em mudanças no aspecto da secreção do leite, alterações no tecido mamário e, em alguns casos, efeitos sistêmicos como hipertermia, prostração e tremores musculares (PRESTES et al., 2003).

A mastite bovina também pode ser classificada como contagiosa ou ambiental, considerando-se as características do agente etiológico. Os micro-organismos ambientais são ditos oportunistas e habitam o ambiente no qual os animais vivem, podendo ocasionar a infecção em qualquer etapa do manejo. Já os agentes contagiosos são adaptados à multiplicação no interior da glândula mamária e são responsáveis por infecções transmitidas durante a ordenha (BRADLEY, 2002). No entanto, a transmissão de algumas espécies de patógenos classificados como contagiosos pode estar ocorrendo por rotas diferentes da

contagiosa (vaca-vaca) e, da mesma forma, foi relatada a ocorrência de patógenos ambientais gram-negativos adaptados ao hospedeiro (MUNOZ et al., 2007; ZADOKS et al., 2011). As bactérias *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* são exemplos de micro-organismos contagiosos, enquanto que *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, fungos e algas são exemplos de patógenos ambientais.

1.2. Mastite ambiental

Nos últimos anos, vem sendo relatado um aumento da incidência de infecções intramamárias causadas por patógenos ambientais (HOGAN & SMITH, 2012).

A mastite ambiental é causada por micro-organismos oportunistas que ocupam o ambiente no qual os animais vivem. Ao contrário da mastite contagiosa que ocorre durante a ordenha, a maior parte das infecções ambientais ocorre no intervalo entre as ordenhas, quando os animais podem ficar expostos a ambientes com acúmulo de barro, esterco ou camas orgânicas, nos quais os patógenos podem estar presentes. Portanto, as principais causas para a ocorrência da mastite ambiental estão relacionadas às condições inadequadas de higiene e limpeza do ambiente no qual os animais são mantidos (ZDANOWICZ et al., 2004).

Normalmente, patógenos ambientais, tais como os coliformes, invadem a glândula mamária, multiplicam-se, desencadeiam uma resposta imune no hospedeiro e são rapidamente eliminados. No entanto, outros patógenos ambientais, tais como os estreptococos, *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp., fungos e algas podem causar infecções intramamárias de longa duração que se alternam entre quadros clínicos e subclínicos, dependendo do grau de adaptação ao hospedeiro (BRADLEY, 2002).

Bactérias, fungos e algas podem estar envolvidos em casos de mastite ambiental. Dentre as bactérias, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas* spp. são alguns dos principais agentes. Já entre os fungos, o gênero *Candida* é um dos mais descritos em episódios da doença, enquanto que as algas são representadas por espécies do gênero *Prototheca* (HOGAN & SMITH, 2012; ZARAGOZA et al., 2011; JAGIELSKI & LAGNEAU, 2007).

1.3. Fungos como patógenos em mastite bovina

Apesar de as bactérias se apresentarem como os patógenos mais frequentes em casos de mastite bovina, tem sido crescente o relato de casos esporádicos a partir de microorganismos de origem ambiental não bacterianos, dentre eles destacam-se os fungos. Os fungos filamentosos estão amplamente distribuídos na natureza, mas as leveduras são mais frequentemente relacionadas às infecções da glândula mamária (LANGONI et al., 1997; COSTA et al., 2008).

Os agentes envolvidos em casos de mastite fúngica são considerados oportunistas e vivem no ambiente dos animais leiteiros, tais como na pele do teto, nas mãos dos ordenhadores e em vários substratos orgânicos (BARNETT et al., 2000). As causas da infecção são comumente relacionadas ao uso prolongado de antibióticos para o tratamento de mastites bacterianas e falta de procedimentos de higiene no momento da aplicação destes medicamentos (COSTA et al., 1998).

A ocorrência da mastite causada por fungos é bem mais baixa quando comparada à mastite bacteriana e, na maior parte dos casos, o próprio sistema imune do animal é capaz de reverter o quadro infeccioso. No entanto, quando isto não acontece, os casos costumam ser crônicos e de difícil reversão a partir da terapia antifúngica (KRUKOWSKI & SABA, 2003). Estudos conduzidos em diversos países demonstram que a frequência de isolamento de fungos em casos de mastite bovina costuma ser variável, caracterizando casos esporádicos ou surtos do patógeno. Zaragoza et al. (2011) reportaram uma frequência de 25,75% no México, enquanto que, no Egito, foi relatada uma frequência de 6,1% (AWAD et al., 1980). Na Dinamarca, Aalbaek et al. (1994) reportaram frequência de 1,3% e, na Polônia, foi descrita uma frequência de 9,6% (KRUKOWSKI et al. 2000). No Brasil, frequências de 12,07, 25,40 e 27,42% foram descritas, respectivamente, por Costa et al. (1993), Santos & Marin (2005) e Spanamberg et al. (2008). Em outros estudos, Saab et al. (2014) relataram prevalência de 1,2% de espécies do gênero *Candida* em trabalho realizado no estado do Paraná, enquanto que Cruppe et al. (2008) encontraram uma prevalência de 1,97% entre fungos e leveduras, em estudo realizado em propriedades de quatro estados brasileiros (PR, MG, SC e SP).

Apesar de o gênero *Candida* ser o mais relatado em episódios de mastite fúngica, outros gêneros já foram descritos, tais como: *Cryptococcus*, *Pichia*, *Trichosporon*, *Aspergillus*, *Geothricum*, *Rhizopus*, entre outros (LANGONI et al., 1998; LAGNEAU et al., 1996; SPANAMBERG et al., 2008).

Os avanços dos métodos diagnósticos a partir de técnicas moleculares podem ser responsáveis pelo aumento da diversidade de patógenos envolvidos em casos de mastite fúngica. A identificação morfológica convencional tem se tornando difícil, gerando resultados inconclusivos (REISS et al., 1998) e a biologia molecular se apresenta como ferramenta importante na identificação dos micro-organismos de forma rápida, sensível e específica (MAKIMURA et al., 1994).

1.4. Microalgas do gênero *Prototheca* em casos de mastite bovina

O gênero *Prototheca* compreende algas aclorofiladas, unicelulares e patogênicas para animais e humanos. Inicialmente, foram descritas como fungos devido às semelhanças morfológicas com as leveduras, mas o modo de reprodução é semelhante ao das algas do gênero *Chlorella*, por fissão múltipla, formando endósporos (LANGONI et al., 2013)

O gênero *Prototheca* foi descrito pela primeira vez em 1894, por Wilhelm Krüger e associado à mastite em 1952, por Lerche na Alemanha. No Brasil, o primeiro caso de mastite bovina causada por estas algas foi registrado no Mato Grosso do Sul, em 1989 (COSTA et al. 1999) e, quase que concomitantemente, outros surtos foram registrados em diferentes regiões do país, incluindo o estado de São Paulo (LANGONI et al. 1992).

Atualmente, cinco espécies do gênero *Prototheca* são aceitas: *Prototheca zopfii*, *Prototheca blaschkeae*, *Prototheca stagnora*, *Prototheca whickerhamii* e *Prototheca ulmea* (ROESLER et al., 2006). A presença de uma sexta espécie, *Prototheca moriformis*, ainda é discutida (UENO et al., 2003) e, recentemente, uma nova espécie foi proposta: *Prototheca cutis* (SATO et al., 2010).

A ocorrência de mastite bovina causada por algas do gênero *Prototheca* tem aumentado significativamente nos últimos anos e tem sido descrita em vários países. Além do Brasil, Portugal, Itália, Alemanha, Polônia, Bélgica, França, China e Japão são alguns dos países que já descreveram casos da doença ocasionados pelo patógeno (JAGIELSKI et al., 2012; OSUMI et al, 2008, SHAHID et al., 2015).

Algas do gênero *Prototheca* podem estar amplamente distribuídas no ambiente dos bovinos leiteiros, principalmente em propriedades que apresentam áreas úmidas, deficiências no manejo e histórico de tratamento intramamário sem os devidos cuidados de antissepsia (CORBELLINI et al, 2001; OSUMI et al., 2008; RICCHI et al., 2010).

Dentre as espécies do gênero, *Prototheca zopfii* tem sido a mais prevalente como agente etiológico da mastite bovina clínica e subclínica. A espécie é caracterizada por 2

genótipos (1 e 2), sendo o genótipo 2 amplamente relacionado com casos de mastite, enquanto o genótipo 1 é considerado não-patogênico. *Prototheca blaschkeae* (antigo genótipo 3 de *Prototheca zopfii*) também é considerada patogênica, mas menos prevalente quando comparada à *Prototheca zopfii* (ROESLER et al., 2006).

As infecções intramamárias causadas por *Prototheca* são refratárias ao tratamento antimicrobiano e podem resultar em surtos, infecções crônicas, perda do quarto infectado e descarte dos animais (JANÓSI et al, 2001). A resistência aos medicamentos apresentada por estas algas está associada à capacidade de infectar e sobreviver em macrófagos e invadir o tecido mamário, ocasionando uma infecção persistente, além de características da parede celular e da produção de exoenzimas (MARQUES et al., 2006; JÁNOSI et al, 2011a; CRISPIN, 1999).

Além da queda na produção do leite, presença de grumos e edema na glândula mamária, a mastite causada por algas do gênero *Prototheca* pode ser transmitida de um animal para outro no ambiente de ordenha, caracterizando um sério problema para o sistema leiteiro (JANÓSI et al., 2001). Diante disto, o diagnóstico precoce, boas práticas de ordenha e secagem química dos quartos afetados ou até mesmo o descarte dos animais acometidos, são as principais ações recomendadas no controle e profilaxia da doença.

1.5. A capacidade de produção de biofilme dos micro-organismos

Biofilmes podem ser definidos como uma comunidade de células microbianas aderidas a uma superfície e imersas em matriz extracelular. A formação inicia-se com a interação das células planctônicas na superfície. Depois de consolidada a adesão, as células multiplicam-se, formando microcolônias que secretam exopolímeros em grande quantidade, criando um ambiente protegido de adversidades e favorecendo a incorporação de novas células microbianas e de nutrientes. O processo culmina com eventual dispersão, promovendo a colonização de novas superfícies (HALL-STOODLEY et al., 2004; GARRET, 2008).

A formação dos biofilmes depende tanto dos micro-organismos quanto do material sobre o qual a estrutura é formada. São diversas as vantagens que micro-organismos crescendo em biofilmes têm em relação à vida planctônica: proteção contra a atuação de antibióticos e desinfetantes, sobrevivência à escassez de nutrientes, comunicação intercelular, entre outras (MEYER, 2003; GARRET, 2008).

A matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) que envolve as células microbianas é formada por uma série de componentes, como polissacarídeos, proteínas,

fosfolipídios e ácido teicóico. A composição química e a estrutura da matriz do biofilme têm fundamental importância para a sobrevivência dos micro-organismos ali presentes (SHI & ZHU, 2009).

Com relação à mastite bovina, os micro-organismos capazes de produzir biofilme podem se aderir em diversos substratos: tanto no próprio tecido da glândula mamária quanto em materiais utilizados nos tanques de refrigeração e em outros equipamentos de ordenha (materiais em inox, emborrachados e de silicone). Tal capacidade se explica porque os biofilmes contêm partículas de proteínas, lipídeos, fosfolipídios, carboidratos e sais minerais que auxiliam na adesão às camadas superficiais, debaixo das quais os micro-organismos continuam a se multiplicar mesmo diante da ação de agentes físicos e químicos, como os utilizados nos procedimentos de higienização (RICKARD et al., 2003). A aderência de patógenos da mastite tem sido investigada em vários estudos *in vitro* e *in vivo* (ALMEIDA & OLIVER, 2001).

Espécies do gênero *Candida* são muito conhecidas, na medicina humana, por apresentar a formação de biofilme como um importante fator de virulência (REX, 1996). Já as algas do gênero *Prototheca* ainda são pouco estudadas em relação a esta capacidade. Recentemente, Gonçalves et al. (2015) avaliaram isolados de *Prototheca zopfii* provenientes de casos subclínicos de mastite bovina em relação à produção de biofilme e evidenciaram que a espécie apresenta esta habilidade, sendo este um fator que pode contribuir para a persistência de *Prototheca zopfii* no ambiente de ordenha.

1.6. Perfil de sensibilidade aos antifúngicos

A avaliação dos micro-organismos em relação ao perfil de sensibilidade aos antimicrobianos é uma medida extremamente importante para o tratamento adequado de doenças infecciosas. No caso da mastite bovina, é essencial realizar registros dos casos clínicos e subclínicos da doença, assim como utilizar os antimicrobianos de forma correta, com o intuito de evitar o desenvolvimento de resistência dos micro-organismos. Na mastite fúngica e na mastite causada por algas do gênero *Prototheca*, o uso indiscriminado de antimicrobianos, trata-se de um dos fatores de risco mais importantes para o aparecimento da afecção devido às alterações na microbiota que podem favorecer a ação patogênica destes micro-organismos e devido à possibilidade de contaminação a partir da aplicação intramamária de medicamentos e lesões nos tetos, visto que estes micro-organismos estão

presentes no ambiente e podem ser levados para dentro da glândula mamária, caso não seja realizada uma antissepsia adequada (JAIN & JOSEPH, 2013).

Alguns autores citam a nistatina, a natamicina, o fluconazol e o miconazol em solução aquosa para o tratamento intramamário em vacas com mastite por *Candida sp.*, mas os tratamentos não costumam ser satisfatórios (NOBRE et al., 2002; KRUKOWSKI & SABA, 2003). No caso das algas do gênero *Prototheca*, estudos de susceptibilidade *in vitro* e *in vivo* demonstraram que estes micro-organismos são resistentes à maioria dos antimicrobianos disponíveis (MELVILLE et al., 2002).

1.7. Saúde pública

Além de toda a problemática da mastite, ocasionando enormes prejuízos para a pecuária leiteira, é de extrema importância considerar a questão de saúde pública envolvida com a doença, visto que diversos micro-organismos podem ser patogênicos ao homem.

Tanto bactérias quanto fungos e algas podem apresentar potencial zoonótico. *Prototheca zopfii* já demonstrou alta resistência a temperaturas elevadas, representando um risco para o consumo de leite e derivados. A prototecose humana pode apresentar manifestações diversas, de localizadas a sistêmicas, como gastroenterite, bursite, peritonite e lesões cutâneas (MELVILLE et al., 1999; LASSA et al., 2011). Entre os fungos, *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Cryptococcus* spp. e *Trichosporon* spp. são alguns exemplos de patógenos oportunistas que podem estar presentes no ambiente dos animais leiteiros e que apresentam potencial zoonótico, podendo ocasionar infecções cutâneas e sistêmicas. Portanto, os cuidados necessários vão desde o manejo adequado dos animais até a ingestão do leite e seus derivados (VASCONCELOS & ITO, 2011).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo gerar novos conhecimentos sobre a etiologia e patogenicidade dos agentes da mastite bovina causada por fungos/leveduras e algas do gênero *Prototheca*.

2.2. Objetivos específicos

- Realização de análises morfofisiológicas e moleculares dos micro-organismos isolados para a identificação das espécies envolvidas;
- Avaliação da capacidade da produção de biofilme;
- Avaliação do perfil de sensibilidade;
- Descrever características epidemiológicas de casos de mastite causada por fungos e algas do gênero *Prototheca*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Aquisição de amostras

Amostras de leite de casos clínicos e subclínicos de mastite foram colhidas sistematicamente em propriedades leiteiras dos estados de São Paulo e Minas Gerais como parte de seus respectivos programas de controle de mastite. Vacas holandesas, sistema de confinamento em *freestalls* com cama de areia ou semi-confinamento, uso de rotina de ordenha completa (higienização dos quartos mamários pré e pós-ordenha, secagem com toalhas descartáveis, ordenha mecanizada e uso de luvas) e uso rotineiro de protocolos padronizados de tratamento intramamário de mastite eram as principais características das propriedades incluídas no estudo.

Na realização das coletas, os procedimentos adotados foram: *pré-dipping*, secagem com toalha de papel descartável, eliminação dos três primeiros jatos de leite e verificação de sinais de mastite clínica, realização do CMT (California Mastitis Test) para verificação de mastite subclínica e coleta de cerca de 10 ml de leite dos tetos positivos, após assepsia do orifício do teto com algodão embebido em álcool 70%. As amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas, sob temperatura de refrigeração, e enviadas ao laboratório para a realização das análises microbiológicas.

A partir das coletas e do diagnóstico microbiológico, foram incluídas no estudo 33 leveduras e 40 algas do gênero *Prototheca* provenientes de casos de mastite bovina de cinco propriedades leiteiras.

3.2. Identificação das espécies de leveduras

Os isolados foram submetidos a análises morfofisiológicas e, posteriormente, foram realizadas as análises moleculares.

Para a identificação morfofisiológica, foram utilizadas as seguintes técnicas:

- Coloração com Lactofenol Azul-algodão: lâmina para observação em microscópio e verificação das células e/ou estruturas características de fungos/ leveduras;

- Auxanograma (assimilação de carboidratos): foi utilizado um meio basal destituído de qualquer fonte de carbono no qual foi semeada a levedura. Após a semeadura, adicionou-se ao cultivo, um carboidrato e observou-se a capacidade da levedura em utilizá-lo como fonte de carbono. Quando o carboidrato é assimilado pela levedura, observa-se seu crescimento ao redor da fonte de carbono, com a formação de um halo;

- Meio cromogênico CHROMagar *Candida*: meio diferencial para algumas espécies do gênero *Candida* a partir da morfologia e pigmentação das colônias.

Para a identificação molecular, o protocolo descrito por McCoullough (2000), com pequenas modificações, foi utilizado para a obtenção do DNA e a quantificação foi feita em espectrofotômetro (NanoVue GE Healthcare). Em seguida, realizou-se a PCR para amplificação da região ITS 1-5.8S-ITS 2, com a utilização dos *primers* universais para fungos, ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS 5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'), descritos por White et al. (1990). As condições do mix de PCR, para cada amostra, foram: 12,5µl de GoTaq® Green Master Mix (Promega), 1,4 µl de cada *primer*, 3 µl de DNA e 6,7µl de água ultrapura, de acordo com o seguinte perfil de ciclagem: 94°C/5 min; 39 ciclos de 94°C/1 min, 55°C/1 min e 72°C/1,5 min; 72°C/10 min. Os resultados foram observados em gel de agarose 1,8%, com a utilização de 5µl de Sybr Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) e 3µl de marcador de 100bp. Após a PCR, foi realizada a purificação das amostras empregando-se a enzima EXOSAP-IT (USB) e, em seguida, foram preparadas para o sequenciamento. Uma vez obtidas as sequências, estas foram alinhadas no software Mega 6.0 e, após a obtenção da sequência consenso, a identificação molecular foi feita na base de dados do GenBank, empregando-se a ferramenta BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool for nucleotide – www.ncbi.nlm.nih.gov/blast).

3.3. Identificação das espécies de *Prototheca*

Os isolados de *Prototheca* foram submetidos à coloração com Lactofenol - Azul- algodão para observação das células contendo endósporos que são características do gênero, e, em seguida, foram realizadas as análises moleculares. A obtenção do DNA, assim como para as leveduras, foi feita com a utilização do protocolo descrito por McCullough (2000) e, em seguida, realizou-se a quantificação em espectrofotômetro. Para verificação das espécies envolvidas, foi realizada a técnica de PCR, com a utilização dos *primers* universais para *Prototheca* Proto18-4f (5'-GACATGGCGAGGATTGACAGA-3') e Proto18-4r (5'-AGCACACCCAATCGGTAGGA-3'), segundo Roesler et al. (2006). As condições do mix foram iguais às utilizadas para as leveduras, com o seguinte perfil de ciclagem: 95°C/5 min; 40 ciclos de 95°C/30s, 58°C/30 s e 72°C/40 s; 72°C/7 min. A análise em gel de agarose e das sequências obtidas foram realizadas da mesma forma como feito para as leveduras.

3.4. Produção de biofilme em discos de inox

Tanto as amostras de *Prototheca* quanto as leveduras, foram submetidas à análise da capacidade de produção de biofilme. Os ensaios foram realizados em triplicata, em discos de inox, à temperatura de 25°C, com o objetivo de simular os equipamentos presentes no ambiente de ordenha e a temperatura do local. Como controle positivo foi utilizada a cepa padrão ATCC S-5314 de *Candida albicans* e, como controle negativo, utilizou-se apenas os discos de inox, sem o inóculo.

Os isolados foram semeados em placas de ágar Sabouraud e incubados por 24 horas a 35°C. Em seguida, foram incubados em meio líquido YNB (Yeast Nitrogen Base) com 0,9% de glicose, sob agitação constante, por 24 horas a 25°C. As concentrações foram ajustadas para 10^7 células/ μ l e inoculadas em poços de placas de cultura de tecido, já contendo os discos previamente lavados com ácido acético glacial e autoclavados (121°C/ 15 min). Em seguida, as placas ficaram incubadas, sob agitação, por 90 minutos a 25°C para adesão das células nos discos e o líquido de cada poço foi descartado, para que se trabalhasse apenas com as células aderidas. Foi adicionado meio YNB fresco e as placas ficaram incubadas, sob agitação, por 48 horas a 25°. Os discos foram, cuidadosamente, transferidos para poços de uma nova placa contendo tampão PBS (Phosphate Buffered Saline, pH=7,0). O biofilme aderido nos discos foi quantificado com o uso de XTT {2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide} e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (filtro de 492 nm). Para verificação da produção do biofilme, foram feitas fotos de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de microscopia de fluorescência (MF) do controle positivo utilizado e de MEV para as espécies de maior prevalência.

3.5. Avaliação da susceptibilidade antifúngica

Para a avaliação da sensibilidade aos antifúngicos, foi empregada a técnica da microdiluição em meio líquido, de acordo com o documento M27-A2 do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*). A técnica consiste em avaliar a susceptibilidade das leveduras a diferentes concentrações dos antifúngicos.

No presente trabalho, avaliou-se o perfil de sensibilidade de leveduras e algas do gênero *Prototheca* para o antifúngico fluconazol e as concentrações testadas foram: 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64 e 128 μ g/ml. As leituras dos resultados foram realizadas visualmente, com o auxílio de um espelho.

Vale destacar que, apesar de ser um antifúngico de preço mais elevado, a escolha do fluconazol se deu pelo fato de outras drogas mais acessíveis financeiramente, como a nistatina e o miconazol, já serem utilizadas em medicamentos antimastíticos e não apresentarem resultados satisfatórios. Para animais de alto valor, o tratamento com fluconazol, se eficiente, pode ser uma alternativa a ser adotada.

3.6. Análise descritiva de variáveis epidemiológicas

Com o intuito de descrever características da mastite bovina causada por fungos e algas do gênero *Prototheca*, foram coletados dados referentes aos animais de uma das propriedades incluídas no estudo. A escolha desta propriedade justifica-se pelo maior número de amostras isoladas no local e pela possibilidade de obtenção dos dados, o que não foi possível junto aos outros produtores. O sistema de produção da propriedade em questão era caracterizado por um rebanho de vacas holandesas, sistema de confinamento em *freestalls* com cama de areia, uso de rotina de ordenha completa e uso rotineiro de protocolos padronizados de tratamento intramamário de mastite.

As variáveis consideradas foram: dias em lactação (DEL) no momento do caso, número de tratamentos antimicrobianos nos últimos três meses anteriores ao caso, número total de infusões de antibiótico na lactação até a data do caso, protocolos de tratamento utilizados, paridade, produção de leite (média da produção da lactação até a data do caso) e quarto infectado. O número de isolados da propriedade totalizou 14 leveduras e 23 algas do gênero *Prototheca*.

3.7. Análises estatísticas

Inicialmente, estatísticas descritivas foram produzidas para descrever as características dos casos de mastite causados por leveduras e algas do gênero *Prototheca*. Para as variáveis categóricas, o teste do Qui-quadrado foi utilizado para comparar a distribuição do quarto infectado e protocolo de tratamento entre os grupos (leveduras e algas). Para as variáveis contínuas (DEL, número de tratamentos antimicrobianos, número total de infusões do antibiótico, paridade e produção de leite), o teste de Wilcoxon foi utilizado para comparar a mediana entre os grupos. As análises estatísticas foram realizadas a partir da utilização do software SAS®9.4.

Os dados da avaliação da produção de biofilme, obtidos em valores de densidade óptica, foram submetidos à ANOVA e Teste de Tukey para comparação dos resultados entre

as espécies de leveduras e para *Prototheca zopfii*. Faixas de produção de biofilme foram elaboradas a partir do cálculo dos percentis 33 e 66%, mínimo e máximo da distribuição dos valores de densidade óptica.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Identificação dos isolados

Foram incluídas neste trabalho, 33 amostras de leveduras e 40 amostras de algas do gênero *Prototheca*. Dentre as leveduras, foram identificadas as seguintes espécies: *Pichia kudriazevii* (n=16; 48,5%), *Candida akabanensis* (n=8; 24,2%), *Candida tropicalis* (n=3; 9,1%), *Cyberlindnera jadinii* (n=2; 6,1%), *Candida glabrata* (n=1; 3%), *Candida parapsilosis* (n=1; 3%), *Candida palmiophila* (n=1; 3%) e *Candida haemulonis* (n=1; 3%).

Os resultados das análises morfofisiológicas e moleculares realizadas para identificação das leveduras são apresentados na Tabela 1 e os resultados da amplificação de DNA a partir da técnica de PCR são apresentados na Figura 1.

Os resultados obtidos corroboram com a literatura pela observação do predomínio de espécies do gênero *Candida* recorrentes em casos de mastite: dentre os isolados, 45,4% são pertencentes ao gênero. No entanto, vale destacar que a espécie *Candida albicans*, antigamente descrita como o patógeno mais comum em mastite fúngica, não foi isolada neste trabalho. Spanemberg et al. (2008), em trabalho realizado no sul do Brasil, relataram 37,9% de prevalência do gênero *Candida* mas, assim como no presente trabalho, nenhum isolado de *Candida albicans*. Ressalta-se que a grande frequência de isolamento da espécie *Candida albicans* pode ser explicada pelo avanço dos métodos diagnósticos que, antigamente, não eram capazes de diferenciar outras espécies do gênero.

As espécies *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* e *Pichia kudriazevii* já foram relatadas anteriormente em episódios de mastite. Hayashi et al. (2012) realizaram um estudo no Japão no qual observaram uma prevalência de 37,9% da espécie *Pichia kudriazevii* e 39,6% de espécies do gênero *Candida*, incluindo *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*. Sartori et al. (2014) coletaram amostras de casos de mastite de quatro estados brasileiros (SP, PR, SC e RS) e as espécies *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis* foram isoladas nas frequências 25,4%, 3,6% e 18,2%, respectivamente. Um resultado interessante é que, ao nosso conhecimento, *Candida akabanensis*, *Cyberlindnera jadinii* e *Candida palmiophila* nunca foram descritas em casos de mastite.

As espécies *Candida jadinii* e *Pichia kudriazevii* são teleomorfas das espécies *Candida utilis* e *Candida krusei*, respectivamente. Zhou et al. (2013) relataram a ocorrência destas duas espécies em trabalho de mastite fúngica realizado na China, com prevalência de 37% para *Candida krusei* e 3% para *Candida utilis*.

Vale destacar que, dentre os 16 isolados da espécie *Pichia kudriavzevii*, 15 foram isolados de uma única propriedade e este é um fator que limita o estudo, mas que também pode sugerir o potencial de disseminação pelo rebanho apresentado pela espécie.

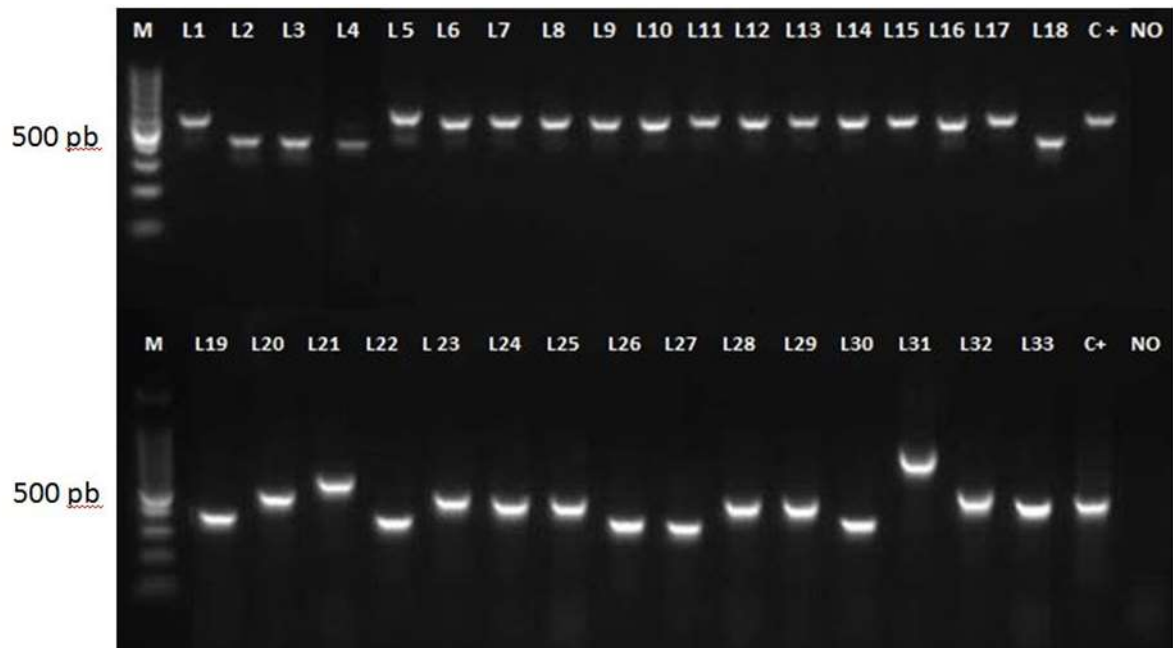


Figura 1. Gel de eletroforese evidenciando a amplificação dos isolados de leveduras obtidos a partir de casos de mastite bovina.

Tabela 1. Resultados morfofisiológicos e moleculares para os isolados de leveduras obtidos a partir de casos de mastite bovina em diferentes propriedades do estado de São Paulo e Minas Gerais.

ISOLADO	CHROMAGAR CANDIDA (cor das colônias)*	AUXANOGRAMA	SEQUENCIAMENTO ITSS1-5.8S-ITS2 RDNA
L1	Azul	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
L2	Azul	inconclusivo	<i>Candida akabanensis</i>
L3	Azul	inconclusivo	<i>Candida akabanensis</i>
L4	rósea/roxa	inconclusivo	<i>Candida akabanensis</i>
L5	rósea/roxa	inconclusivo	<i>Cyberlindnera jadinii</i>
L6	rósea/roxa	inconclusivo	<i>Pichia kudriavzevii</i>
L7	rósea/roxa	inconclusivo	<i>Pichia kudriavzevii</i>
L8	rósea/roxa	inconclusivo	<i>Pichia kudriavzevii</i>
L9	rósea/roxa	inconclusivo	<i>Pichia kudriavzevii</i>
L10	rósea/roxa	inconclusivo	<i>Pichia kudriavzevii</i>
L11	rósea/roxa	inconclusivo	<i>Pichia kudriavzevii</i>
L12	rósea/roxa	inconclusivo	<i>Pichia kudriavzevii</i>
L13	rósea/roxa	inconclusivo	<i>Pichia kudriavzevii</i>
L14	rósea/roxa	inconclusivo	<i>Pichia kudriavzevii</i>
L15	rósea/roxa	inconclusivo	<i>Pichia kudriavzevii</i>
L16	rósea/roxa	inconclusivo	<i>Pichia kudriavzevii</i>
L17	azul	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
L18	rósea/roxa	inconclusivo	<i>Candida akabanensis</i>
L19	azul	inconclusivo	<i>Candida akabanensis</i>
L20	rósea/roxa	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
L21	rósea/roxa	inconclusivo	<i>Candida palmiophila</i>
L22	azul	inconclusivo	<i>Candida akabanensis</i>
L23	azul	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
L24	rósea/roxa	inconclusivo	<i>Pichia kudriavzevii</i>
L25	rósea/roxa	inconclusivo	<i>Pichia kudriavzevii</i>
L26	azul	inconclusivo	<i>Candida akabanensis</i>
L27	rósea/roxa	inconclusivo	<i>Candida haemulonis</i>
L28	rósea/roxa	inconclusivo	<i>Pichia kudriavzevii</i>
L29	rósea/roxa	inconclusivo	<i>Pichia kudriavzevii</i>
L30	azul	inconclusivo	<i>Candida akabanensis</i>
L31	rósea/roxa	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
L32	rósea/roxa	inconclusivo	<i>Cyberlindnera jadinii</i>
L33	rósea/roxa	inconclusivo	<i>Pichia kudriavzevii</i>

*Colônia azul: *Candida tropicalis*; Colônia verde: *Candida albicans*; Colônia rósea/roxa: podem caracterizar *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* e outras espécies, portanto geram resultados inconclusivos.

Quanto à identificação convencional (CHR e Auxanograma) realizada para as leveduras, foram encontrados muitos resultados inconclusivos, como observado na Tabela 1. A identificação realizada a partir de metodologias clássicas tem se tornado difícil (REISS et. al, 1998) e as técnicas moleculares têm se mostrado ferramentas mais eficientes para a identificação correta dos micro-organismos (MAKIMURA et. al, 1994).

Uma observação relevante durante a realização das análises morfofisiológicas foram os padrões de coloração das colônias em CHR e de assimilação de carboidratos dos isolados da espécie *Pichia kudriavzevii*, visto que todos se apresentaram com coloração rósea/ roxa e com capacidade de assimilar apenas glicose e manitol. *Candida krusei*, anamorfa de *Pichia kudriavzevii*, também apresenta colônia rósea/ roxa em CHR, mas apenas assimila glicose na técnica do auxanograma.

Dentre os 40 isolados de *Prototheca*, todos foram identificados, molecularmente, como *Prototheca zopfii* e este resultado corrobora com trabalhos anteriores que relatam esta espécie como a mais recorrente em casos de mastite bovina causada por algas. Em estudo realizado na Polônia, Jagielski et al. (2011) avaliaram 44 isolados de *Prototheca* e 43 eram pertencentes à *Prototheca zopfii* genótipo 2 e apenas 1 pertencente à espécie *Prototheca blaschkeae*. Estes resultados contribuem para a hipótese de que *Prototheca zopfii* genótipo 1, provavelmente, não apresenta potencial patogênico e de que *Prototheca blaschkeae* pode ser esporadicamente isolada em casos de mastite bovina.

Os resultados obtidos a partir da realização da PCR e corrida eletroforética para os isolados de *Prototheca* podem ser observados na Figura 2.

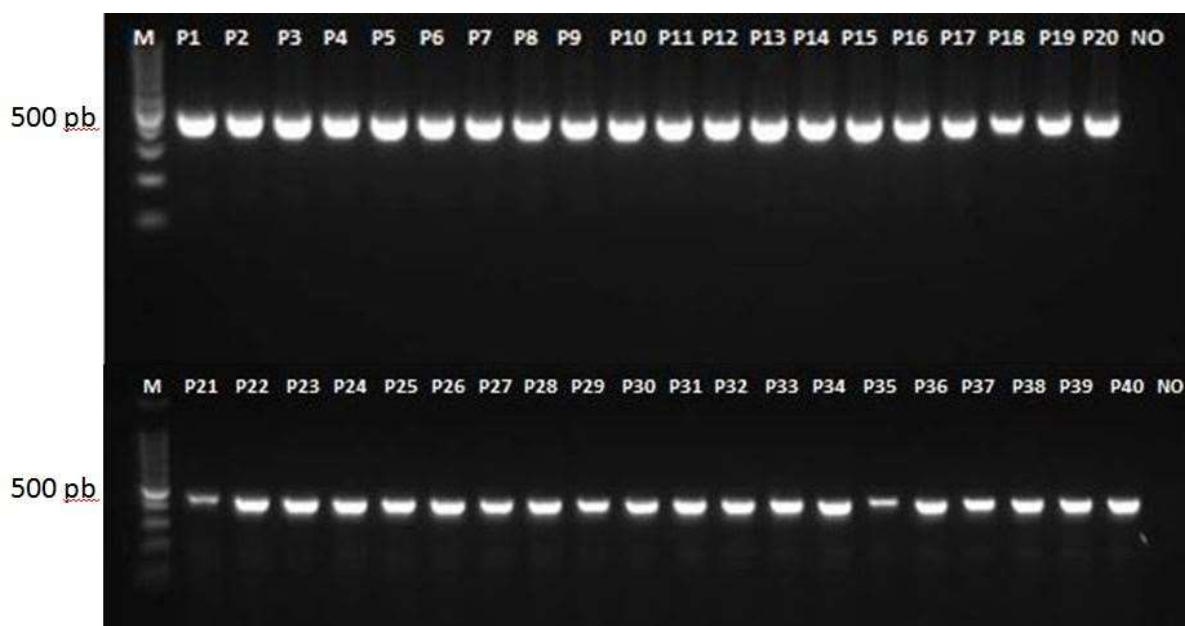
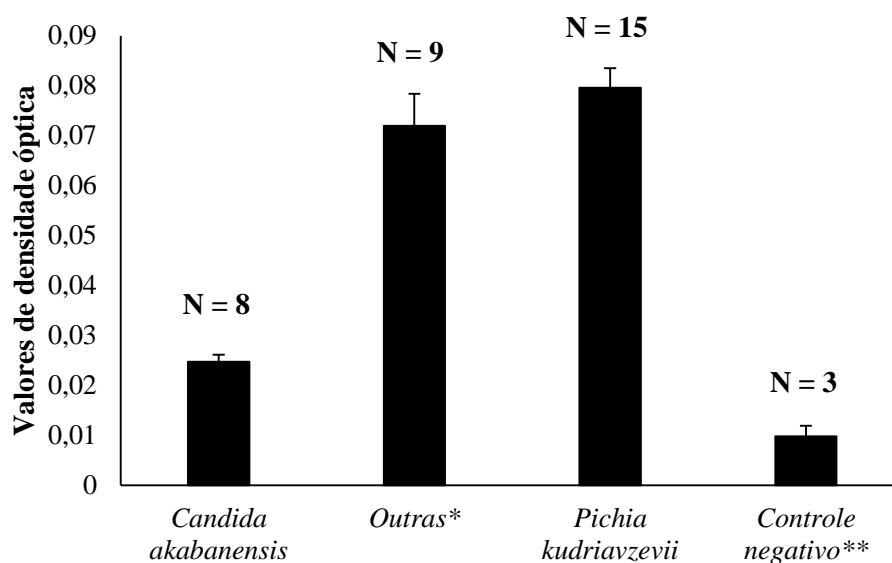


Figura 2. Gel de eletroforese evidenciando a amplificação dos isolados de *Prototheca* obtidos a partir de casos de mastite bovina.

4.2. Produção de biofilme

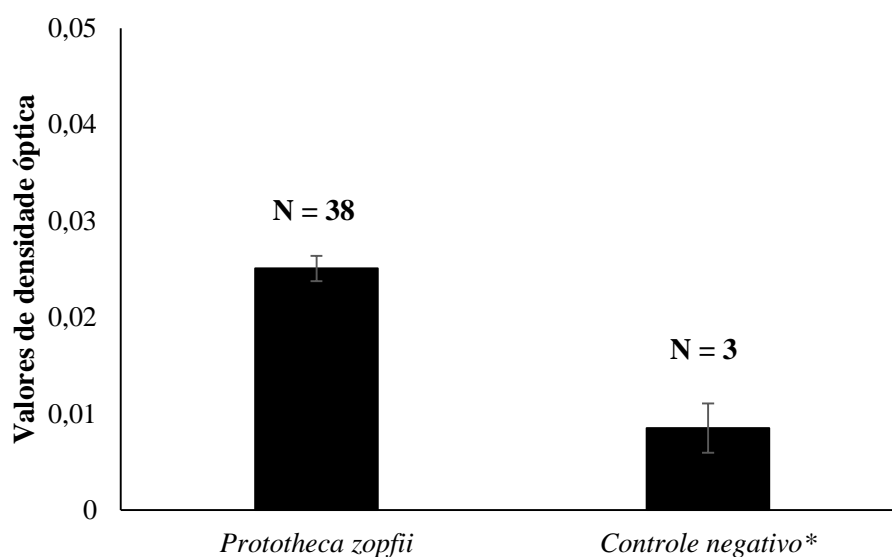
Nas Figuras 3 e 4 são apresentados os resultados das médias dos valores de densidade óptica para as espécies de leveduras e para *Prototheca zopfii*.

Considerando-se o cálculo dos percentis 33 e 66% e dos valores mínimo e máximo para cada grupo, obtidos a partir das médias dos valores de densidade óptica (Tabela 2), foram estabelecidas três faixas de produção de biofilme: baixa, moderada e alta, para classificação dos isolados. Na Tabela 3 é apresentado o número de isolados em cada uma destas faixas.



**C. haemulonis* (n=1), *C. palmiophila* (n=1), *C. glabrata* (n=1), *C. parapsilosis* (n=1), *C. tropicalis* (n=3) e *C. jadinii* (n=2) / **contém apenas o disco de inox, sem inóculo.

Figura 3. Valores de densidade óptica para as espécies de leveduras isoladas.



*contém apenas o disco de inox, sem inóculo.

Figura 4. Valores de densidade óptica para os isolados da espécie *Prototheca zopfii*.

Tabela 2. Percentis 33 e 66%, mínimo e máximo da distribuição dos valores de densidade óptica para cada um dos grupos considerados: *Pichia kudriavzevii*, *Candida akabanensis*, Outras e *Prototheca zopfii*.

Grupos	Mínimo	Percentil 33%	Percentil 66%	Máximo
<i>Pichia kudriavzevii</i>	0,024	0,066	0,084	0,133
<i>Candida akabanensis</i>	0,013	0,022	0,025	0,045
Outras	0,038	0,051	0,072	0,146
<i>Prototheca zopfii</i>	0,001	0,018	0,029	0,072

Tabela 3. Número de isolados para cada faixa de produção de biofilme determinada a partir dos percentis 33 e 66% e dos valores mínimo e máximo da distribuição dos valores de densidade óptica para cada um dos grupos considerados: *Pichia kudriavzevii*, *Candida akabanensis*, Outras e *Prototheca zopfii*.

Grupos	Fraca	Moderada	Alta
<i>Pichia kudriavzevii</i>	0,024-0,066 n=5/ 33,33%	0,067-0,084 n=4/ 26,67%	0,085-0,133 n=6/ 40%
<i>Candida akabanensis</i>	0,013-0,022 n=3/ 37,5%	0,023-0,025 n=3/ 37,5%	0,026-0,045 n=2/ 25%
Outras	0,038-0,051 n=3/ 33,33%	0,052-0,072 n=3/ 33,33%	0,073-0,146 n=3/ 33,33%
<i>Prototheca zopfii</i>	0,001-0,018 n=12/ 31,57	0,019-0,029 n=16/ 42,10%	0,03-0,072 n=10/ 26,31%

Para validação da metodologia empregada nos testes de produção de biofilme, foram feitas fotos de MEV e MF do controle positivo, como observado nas Figuras 5 e 6. Nas fotos é possível observar a adesão celular, formação de hifas e da matriz, confirmando que a metodologia foi capaz de induzir a produção de biofilme. Nas Figuras 7 e 8 são apresentadas fotos de alguns isolados de leveduras, evidenciando características típicas da produção de biofilme.

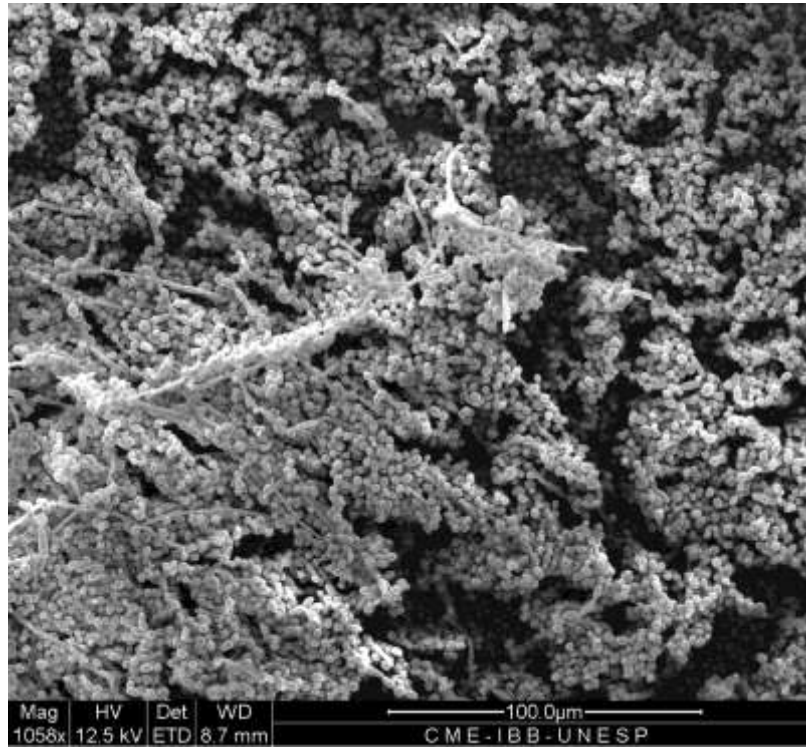


Figura 5. Microscopia eletrônica de varredura do controle positivo ATCC SC-5314/ *Candida albicans*, sendo possível a observação de adesão celular, formação de hifas e matriz.

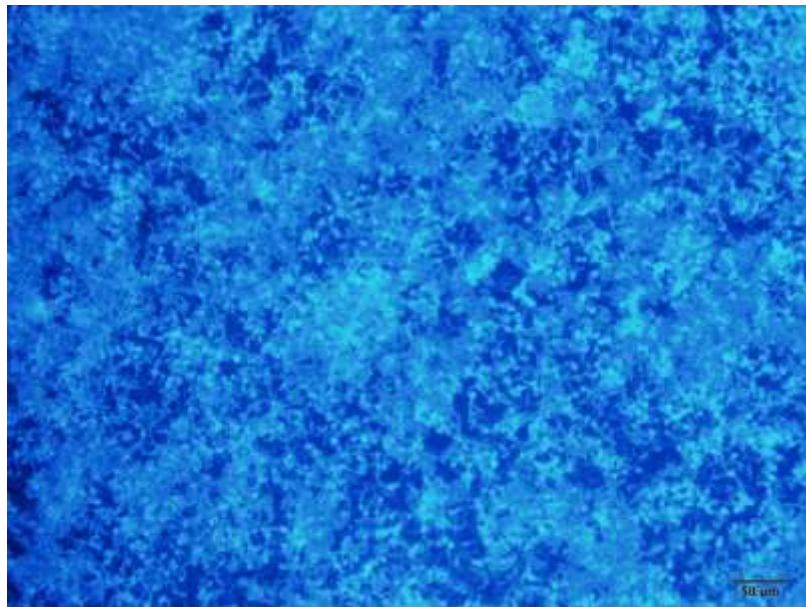


Figura 6. Microscopia de fluorescência do controle positivo ATCC SC-5314/ *Candida albicans*.

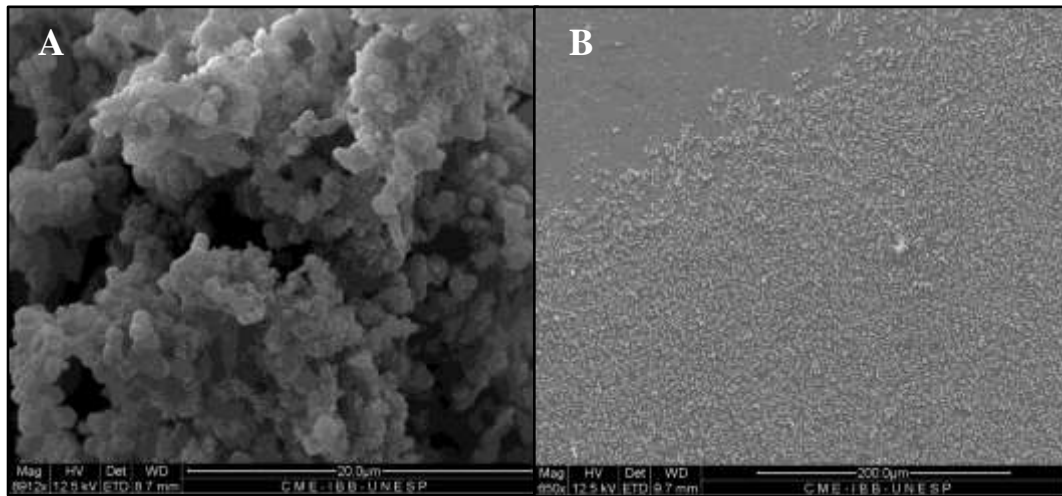


Figura 7. Microscopia eletrônica de varredura de isolado da espécie *Candida akabanensis* sendo possível a observação da aglomeração celular e matriz. A: adesão celular e matriz do biofilme; B: menor aumento, evidenciando a adesão no disco de inox.

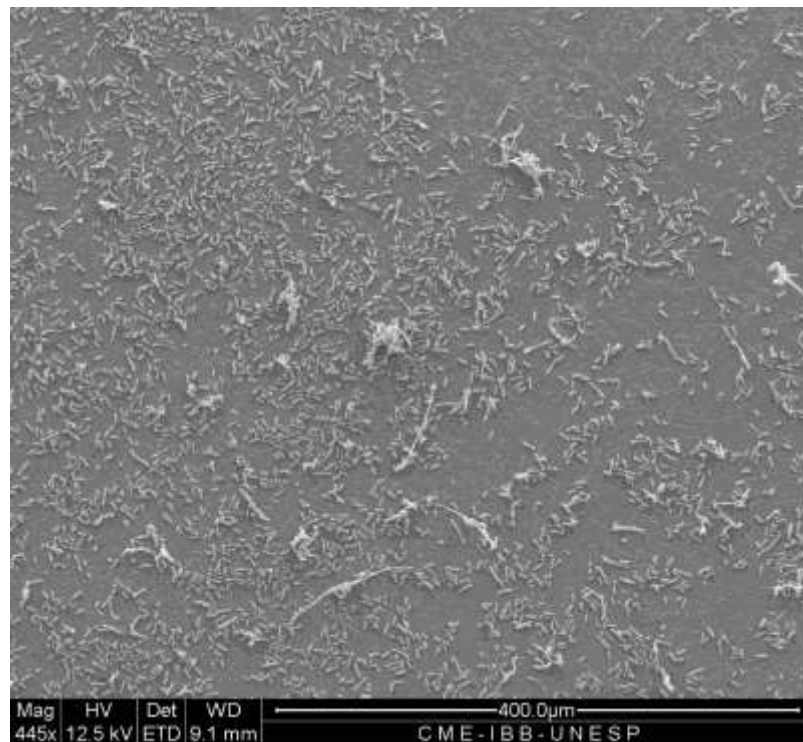


Figura 8. Microscopia eletrônica de varredura de isolado da espécie *Pichia kudriavzevii*, evidenciando a aglomeração das células e formação de hifas na superfície do disco de inox.

Observando-se os resultados obtidos em valores de densidade óptica, sugere-se que a espécie *Pichia kudriavzevii* possui maior capacidade de produção de biofilme (média=0,079), enquanto que a espécie *Candida akabanensis* apresentou capacidade semelhante à *Prototheca zopfii* (média em torno de 0,025). No grupo “Outras”, os resultados das médias para cada espécie foram: *Candida haemulonis*=0,109; *Candida palmiophila*=0,043; *Candida glabrata*=0,136; *Candida parapsilosis*=0,046 e *Cyberlindnera jadinii*=0,043. Para estes isolados, destacam-se os valores elevados obtidos para as espécies *Candida haemulonis* e *Candida glabrata*. No entanto, vale destacar que o n destas espécies foi muito pequeno para afirmar que são produtoras de biofilme mais eficientes.

Na área da medicina humana, Bruder-Nascimento et al. (2014) descreveram a capacidade de produção de biofilme de diversas espécies do gênero *Candida*, tais como: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida glabrata*, sendo que as espécies não-albicans mostraram maior eficiência em relação a esta capacidade.

Para os isolados da espécie *Prototheca zopfii*, observou-se, na MEV (Figuras 9 e 10), a aglomeração e adesão das células e os esporângios realizando a liberação dos endósporos. Gonçalves et al. (2015) também observaram a liberação de endósporos em experimento realizado a 25°C. Além disto, relataram que foi observada maior aglomeração celular a 25°C, em comparação ao experimento realizado a 37°C. Vale destacar que nesta temperatura foi observada a formação de uma estrutura escura ao redor das células que, segundo os autores, era semelhante à camada lipídica da parede celular. No presente trabalho, a 25°C, também não foi observada a formação desta estrutura.

De acordo com o que foi apresentado por Gonçalves et al. (2015), os resultados obtidos neste trabalho evidenciam a capacidade de produção de biofilme da espécie *Prototheca zopfii* a 25°C. No entanto, a realização de novos estudos é de extrema importância para proporcionar um melhor entendimento em relação à capacidade de produção de biofilme destas algas, que parece diferir do que é comumente observado para bactérias e fungos.

Vale destacar que, no presente estudo, não foram realizados experimentos a 37°C, visto que o objetivo foi simular as condições de temperatura do ambiente de ordenha.

Em relação às faixas de produção (baixa, moderada e alta), os resultados obtidos são semelhantes aos encontrados por Gonçalves et al. (2015), que relataram 1 (10%) isolado com baixa produção, 5 (50%) com produção moderada e 4 (40%) com alta produção, enquanto que neste trabalho foram observados 12 (31,58%) isolados com baixa produção, 16 (42,10%) com produção moderada e 10 (26,31%) com alta produção, evidenciando a maior ocorrência de

isolados na faixa moderada para ambos os trabalhos mesmo tratando-se de metodologias diferentes.

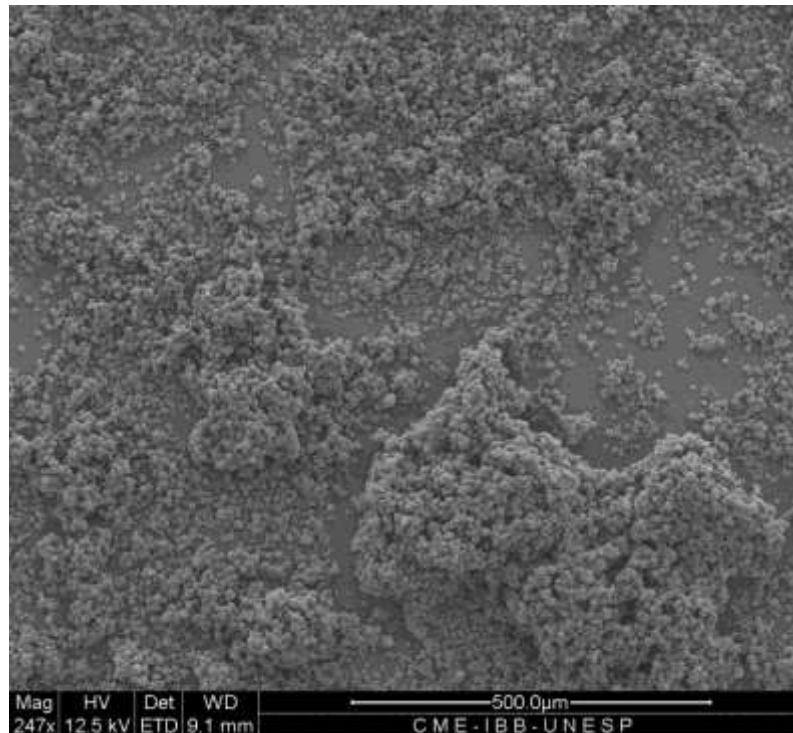


Figura 9. Microscopia eletrônica de varredura de isolado da espécie *Prototheca zopfii*, evidenciando-se a aglomeração das células e adesão no disco de inox.

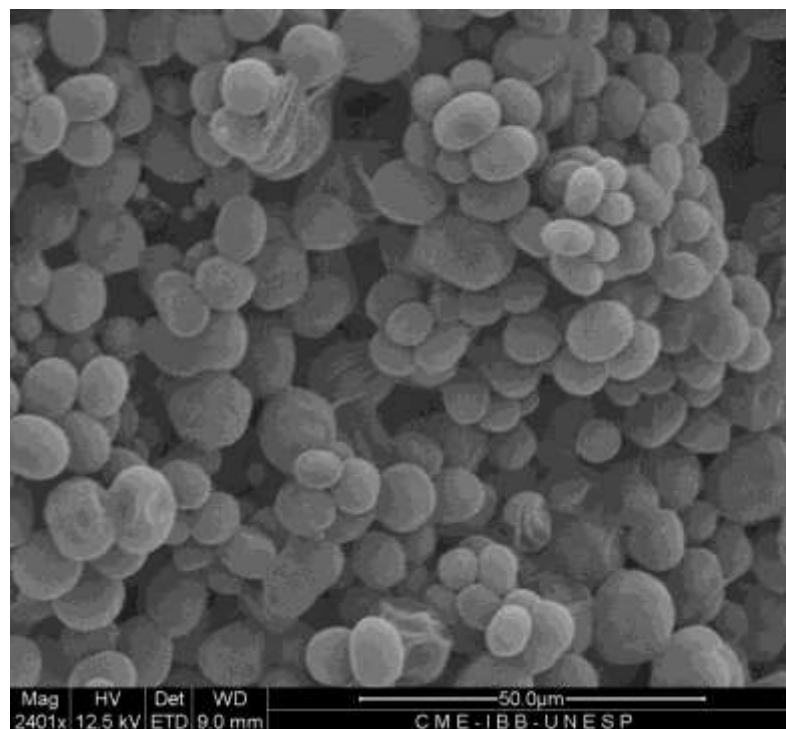


Figura 10. Microscopia eletrônica de varredura de isolado da espécie *Prototheca zopfii*, evidenciando-se detalhes da aglomeração celular, com a observação dos endósporos.

Não existem estudos anteriores que utilizaram o mesmo protocolo de produção de biofilme utilizado neste trabalho. A escolha desta metodologia se deu pelo fato de já ser utilizada no laboratório para avaliação da produção de biofilme em discos de silicone, que simulam os cateteres utilizados em pacientes hospitalizados. Além disto, não existem relatos na literatura sobre a produção de biofilme em discos de inox para leveduras, enquanto que para *Prototheca*, apesar da utilização de aço inoxidável, a metodologia empregada foi diferente, assim como ocorre para trabalhos na área da bacteriologia.

A constatação da capacidade de produção de biofilme dos micro-organismos em materiais presentes no ambiente de ordenha trata-se de um fato de extrema relevância, visto que a habilidade de produzir biofilme é um fator de virulência que permite a persistência do micro-organismo no ambiente, mesmo frente à ação de desinfetantes e calor.

4.3. Perfil de sensibilidade ao fluconazol

Dentre os isolados de *Prototheca*, todos se mostraram resistentes ao fluconazol, visto que não houve inibição em relação ao controle de crescimento em nenhuma das concentrações testadas (de 0,25 a 128µg/ ml). Jagielski et al. (2012) já haviam observado resistência de *Prototheca zopfii* ao fluconazol em concentrações de até 256 µg/ ml, além da resistência a diversos outros antifúngicos. Para a nistatina, antifúngico comumente utilizado em antimastiticos, existem trabalhos que relatam uma sensibilidade de cerca de 90%, enquanto outros observaram menos de 50% de isolados sensíveis. O uso de produtos naturais também vem sendo testado para isolados de *Prototheca zopfii* e tem gerado resultados interessantes (WAWRON et al., 2003; TORTORANO et al., 2008; LOPES et al., 2008). Diante da elevada resistência destas algas frente a antimicrobianos, tanto sintéticos quanto naturais, destaca-se a importância de novos estudos de sensibilidade para estes micro-organismos que caracterizam um problema de extrema importância na pecuária leiteira em todo o mundo.

Em relação às leveduras, os resultados podem ser observados na Tabela 3. O isolado de *Candida tropicalis* foi o único que se mostrou resistente ao fluconazol. Para esta espécie, a faixa de concentração inibitória mínima da cepa de referência (ATCC 750) no documento M27-A2 do CLSI é de 1 a 4µg/ ml, enquanto que neste trabalho foi observada uma CIM de 64 (µg/ ml), demonstrando resistência ao fluconazol. Na medicina humana, também existem trabalhos que relataram cepas de *Candida tropicalis* resistentes ao fluconazol, demonstrando a variabilidade do perfil de sensibilidade mesmo em cepas pertencentes à mesma espécie. (MENEZES et al., 2009).

As espécies que se apresentaram sensíveis ao fluconazol foram *Candida parapsilosis* (n=1), *Cyberlindnera jadinii* (n=2) e *Candida akabanensis* (n=3). Para a espécie *Candida parapsilosis*, a CIM esperada era de 1 a 4µg/ ml, de acordo com a cepa de referência (ATCC 22019) do documento M27-A2 e, neste trabalho, foi observada CIM de 4µg/ ml para esta espécie, resultado que corrobora com o perfil de sensibilidade ao fluconazol desta espécie.

Um resultado interessante foi o fato de todos os isolados da espécie *Pichia kudriavzevii* apresentarem sensibilidade dose independente, com CIM de 32µg/ ml. Considerando-se que esta espécie é teleomorfa de *Candida krusei*, esperava-se um CIM na faixa de 16 a 64 µg/ ml (ATCC 6258) e, portanto, os resultados obtidos foram concordantes com o esperado.

Além dos isolados da espécie *Pichia kudriavzevii*, os isolados de *Candida haemulonis*, *Candida palmioleophila* e dois isolados da espécie *Candida akabanensis* também apresentaram sensibilidade dose-dependente.

Em trabalho recente de candidemia, realizado no sul do Brasil, foram obtidos isolados de diversas espécies do gênero *Candida*, sendo que os isolados das espécies *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* apresentaram-se 100% sensíveis ao fluconazol, enquanto que os isolados de *Candida krusei* mostraram-se 100% resistentes e para *Candida glabrata* 50% dos isolados apresentaram sensibilidade intermediária e 50% foram resistentes (SILVA et al., 2015).

Vale destacar a escassez de estudos de avaliação do perfil de sensibilidade para leveduras isoladas a partir casos de mastite bovina e a importância de tratamentos efetivos para estas infecções.

Tabela 5. Resultados da análise das variáveis epidemiológicas - DEL no momento do caso, número de tratamentos antimicrobianos nos últimos três meses anteriores ao caso (n casos), número total de infusões de antibiótico na lactação até a data do caso, protocolos de tratamento utilizados, paridade, produção de leite e quarto infectado - em relação ao rebanho de uma das propriedades incluídas no estudo.

Variáveis contínuas	<i>Prototheca</i> (n=23)			Leveduras (n=14)			Valor P
	mín	mediana	máx	mín	mediana	máx	
DEL	27	131	300	20	194	287	0,75
N casos	0	2	4	0	1,5	3	0,24
Paridade	1	2	4	1	2	4	0,55
Produção	21,4	40,2	52,2	30,7	43,7	51,2	0,23
Infusões	0	10	20	0	7,5	15	0,15

Variáveis categóricas	<i>Prototheca</i>	Leveduras	Valor P
	n/ %	n/ %	
Quarto			0,07
AD	14/ 60,87	2/ 28,57	
AE	6/ 26,09	3/ 35,71	
PD	0/ 0	5/ 21,43	
PE	3/ 13,04	4/ 14,29	
Protocolo			0,27
SP	8/ 40	7/ 53,85	
CO	0/ 0	1/ 7,69	
COSP	12/ 60	5/ 38,46	

AD=anterior direito; AE=anterior esquerdo; PD=posterior esquerdo; PE=posterior esquerdo; SP=Spectramast (cloridrato de Ceftiofur); CO=Cobactan (sulfato de Cefquinoma).

Analisando-se os resultados obtidos, verificou-se que não houve diferença estatística entre leveduras e *Prototheca zopfii* em relação às variáveis epidemiológicas consideradas.

Dentre as variáveis, destaca-se o número de tratamentos anteriores e de infusões de antimicrobianos para ambos os grupos, sugerindo que este pode ter sido um fator de risco para os casos de mastite fúngica e causada por *Prototheca zopfii*. Vale ressaltar que o uso indiscriminado de antibióticos trata-se de um sério problema dentro da temática das infecções devido à aquisição de resistência dos micro-organismos e alterações na microbiota. Na pecuária leiteira, também é considerada a possibilidade de contaminação no momento da aplicação do antimicrobiano, quando não é realizada uma antisepsia adequada (JAIN & JOSEPH, 2013).

Ressalta-se também que, em relação às variáveis DEL e paridade, é relatada na literatura uma maior frequência de casos clínicos de mastite no início da lactação, quando os animais estão mais susceptíveis devido à recente parição. Quanto à paridade, animais de maior idade são descritos como mais sensíveis às infecções (MEKIBIB et al., 2010; SARKER et al., 2013). No entanto, para a propriedade em questão, a maioria dos casos ocorreu acima dos 100 dias de lactação e em animais com apenas duas partições para ambos os grupos e, portanto, estas variáveis não influenciaram os casos de mastite por algas e leveduras da propriedade.

Um último ponto relevante foi a observação da maior parte dos casos em quartos anteriores, visto que é reportada uma maior prevalência de casos de infecção intramamária em quartos posteriores (LANGONI & DOMINGUES, 1998). Diante disto, pode ser possível que os quartos anteriores tenham recebido maior número de infusões de antimicrobianos anteriormente e isto tenha facilitado a ocorrência das infecções causadas por leveduras e algas.

O número de isolados da propriedade foi pequeno para a realização de uma análise epidemiológica mais aprofundada e de maior relevância. No entanto, diante de poucos trabalhos epidemiológicos de leveduras e algas isoladas de casos de mastite bovina, julgou-se relevante a apresentação do que pôde ser observado, mesmo que apenas para uma das propriedades do estudo.

5. CONCLUSÕES

Apesar de as espécies do gênero *Candida* serem descritas como os principais agentes envolvidos em casos de mastite fúngica, os resultados obtidos no presente trabalho mostraram maior prevalência da espécie *Pichia kudriavzevii*.

Candida albicans, antigamente uma das principais espécies envolvidas em casos de mastite fúngica, não foi isolada, e *Candida akabanensis*, *Cyberlindnera jadinii* e *Candida palmiophila* nunca haviam sido descritas em casos da doença.

Dentre os 16 isolados da espécie *Pichia kudriavzevii*, 15 foram isolados de uma única propriedade e este é um fator que pode limitar o estudo, mas que também pode sugerir o potencial de disseminação pelo rebanho apresentado por esta espécie.

A diversidade das espécies de leveduras e o não isolamento da espécie *Candida albicans* sugerem que a utilização de técnicas moleculares permite a realização de diagnósticos mais precisos, os quais têm sido limitados pelo uso de métodos fenotípicos tradicionais.

Todos os isolados do gênero *Prototheca* foram identificados como *Prototheca zopfii* e este resultado é similar a estudos anteriores que descrevem *Prototheca zopfii* (genótipo 2) como a principal espécie envolvida em mastite bovina causada por algas.

Os resultados da produção de biofilme evidenciam que tanto leveduras quanto algas da espécie *Prototheca zopfii* possuem esta habilidade, sendo este um importante fator de virulência para a manutenção destes micro-organismos no ambiente de ordenha.

A análise do perfil de sensibilidade para o antifúngico fluconazol revelou que os isolados de *Prototheca zopfii* mostraram-se resistentes mesmo à maior concentração testada, comprovando, mais uma vez, a dificuldade de tratamento para este patógeno. No caso das leveduras, o perfil de sensibilidade variou entre os isolados, sendo que um maior número apresentou sensibilidade dose-dependente.

Na análise epidemiológica realizada em uma das propriedades incluídas no estudo não foi observada diferença estatística entre leveduras e *Prototheca zopfii* para as variáveis consideradas. Destacou-se o elevado número de tratamentos anteriores e de infusões de antimicrobianos observados para ambos os grupos e que podem ser fatores de risco para a mastite bovina causada por patógenos ambientais.

A mastite bovina causada por leveduras e algas da espécie *Prototheca zopfii* caracterizam um problema recorrente no cenário da pecuária leiteira. A ocorrência da doença pode se dar de forma esporádica, mas também caracterizar surtos de difícil reversão que

podem comprometer um rebanho inteiro. Diante disto e, considerando-se os resultados obtidos no presente trabalho, principalmente em relação à capacidade de produção de biofilme e perfil de sensibilidade, destaca-se a importância de estudos que promovam maior entendimento da epidemiologia da mastite bovina causada por leveduras e algas, com o intuito de aprimorar programas de prevenção e tratamento da infecção.

6. REFERÊNCIAS

- AALBAEK, B.; STENDERUP, J.; JENSEN, H. E.; VALBAK, J.; NYLIN, B.; HUDA, A. Mycotic and algal bovine mastitis in Denmark. *Acta Pathologica, microbiologica et immunologica scandinavica*, 102:451–6 – 16, 1994.
- ALMEIDA, R. A.; OLIVER, S.P. Interaction of coagulase-negative *Staphylococcus* species with bovine mammary epithelial cells. *Microbial Pathogenesis*, 31, 205–212, 2001.
- ANDRADE, M.A.; MESQUITA, A.K.; DIAS FILHO, F. C.; JAYME, V. S. Prevalência e etiologia de mastite bovina subclínica em propriedades do estado de Goiás que utilizam ordenhadeiras na obtenção do leite. *Anais Esc. Agron e Vet*, 28 (1): 29-42, 1998.
- AWAD, F.I.; EL MOLLA A, FAYED A, ABD EL-HALIM M, REFAI M. Studies of mycotic mastitis in Egypt. *Journal of the Egyptian Veterinary Medical Association*, 40(3):35 - 41. 15, 1980.
- BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. Yeast: Characteristics and Identification. *Cambridge University Press*, 1139pp, 2000.
- BECK, H. S.; WISE, W. S.; DODD, F. H. Cost benefit analysis of bovine in the UK. *Journal of Dairy Research*, v. 59, p. 449-460, 1992.
- BRADLEY, A. J. Bovine mastitis: An evolving disease. *The Veterinary Journal*, v. 164, n. 2, p. 116-128, 2002.
- BRUDER-NASCIMENTO, A. C. O.; CAMARGO, C.H.; MONDELLI, A. L.; SUGIZAKI, M. F.; SADATSUNE, T.; BAGAGLI, E. *Candida* species biofilm and *Candida albicans* ALS3 polymorphisms in clinical isolates. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45, 4, 1371-1377, 2014.
- CORBELLINI, L. G., D. DRIEMEIER, C. CRUZ, M. M. DIAS, AND L. FERREIRO. Bovine mastitis due to *Prototheca zopfii*: Clinical, epidemiological and pathological aspects in a Brazilian dairy herd. *Tropical Animal Health and Production*, 33:463–470, 2001
- COSTA, E. O. Importância econômica da mastite infecciosa bovina. *Revista Comunicações Científicas Faculdade Medicina Veterinária Zootecnia USP*, v.15, nº I, p.21-26, 1991.
- COSTA, E.O.; GANDRA, C.R.; PIRES, M.F.; COUTINHO, S.D.; TEIXEIRA, C. M. Survey of bovine mycotic mastitis in dairy herds in the state of São Paulo, Brazil. *Mycopathologia*, 124:13–7, 1993.
- COSTA, E.O.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T.; MELVILLA, P.A. Infectious bovine mastitis caused by environmental organisms. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 45:65–71, 1998.

COSTA, E.O.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T.; GARINO, J.R.F.; SILVA, J.A.B.; JUNQUEIRA, L. Controle de surto de mastite por *Prototheca zopfii* em uma propriedade leiteira. *Núcleo de Apoio à pesquisa da Glândula Mamária*, 1;2:12-6, 1999.

COSTA, G.M.; SILVA, N.; ROSA, C. A.; FIGUEIREDO, H. C. P.; PEREIRA, U. P. Mastite por leveduras em bovinos leiteiros do Sul do Estado de Minas Gerais, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.38, n.7, p.1938-1942, out, 2008.

CRISPIN, L. S. *Prototheca zopfii*: características do agente, marcadores e fatores de virulência. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES, 3., 1999, Botucatu. Anais... Botucatu: FMVZ-Unesp, 1999. p. 35-41.

CRUPPE, L.H.; HOE, F.; FRANCO, F.; VASCONCELOS, C. Characteristics of mastitis agents in brazilian dairy farms. NMC Annual Meeting Proceedings, 2008.

GARRET, T.R.; BHAKOO, M.; ZHANG, Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science*, v.18, p. 1049-1056, 2008.

GONÇALVES, J.L.; LEE, S. H. I.; ARRUDA, E. P.; GALLES, D. P.; CAETANO, V. C.; OLIVEIRA, C. A. F.; FERNANDES, A. M.; SANTOS, M.V. Biofilm-producing ability and efficiency of sanitizing agents against *Prototheca zopfii* isolates from bovine subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science*. vol. 98 n. 6, 2015.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J.W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews – Microbiology*, v.2, p. 95-108, 2004.

HAWARI, A. D.; AL-DABBAS, F. Prevalence and distribution of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Jordan. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 3 (1): 36-39, 2008.

HAYASHI, T.; SUGITA, T.; HATA, E; KATSUDA, K.; ZHANG, E.; KIKU, Y.; SUGAWARA, K.; OZAWA, T.; MATSUBARA, T.; ANDO, T.; OBAYASHI, T.; ITO, T.; YABUSAKI, T.; KUDO, K.; YAMAMOTO, H.; KOIWA, M.; OSHIDA, T.; TAGAWA, Y.; KAWAI, K. Molecular-Based Identification of Yeasts Isolated from Bovine Clinical Mastitis in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 75(3): 387–390, 2012.

HOGAN, J.; SMITH, K. L. Managing Environmental Mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 28, n.2, p. 217-224, 2012.

JAGIELSKI,T.; LAGNEAU, P.E. Protothecosis: A pseudofungal infection. *Journal of Medical Mycology*, 17: 261–70, 2007.

- JAGIELSKI, T.; LASSA, H.; AHRHOLDT, J.; MALINOWSKI, E.; ROESLER, U. Genotyping of bovine *Prototheca* mastitis isolates from Poland. *Veterinary Microbiology*, 149 283–287, 2011.
- JAGIELSKI, T.; BUZZINI, P.; LASSA, H.; MALINOWSKI, E.; BRANDA, E.; TURCHETTI, B.; POLLEICHTNER, A.; ROESLER U.; LAGNEAU, P., MARQUES, S.; SILVA, E.; THOMPSON, G.; STACHOWIAK, R.; BIELECKI, J. Multicentre Etest evaluation of in vitro activity of conventional antifungal drugs against European bovine mastitis *Prototheca* spp. isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, doi:10.1093/jac/dks134, 2012.
- JÁNOSI, S.; SZIGETI, G.; RATZ F.; LAUKO, T.; KERENYI, J.; TENK, M.; KATONA, F.; HUSZENICZA, A.; KULCSAR, M.; HUSZENICZA, G. *Prototheca zopfii* mastitis in dairy herds under continental climatic conditions. *Veterinary Quarterly*, 23:80–83, 2001.
- JÁNOSI, S.; RÁTZ, F.; SZIGETI, G.; KULCSÁR, M.; KERÉNYI, J.; LAUKÓ, T.; KATONA, F.; HUSZENICZA, G. Review of the microbiological, pathological and clinical aspects of bovine mastitis caused by the alga *Prototheca zopfii*. *The Veterinary Quarterly*, The Hague, v. 23, n. 2, p. 58-61, 2001a.
- KRUKOWSKI, H.; TIETZE, M.; MAJEWSKI, T.R.; ROZANSKI, P. Survey of yeast mastitis in dairy herds of small-type farms in the Lublin region, *Mycopathologia*, Poland, 150:5–7 – 9, 2000.
- KRUKOWSKI, H.; SABA, L. Bovine mycotic mastitis. (A review). *Folia Veterinaria*, v.47, n.1, p.3-7, 2003.
- LAGNEAU, P.E.; LEBTAHI, K.; SWINNE, D. Isolation of yeasts from bovine milk in Belgium. *Mycopathologia*, v.135, p.99-102, 1996.
- LANGONI, H.; CABRAL, K.G.; TONIN, F.B.; GIMENES, S.M. Importância das leveduras na mastite bovina. *Pesquisa Agropecuária Gaúcha*, v. 3, n.2, p. 207-209, 1997.
- LANGONI, H.; DOMINGUES, P.F.; FUNARI, S. R. C.; DIAS, H. L. T. Mastite bovina por *Prototheca* sp. 4º Congresso de Iniciação Científica da Universidade Estadual Paulista. Araçatuba. UNESP. 1992. p.92-3.
- LANGONI, H.; DOMINGUES, P.F. Prevalência de mastite bovina e sua distribuição por quartos. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v.20, n.2, p.85-87, 1998.
- LANGONI, H.; TRONCARELLI, M. Z.; WANDERLEY, G. G.; SALINA, A. Prototecose mamária: um problema nos rebanhos leiteiros. *Veterinária e Zootecnia*, 20(4): 552-566, dez. 2013.

- LASSA, H., JAGIELSKI, T.; MALINOWSKI, E. Effect of different heat treatments and disinfectants on the survival of *Prototheca zopfii*. *Mycopathologia*, 171:177–182, 2011.
- LEBLANC, S. J.; LISSEMORE, K. D.; KELTON, D. F.; DUFFIELD, T. F.; LESLIE, K. E. Major advances in disease prevention in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 89, n. 4, p. 1267-1279, 2006.
- LOPES, M.M.; RIBEIRO, R.; CARVALHO, D.; FREITAS, G. In vitro antimicrobial susceptibility of *Prototheca* spp. isolated from bovine mastitis in a Portugal dairy herd. *Journal de Mycologie Médicale*, 18, 205—209, 2008.
- MAKIMURA, K.; MURAYAMA, S. Y.; YAMAGUCHI, H. Detection of a wide range of medically important fungi by the polymerase chain reaction. *Journal of Medical Microbiology*, 40: 358–36, 1994.
- MARQUES, S., E. SILVA, J. CARVALHEIRA, AND G. THOMPSON. Short communication: In vitro antimicrobial susceptibility of *Prototheca wickerhamii* and *Prototheca zopfii* isolated from bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*, 89:4202–4204, 2006.
- MCCOULLOUGH, M.J. et al. Molecular epidemiology of *Blastomyces dermatitidis*. *Clinical Infectious Diseases*, 30: 328-335, 2000.
- MEKIBIB, B.; FURGASA, M.; ABUNNA, F.; MEGERSA, B.; REGASSA, A. Bovine Mastitis: Prevalence, Risk Factors and Major Pathogens in Dairy Farms of Holeta Town, Central Ethiopia. *Veterinary World*, vol.3 n.9, 2010.
- MELVILLE, P.A.; WATANABE, E.T.; BENITES, N.R.; RIBEIRO, A.R.; SILVA, J.A.; GARIN JUNIOR, F.; COSTA, E.O. Evaluation of the susceptibility of *Prototheca zopfii* to milk pasteurization. *Mycopathologia*, v.146, n.2, p.79- 82, 1999.
- MELVILLE, P.A.; BENITES, N.R.; SINHORINI, I.L.; COSTA, E.O. Susceptibility and features of the ultrastructure of *Prototheca zopfii* following exposure to copper sulphate, silver nitrate and chlorexidine. *Mycopathologia*, 156:1-7, 2002.
- MENEZES, E. A.; MENDES, L. G.; CUNHA, F.A. Resistência a antifúngicos de *Candida tropicalis* isoladas no Estado do Ceará. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 42(3) : 354-355, mai-jun, 2009.
- NOBRE, M.O.; NASCENTE, P.S.; MEIRELES, M. C.; FERREIRO, F. Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais - Revisão bibliográfica. *Ciência Rural*, v.32, p.175-184, 2002.

OSUMI, T.; KISHIMOTO, Y.; KANO, R.; MARUYAMA, H.; ONOZAKI, M.; MAKIMURA, K.; ITO, T.; MATSUBARA, K.; HASEGAWA, A. *Prototheca zopfii* genotypes isolated from cow barns and bovine mastitis in Japan. *Veterinary Microbiology*, 131:419–423, 2008.

PRESTES, D. S.; FILAPPI, A.; CECIM, M. Susceptibilidade à mastite: fatores que influenciam – uma revisão. *Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia*, v.9, n.1, p. 48-59, 2003.

REISS, E.; TANAKA, K.; BRUKER, G.; CHAZALET, V.; COLEMAN, D.; DEBEAUPUIS, J. P.; HANAZAWA, R.; LATGÉ, J. P.; LORTHOLARY, J.; MAKIMURA, K.; MORRISON, C. J.; MURAYAMA, S. Y.; NAOE, S.; PARIS, S.; SARFATI, J.; SHIBUYA, K.; SULLIVAN, D.; UCHIDA, K.; YAMAGUCHI, H. Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections. *Medical Mycology*, 36: 249–257, 1998.

REX, J.H. Editorial response: Catheters and candidemia. *Clinical Infectious Diseases*, 22:467-470, 1996.

RICCHI, M.; GORETTI, M.; BRANDA, E.; CAMMI, G.; GARBARINO, C. A.; TURCHETTI, B.; MORONI, P.; ARRIGONI, N.; BUZZINI, P. Molecular characterization of *Prototheca* strains isolated from Italian dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 93:4625–4631, 2010.

RICKARD, H. A. et al. BACTERIAL COAGGREGATION: An integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends in Microbiology*, London, v.11, n.2, p-94- 99, 2003.

ROESLER, U.; MOLLER, A.; HENSEL, A.; BAUMANN, D.; TRUYEN, U. Diversity within the current algal species *Prototheca zopfii*: a proposal for two *Prototheca zopfii* genotypes and description of a novel species, *Prototheca blaschkeae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 1419–1425, 2006.

SAAB, A.B; ZAMPROGNA, T.O.; LUCAS, T. M.; MARTINI, K.C; MELLO, P. L.; SILVA, A. V.; MARTINS, L.A. Prevalence and etiology of bovine mastitis in the Nova Tebas, Parana. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 35, n. 2, p. 835-844, mar./abr. 2014.

SANTOS, R.C.; MARIN, J. M. Isolation of *Candida* spp. from mastitic bovine milk in Brazil. *Mycopathologia*, 159:251–3, 2005.

SARTORI, L.C.A.; SANTOS, R. C, MARIN, J.M. Identification of *Candida* species isolated from cows suffering mastitis in four Brazilian states. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.66, n.5, p.1615-1617, 2014.

- SARKER, S. C.; PARVIN, S.; RAHMAN, A.; ISLAM, T. Prevalence and risk factors of subclinical mastitis in lactating dairy cows in north and south regions of Bangladesh. *Tropical Animal Health and Production*, 45:1171–1176, 2013.
- SATOH, K., OOE K.; NAGAYAMA, H.; MAKIMURA, K. *Prototheca cutis* sp. nov., a newly discovered pathogen of protothecosis isolated from inflamed human skin. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60:1236–1240, 2010.
- SHAHID, M.; ALI, T.; ZHANG, L.; HOU, R.; ZHANG, S.; DING, L.; HAN, D.; DENG, Z.; RAHMAN, A.; HAN, B. Characterization of *Prototheca zopfii* Genotypes Isolated from Cases of Bovine Mastitis and Cow Barns in China. *Mycopathologia*, DOI 10.1007/s11046-015-9951-9, 2015.
- SHI, X.; ZHU, X. Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology*, v. 20, p. 407-413, 2009.
- SILVA, M. G. C.; RODRIGUES, G. S.; GONÇALVES, I. L.; ZRAZZIOTIN, N. A. *Candida* species distribution and fluconazole susceptibility of blood isolates at a regional hospital in Passo Fundo, RS, Brazil. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v.51, n.3, p. 158-161, June 2015.
- SPANAMBERG, A.; WÜNDER, E. A. JR.; BRAYER PEREIRA, D. I.; ARGENTA, J.; CAVALLINI SANCHES, E. M.; VALENTE, P.; FERREIRO, L. Diversity of yeasts from bovine mastitis in Southern Brazil. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25: 154–156, 2008.
- TORTORANO, A. M.; PRIGITANO, A.; DHO, G.; PICCININI, R.; DAPRA, V.; VIVIANI, M. A. In vitro activity of conventional antifungal drugs and natural essences against the yeast-like alga *Prototheca*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61, 1312–1314, 2008.
- UENO, R.; N. URANO; M. SUZUKI. Phylogeny of the non-photosynthetic green micro-algal genus *Prototheca* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) and related taxa inferred from SSU and LSU ribosomal DNA partial sequence data. *FEMS Microbiology Letters.*, 223:275–280.4, 2003.
- VASCONCELOS, S.A.; ITO, F.H. Principais zoonoses transmitidas pelo leite: atualização. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia - CRMV-SP*, 9:32-37, 2011.
- WAWRON, W.; BOCHNIARZ, M.; PIECH, T.; WYSOCKI, J, KOCIK, M. Antimicrobial susceptibility of *Prototheca zopfii* isolated from bovine mastitis. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 57, 485-488, 2013
- WHITE, T.J.; BURNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. PCR protocols: a guide to methods and applications, San Diego, California: Academic Press, Inc, 1990.

WILSON, D. J.; GONZALEZ, R. N.; HELENA, H. Bovine Mastitis Pathogens in New York and Pennsylvania: Prevalence and Effects on Somatic Cell Count and Milk Production. *Journal of Dairy Science*, vol. 80, n. 10, 1997.

ZARAGOZA, C.S.; OLIVARES, R.A.C.; WATTY, A.E.D. *et al.* Yeast isolation from bovine mammary glands under different mastitis status in the Mexican High Plateau. *Revista Iberoamericana de Micología*, v.28, p.79-82, 2011.

ZDANOWICZ, M.; SHELFORD, J. A.; TUCKER, C. B.; WEARY, D. M.; VON KEYSERLINGK, M. A. G. Bacterial populations on teat ends of dairy cows housed in free stalls and bedded with either sand or sawdust. *Journal of Dairy Science*, v. 87, n. 6, p. 1694-1701, 2004.

ZHOU, Y.; REN, Y.; FAN, C.; SHAO, H.; ZHANG, Z.; MAO, W.; WEI, C.; NI, H.; ZHU, Z.; HOU, X.; PIAO, F.; CUI, Y. Survey of mycotic mastitis in dairy cows from Heilongjiang Province, China. *Tropical Animal Health and Production*, 45:1709 – 1714, 2013.