

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

ISOLAMENTO DE *Candida* spp EM LEITE PROVENIENTE
DE BOVINOS COM MASTITE EM 4 ESTADOS
BRASILEIROS

Luciana Carla Agostinho Sartori
Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

ISOLAMENTO DE *Candida* spp EM LEITE PROVENIENTE
DE BOVINOS COM MASTITE EM 4 ESTADOS
BRASILEIROS

Luciana Carla Agostinho Sartori

Orientador: Prof. Dr. José Moacir Marin

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp - Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Março de 2012

Sartori, Luciana Carla Agostinho
S251i Isolamento de *Candida* spp em leite proveniente de bovinos com
mastite em 4 estados brasileiros / Luciana Carla Agostinho Sartori. –
Jaboticabal, 2012
viii, 52 f.: il.; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012
Orientador: José Moacir Marin
Banca examinadora: Everlon Cid Rigobelo, Simone Barone
Salgado Marques
Bibliografia

1. Candida. 2. Desinfetante. 3. Levedura. 4. Mastite.
5. Pasteurização. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.8:618.19-002

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LUCIANA CARLA AGOSTINHO SARTORI - nascida em 26 de março de 1985, na cidade de Taquaritinga – SP; graduada em Ciências Biológicas – modalidade licenciatura e bacharel, pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Câmpus Jaboticabal. Foi bolsista de Iniciação Científica três vezes pela Fapesp entre os anos de 2006 a 2009. Ingressou no curso de Pós – Graduação (mestrado) pelo programa de Microbiologia Agropecuária na mesma instituição. Desde 2010 exerce a função de Assistente Administrativo na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Câmpus Jaboticabal.

DEDICO

Aos meus pais Celso e Marli,
Á minha irmã Juliana e minha sobrinha Giulia,
E as todos meus familiares,
Pelo apoio, carinho, compreensão,
Força e exemplo de Fé essencial,
Que me ajudaram nesta caminhada.

Ao meu marido Ricardo pelo companheirismo,
Pelo amor, pela imensa ajuda nos finais de semana no laboratório,
Pelo apoio e por estar sempre ao meu lado.

Aos meus sogros José Carlos e Izilda,
Por terem me acolhido como filha em suas vidas.

AGRADECIMENTOS

Agradecer a todos que ajudaram a concretizar este trabalho não é tarefa fácil. O maior perigo que se coloca para o agradecimento seletivo não é decidir quem incluir, mas escolher quem não mencionar. Agradeço:

A Deus, sempre presente em minha vida, me fazendo ver sua infinita magnitude, me dando força, coragem e saúde para nunca desistir dos meus sonhos.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Moacir Marin por ter aceito a orientação deste trabalho e por dividir comigo seus conhecimentos e experiências.

À Rita de Cássia dos Santos pela imensa ajuda e auxílio durante a realização deste trabalho.

À técnica de laboratório Tânia Marques da Silva, pela ajuda e atenção.

À minha amiga Joyce Brunetti Scarduelli, pela sua história de superação, pela amizade e atenção.

Aos meus cunhados Eleandro Boaro, Juliano e Daiana Sartori, obrigada pelo constante incentivo.

À amiga Maria Clara Borges, devo um agradecimento especial por todo apoio, amizade e paciência dispensada. Que Deus ilumine sempre o seu caminho!

Aos amigos que estiveram comigo no decorrer desta etapa, sempre me apoiando e incentivando: Leonardo e Mayara Oliverio, Cesar Monteiro e Suzana Samorano.

À todos os funcionários e hoje amigos da Seção Técnica de Pós-Graduação, Seção de Graduação, Diretoria Técnica Acadêmica, Seção Técnica Acadêmica e Seção de Comunicações desta Universidade, que sempre estiveram dispostos a me ajudar. Muito obrigada!

Aos amigos: Rodrigo Uchiyama, Josy, Ligia, Carmem, Maria Luiza, Tina, Lurdinha, Eliane, Donizeti, Mariana, Marta. Ao David Petrovich Sobrinho pela compreensão e por facilitar meu horário de serviço.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Everlon Cid Rigobelo e Profa. Dra. Simone Barone Salgado Marques, muito obrigada por suas contribuições.

Muito Obrigada a todos vocês, amigos(as), parentes, professores, colegas, pois vocês contribuíram de alguma forma para a vitória de mais uma etapa.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE FLUXOGRAMAS.....	xi
ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO	xiii
SUMMARY	xiv
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Mastite bovina	3
2.1.1. Formas de apresentação e classificação das mastites	4
2.1.2. Mastite causada por <i>Candida spp.</i>	6
2.2. Definição de desinfecção e de antissepsia	9
2.3. O papel do <i>pré</i> e <i>pós-dipping</i> no controle da mastite bovina	10
2.4. Antissépticos mais utilizados para higienização dos tetos	11
2.5. Pasteurização	14
III. OBJETIVOS	18
IV. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1. Caracterização das leveduras	19
4.2. Avaliação <i>in vitro</i> da eficiência dos desinfetantes	20
4.3. Avaliação <i>in vitro</i> do emprego do processo de pasteurização e fervura do leite contaminado com <i>Candida spp.</i>	23
V. RESULTADOS	26
5.1. Caracterização das leveduras	26
5.2. Avaliação <i>in vitro</i> da eficiência dos desinfetantes	26
5.3. Avaliação <i>in vitro</i> do emprego do processo de pasteurização e fervura do leite contaminado com <i>Candida spp.</i>	28
VI. DISCUSSÃO	30
VII. CONCLUSÕES	36
VIII. REFERÊNCIAS	37

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Espécies de <i>Candida</i> identificadas a partir de casos de mastite bovina em 41 rebanhos leiteiros de 4 estados brasileiros em 2009.....	26
Tabela 2 Número absoluto (N) e porcentagem (%) de sobrevivência aos processos de pasteurização lenta, rápida e fervura, apresentado por 45 isolados de leveduras do Gênero <i>Candida</i> , isoladas a partir de casos de mastite bovina em 41 rebanhos leiteiros de 4 estados brasileiros em 2009.....	28
Tabela 3 Média/Unidade Formadora de Colônia (U.F.C.) de <i>Candida spp.</i> isoladas a partir de casos de mastite bovina em 41 rebanhos leiteiros de 4 estados brasileiros em 2009.....	28
Tabela 4 Produção, Consumo e Exportação de Leite.....	30

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Úbere de uma vaca em lactação apresentando mastite clínica – sinais de inchaço e vermelhidão em um dos quartos.....	04
Figura 2 Placa de ágar Sabouraud – Dextrose, após incubação de 48 horas à 37°C, com crescimento de colônias isoladas de <i>Candida.spp</i>	20
Figura 3 Porcentagem da eficácia <i>in vitro</i> dos desinfetantes utilizados no <i>pré</i> e <i>pós-dipping</i> frente a 45 amostras de <i>Candida spp</i> isoladas a partir de casos de mastite bovina em 41 rebanhos leiteiros de 4 estados brasileiros em 2009.....	27

LISTA DE FLUXOGRAMAS

	Página
Fluxograma 1 Avaliação <i>in vitro</i> da eficácia dos desinfetantes.....	22
Fluxograma 2 Avaliação <i>in vitro</i> do emprego do processo de pasteurização e fervura do leite contaminado com <i>Candida spp</i>	25

ABREVIATURAS

CMT	California Mastitis Test
CCS	Contagem de Células Somáticas
IIM	Infecções Intramamárias
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
<i>C. rugosa</i>	<i>Candida rugosa</i>
<i>C.krusei</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>C. catenulata</i>	<i>Candida catenulata</i>
<i>C. valida</i>	<i>Candida valida</i>
<i>C. glabata</i>	<i>Candida glabata</i>
<i>C. parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>C. lusitaniae</i>	<i>Candida lusitaniae</i>
<i>C. guilliermondii</i>	<i>Candida guilliermondii</i>
NaOCl	Hipoclorito de Sódio
mL	Mililitro
spp.	Espécies
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
”	Segundos

ISOLAMENTO DE *Candida* spp EM LEITE PROVENIENTE DE BOVINOS COM MASTITE EM 4 ESTADOS BRASILEIROS

RESUMO – A mastite representa um dos mais sérios problemas existentes nas fazendas de leite. Os objetivos deste estudo foram identificar leveduras envolvidas nos casos de mastite bovina; avaliar a sensibilidade *in vitro* de cepas de *Candida* spp. frente a quatro desinfetantes utilizados no pré e pós-dipping e avaliar a resistência destas leveduras frente à pasteurização e fervura. Cinquenta e cinco amostras (12,8%) foram positivas para o gênero *Candida*. As espécies mais isoladas foram *C. krusei* (34,6%), *C. parapsilosis* (25,4%), *C. tropicalis* (18,2%) e *C. albicans* (12,8%). As drogas utilizadas foram clorexidina (2,0%), iodo (0,8%), iodo glicerinado (0,8%) e hipoclorito de sódio (1,0%) em 4 intervalos específicos de tratamento (15", 30", 60" e 300"). Cem por cento das cepas de *Candida* foram sensíveis a clorexidina nos tempos de 30", 60" e 300", ao iodo glicerinado em 60" e 300", ao hipoclorito de sódio em 60" e 300" e ao iodo apenas em 300". Em relação aos tratamentos térmicos, a pasteurização rápida foi o procedimento no qual houve maior índice de resistência (64,44%) por parte das estirpes de leveduras. A mastite provocada por fungos está se tornando um problema crescente devido ao aumento da participação deste microrganismo no desenvolvimento de mastite em bovinos. Além disso, resistência apresentada ao tratamento térmico pelas cepas de *Candida* representa um problema para o consumo de leite, significando um risco para a saúde pública. Uma conclusão adicional é a importância da realização periódica de avaliações de sensibilidade dos microrganismos aos desinfetantes utilizados, de forma a garantir a eficácia da desinfecção dos tetos.

PALAVRAS-CHAVE: *Candida*, desinfetante, levedura, mastite, pasteurização

ISOLATION OF *Candida* spp. IN MILK FROM CATTLE WITH MASTITIS IN FOUR BRAZILIAN STATES.

SUMMARY – Mastitis is one of the most serious problems in dairy farms. The objectives of this study were to identify yeasts involved in cases of bovine mastitis; evaluate the in vitro susceptibility of strains of *Candida* spp. Against four disinfectants used in the pre and post-dipping and evaluate the resistance of these strains before pasteurization and boiling. Fifty-five samples (12,8%) were positive for *Candida*. The most isolated species were *C. krusei* (34,6%), *C. parapsilosis* (25,4%), *C. tropicalis* (18,2%) and *C. albicans* (12,8%). As active drugs were used chlorhexidine (2,0%), iodine (0,8%), glycerin iodine (0,8%) and sodium hypochlorite (1,0%) at specific intervals of four treatment (15", 30", 60" and 300"). One hundred percent of *Candida* was found to be sensible to chlorhexidine at 30", 60", and 300", to iodine glycerin at 60" and 300", to sodium hypochlorite at 60", and 300", to iodine only at 300". In relation to thermal treatments, pasteurization was the quick procedure in which there was a higher resistance index (64,44%) by yeast strains. Moreover, the resistance of *Candida* spp. strains after thermal treatment presents a problem for milk consumption what represents a potential risk for public health. A further conclusion was that it is important to undertake a periodic evaluation of the sensibility of microorganisms to the disinfectants commonly used, to guarantee the efficacy of the process of teat disinfecting.

KEYWORDS: *Candida*, disinfectant, yeast, mastitis, pasteurization

I. INTRODUÇÃO

Mastite é o processo inflamatório da glândula mamária, é contagiosa e de fácil disseminação, provocada por uma variedade de bactérias patogênicas, fungos, algas e protozoários. Sob o ponto de vista econômico, é a mais importante enfermidade do gado leiteiro, apresentando alta prevalência em todo o mundo. É uma doença multifatorial, sendo, portanto de difícil controle.

Esta enfermidade apresenta outras nomenclaturas, como infecção da glândula mamária ou mamite. A mastite de origem infecciosa ocorre em cerca de 90 a 95% dos casos, podendo ser causada por um ou mais microrganismos. Já a de origem traumática ocorre em cerca de 5 a 10% dos casos.

A mastite infecciosa inicia-se a partir da invasão do agente infeccioso pelo canal do teto, podendo tomar todo o úbere, e em casos mais graves pode levar a uma infecção sistêmica, causando septicemia.

A mastite pode ser classificada como mastite clínica ou subclínica. A forma clínica apresenta alterações, tanto dos úberes quanto do leite, e são visíveis a olho nu. No úbere os sinais são dor, edema, aumento de temperatura, entre outros sintomas. O leite pode apresentar grumos e dependendo do grau da infecção, este pode se caracterizar como uma secreção aquosa.

Mastite subclínica é a mais comum em propriedades leiteiras e de maior preocupação, pois, pode acometer grande parte do rebanho sem que seja percebida, uma vez que não apresenta sinais sistêmicos aparentes, como na mastite clínica, mas podem ocorrer alterações físicas, químicas e microbiológicas no leite, que são detectadas por testes específicos, como o teste da caneca telada com fundo preto e o CMT (*California Mastitis Test*); complementados com outros realizados em laboratórios: CCS (Contagem de Células Somáticas), *White Side Test* e exame microbiológico. Esta forma de mastite é responsável por grandes perdas na produção leiteira e na qualidade do leite.

Algumas precauções antes, durante e após a ordenha são requeridas para que ocorra a manutenção da qualidade do leite, uma vez que este é muito perecível e pode servir como meio de cultura para inúmeros microrganismos.

Um destes microrganismos que merecem destaque são as leveduras, que desempenham importante papel na indústria de produtos lácteos como a fermentação, mas que atuam também como patógenos oportunistas. Dentre as leveduras isoladas de leite proveniente de vacas acometidas com mastite, as mais frequentes são as do gênero *Candida spp.* Elas podem estar presentes no leite provenientes de medicamentos contaminados para mastite, diluentes de antibióticos, oriundos da água de lavagem dos equipamentos de ordenha, silagem ou ainda, das mãos do ordenhador.

Desta forma, uma das medidas a serem adotadas é a higienização dos tetos (*pré e pós-dipping*) com antissépticos eficazes e na concentração adequada. Este procedimento é de grande importância para redução do número de microrganismos patogênicos no leite e melhoria das suas condições higiênicas, além de serem eficazes na prevenção da mastite bovina.

A manutenção da qualidade do leite após a ordenha requer algumas precauções tendo em vista que sua composição química favorece o crescimento de várias espécies de leveduras e inúmeros outros microrganismos. Desta forma, a legislação brasileira determina que todo leite produzido deva ser submetido a um processo térmico antes da sua comercialização, com a finalidade de destruir a microbiota patogênica presente. No entanto, é comum observarmos nas cidades do interior ou então, nas periferias das grandes cidades a ingestão de produtos adquiridos diretamente do produtor, sem inspeção sanitária. Assim sendo, devemos nos atentar para a presença de microrganismos nestes alimentos, principalmente no leite cru, o que pode representar potencial risco à saúde humana. Vale ressaltar, que pouco se conhece sobre a importância da presença de fungos no leite sob o ponto de vista de saúde pública, bem como sua resistência à pasteurização e fervura, tratamentos térmicos permitido pela legislação brasileira e o outro amplamente utilizado pela população, respectivamente.

II. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Mastite bovina

A mastite é uma reação inflamatória da glândula mamária acompanhado da redução de secreção de leite e mudança de permeabilidade da membrana que separa o leite do sangue (MACHADO *et al.*, 1998). Na falha do sistema imunológico, inicialmente os microrganismos se instalam nos ductos e nas cisternas e posteriormente progridem para pequenos ductos e alvéolos das porções mais baixas do úbere, onde se multiplicam, provocando edema e destruição das células secretoras (RAINARD & RIOLLET, 2006). Na patogenia dessa doença, o organismo do animal responde com o envio de leucócitos para o local, o que eleva a contagem CCS e afeta a composição do leite (PAULA *et al.*, 2004; LOPES *et al.*, 2007). É uma doença contagiosa e de fácil disseminação, provocada por uma variedade de bactérias patogênicas, fungos, algas, protozoários, já tendo sido descritos mais de 140 microrganismos no complexo etiológico das mastites (PHILPOT & NICKERSON, 2002). Além dos microrganismos, podem estar envolvidos agentes químicos, físicos, traumas mecânicos e problemas metabólicos. É uma enfermidade complexa que está vinculada à complexa tríade: animal (hospedeiro), ao agente etiológico e/ou ao meio ambiente, fazendo desta uma enfermidade multifatorial, o que reforça a complexidade etiológica desta afecção, dificultando em algumas situações o seu tratamento e controle (HURLEY & MORIN, 2001).

Sob o ponto de vista econômico, a mastite é reconhecida como a principal enfermidade em animais de exploração leiteira, apresentando alta prevalência em todo o mundo devido à redução na produção e na qualidade do leite, gastos com tratamentos e honorários veterinários, ao descarte prematuro e à morte ocasional de animais, assim como ao potencial zoonótico dos agentes causais (SANTOS & FONSECA, 2007; TOZZETTI *et al.*, 2008; SPANAMBERG, *et al.*, 2009).

As alterações manifestadas no úbere são bastante variáveis e dependem principalmente dos agentes envolvidos e da resistência individual de cada animal, (HARMON, 1994; MACHADO *et al.*, 2000; RIBEIRO *et al.*, 2003).



Figura1. Úbere de uma vaca em lactação apresentando mastite clínica – sinais de inchaço e vermelhidão em um dos quartos.

2.1.1. Formas de apresentação e classificação das mastites

A mastite é classificada quanto à forma de apresentação em clínica e subclínica e quanto à forma de transmissão, em contagiosa e ambiental (MENDONÇA *et al.*, 1999).

A forma clínica é de fácil diagnóstico, pois os sinais clínicos podem ser visíveis a olho nu. Apresenta sinais clínicos como anorexia, depressão, febre e sinais locais como

formação de edema no úbere, hiperemia, endurecimento das glândulas afetadas, aquecimento do teto, presença de grumos, filamentos e reação ao toque em razão da dor. Alterações na secreção mamária também podem ser observadas; o leite pode apresentar aspecto purulento e conter sangue, que se torna mais aquoso e sofre descoloração com o progresso da infecção (SARAN, 1986; NASCIF JR., 2001). Pode conter ainda grumos finos, graúdos ou cremosos, podendo ou não apresentar cheiro anormal (ROSEMBERG, 1993).

A mastite subclínica apresenta maior importância epidemiológica, pois pode se propagar silenciosamente pelo rebanho sem que sejam percebidas alterações macroscópicas na inspeção do úbere ou do leite, ocasionando prejuízos pela frequência e persistência do processo (BARBALHO & MOTA, 2001). É caracterizada por alterar a composição do leite, tais como aumento na CCS, aumento nos teores de íons cloro, sódio e proteínas séricas, diminuição nos teores de caseína, lactose e gordura do leite o que limita a exploração econômica da raça leiteira (GIANOLA *et al.*, 2004), fazendo com que haja menor rendimento na produção de seus derivados, além de diminuir o tempo de prateleira do produto (BRADLEY, 2002). Para seu diagnóstico, faz-se necessário a realização de exames auxiliares, como o California Mastitis Test (CMT), o Wisconsin Mastitis Test (WMT) e imunodifusão radial (FONSECA e SANTOS, 2000; FUNAYAMA *et al.* 2006, DIAS, 2007). Além disso, podem ser realizados exames complementares em laboratórios especializados, como cultura e isolamento dos agentes etiológicos e o antibiograma, para a implantação de estratégias de controle, profilaxia e tratamento direcionado (ÁLVARES, 2005).

Quanto à forma da transmissão, a mastite contagiosa é causada por patógenos cujo hábitat preferencial é o interior da glândula mamária e a superfície da pele dos tetos (exemplo: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase* negativo, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Corynebacterium bovis*). O principal momento de transmissão ocorre durante a ordenha em que os microrganismos são transmitidos de uma glândula infectada para outra sadia. Esse tipo de mastite se caracteriza por apresentar baixa incidência de casos clínicos e alta incidência de casos

subclínicos, normalmente de longa duração ou crônicos e por apresentar alta CCS (BUENO *et al.*, 2003; FREITAS *et al.*, 2005; RIBEIRO *et al.*, 2008).

A mastite ambiental é causada por microrganismos oportunistas que vivem tanto na água de beber, quanto na utilizada na limpeza dos animais. Vivem também na silagem, mas principalmente no ambiente de ordenha ou do curral com excesso de matéria orgânica, dejetos e umidade (SANTOS & FONSECA, 2007; FREITAS *et al.*, 2005; RIBEIRO *et al.*, 2008). A microbiota é diversificada compreendendo: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *K. oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, espécies de *Citrobacter*, *Serratia* e *Proteus*, *Streptococcus uberis*, *S. faecalis*, *S. faecium* e outros *Streptococcus*, *Pseudomonas aruginosa*, *Actinomicetales* (*Arcanobacterium pyogenes*, *Nocardia asteróides* e *N. brasiliensis*), leveduras (principalmente do gênero *Candida*), fungos micelianos e algas como a *Prototheca zopfi* (COSTA *et al.*, 2000; REBHUN, 2000; SILVA, 2003).

A mastite ambiental apresenta alta incidência de casos clínicos, geralmente agudos podendo ocorrer antes, mas principalmente, após o parto (SILVA, 2003).

2.1.2. Mastite causada por *Candida* spp.

Atualmente, o estudo das micoses nos animais e no homem adquire uma importância cada vez maior devido ao fato de que muitas espécies de leveduras, fungos leveduriformes e filamentosos, anteriormente consideradas não-patogênicos, tem atuado como agentes oportunistas, causando enfermidades nos hospedeiros (SPANAMBERG *et al.*, 2004; RUZ-PEREZ *et al.*, 2004).

Entre os agentes considerados ambientais, leveduras têm sido relacionadas como patógenos emergentes em função das mudanças verificadas nos sistemas de produção de leite e nos programas de controle da mastite bovina, na última década. Diversas espécies dos gêneros *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* e *Candida* têm sido isoladas de leite obtido de animais acometidos pela mastite, sendo geralmente o gênero *Candida* a mais frequente (KRUKOWSKI *et al.*, 2000; SANTOS & MARIN, 2005).

O termo levedura é aplicado aos fungos que se reproduzem principalmente por brotamento, raramente formam micélio rudimentar e nunca o micélio bem desenvolvido (LACAZ *et al.*, 1998, RAVEN *et al.*, 2001).

As colônias de leveduras são geralmente de consistência cremosa, brilhantes ou opacas, de cor branca a creme, mas podem apresentar coloração do marfim ao vermelho (JAY, 2005).

As leveduras do gênero *Candida* possuem distribuição universal, podendo ser encontradas nos homens ou nos animais, como comensais ou patogênicas, no solo, na água, nos vegetais, nos alimentos e em diversos ambientes, como os hospitais (BARNET *et al.*, 1983; LACAZ *et al.*, 1991; MAFFEI, 1996). Vivem frequentemente em saprobiose, mas em circunstâncias propícias podem desenvolver seu poder patogênico (WAWRON & SZCZUBIAL, 2001).

A mastite micótica ocorre sob a forma de surtos localizados (CHAHOTA *et al.*, 2001) principalmente após tratamento com antimicrobianos (CRAWSHAW *et al.*, 2005) e são classificadas como primária ou secundária. A mastite primária ocorre espontaneamente, não é precedida por infecção bacteriana e/ou de tratamento com antimicrobianos, e é mais diagnosticada durante as primeiras semanas de lactação. Já a mastite micótica secundária, forma clínica mais encontrada, se desenvolve após a administração de antimicrobiano intramamário para tratamento ou prevenção de casos de mastite bacteriana.

Vários aspectos influenciam o aparecimento de mastite micótica, entre eles o mau funcionamento do sistema de ordenha, o manejo inadequado da ordenha, a falta de higiene das instalações e dos equipamentos, além do uso prolongado de terapia antimicrobiana por via intramamária (RUZ-PEREZ *et al.*, 2004; YAMAMURA *et al.*, 2007; BAUMGARTNER *et al.*, 2008). Desta forma, leveduras são microrganismos isolados facilmente a partir do epitélio de tetos dos animais, equipamentos e do ambiente da sala de ordenha (KELLER *et al.*, 2000; SANTOS & MARIN, 2005).

Dentre os aspectos mencionados acima, o uso de antimicrobianos por um período prolongado é apontado como o principal fator que favorece a ocorrência de mastite micótica, por afetar a microbiota que atua, quando em equilíbrio, como defesa

natural do animal. Por exemplo, as leveduras do gênero *Candida* podem utilizar a penicilina e a tetraciclina como fontes de nitrogênio (LOFTSGARD & LINDQUIST, 1960), fato que enfatiza a relevância da implementação de um adequado manejo para prevenir a infecção. Existe também a possibilidade das soluções antimicrobianas estarem contaminadas com fungos, os quais podem ser inoculados e provocar mastite (THOMPSON *et al.*, 1978; JENSEN *et al.*, 1996).

Os dados disponíveis na literatura sobre a frequência de infecções intramamárias (IIM) provocadas por leveduras apresentam grandes variações, encontrando-se índices variáveis entre 0,1% e 17,3%, sendo também muito variáveis as taxas de infecções mistas envolvendo estes agentes, em alguns casos com valores superiores a 50% (FARNSWORTH & SORENSEN, 1972; COSTA *et al.*, 1993; AALBAEK *et al.*, 1994; WILSON *et al.*, 1997; MORETTI *et al.*, 1998; SANTOS & MARIN, 2005).

No Brasil, no Estado de São Paulo, o isolamento de *C. albicans* ocorreu em 8,9% de 260 amostras de leite de vacas com mastite (SANTOS & MARIN, 2005). Ainda em São Paulo, COSTA *et al.* (1993) observaram que 10% das 2.078 amostras de leite de quartos normais e de quartos infectados, correspondiam a leveduras, sendo 3,2% pertencentes ao gênero *Candida*.

No Rio Grande do Sul, FERREIRO *et al.* (1985) detectaram, em 896 amostras de leite mamático, a presença de *Candida* spp. em 1,3% da amostragem, das quais 0,9% eram *Candida albicans*.

No exterior também encontramos relatos sobre a ocorrência de mastite micótica, como pode ser observado nos seguintes estudos. Nos Estados Unidos, RICHARD *et al.* (1980) cultivaram 91 isolados do leite de animais com mastite clínica e subclínica, com predominância do gênero *Candida* (78%), principalmente *C. tropicalis* e *C. rugosa*. Na Dinamarca, a partir de 2.896 amostras, AALBAEK *et al.* (1994) obtiveram 45 isolados, entre os quais *Candida kefir*, *C. krusei*, *C. catenulata*, *C. rugosa*, *C. tropicalis*, *C. valida* e *Geotrichum capitatum*, além da alga *Prototheca zopfii*. Na Polônia, KRUKOWSKI *et al.* (2000) isolaram diversas espécies de *Candida*, *Rhodotorula* e *Trichosporon* no leite coletado de 172 vacas com mastite clínica e subclínica. No Canadá, SHEENA (1995)

descreveu um caso de mastite clínica, provocada por *C. Krusei*, que levou à eliminação do animal, devido a disseminação da doença.

Apesar do aumento no número de antifúngicos comercialmente disponíveis nos últimos anos para o tratamento de diversas micoses humanas e animais, são raros os fármacos disponibilizados em veículo adequado para o tratamento da mastite micótica, principalmente quando comparados aos medicamentos antimicrobianos usualmente empregados para combater a doença de origem bacteriana (SPANAMBERG *et al.*, 2009).

A literatura registra poucos dados específicos sobre tratamento contra mastite fúngica, mas 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* spp. (NOBRE *et al.*, 2002; KRUKOWSKI & SABA, 2003). No entanto, LASSA & MALINOWSKY (2007) avaliaram a susceptibilidade antifúngica de 319 leveduras isoladas do leite de animais com mastite e demonstraram que mais de 75% dos isolados apresentou resistência à Anfotericina-B, 66% ao Fluconazole, 40% ao Primaricin e ao Itraconazole.

2.2. Definição de desinfecção e de antissepsia

Desinfecção é o termo genérico normalmente empregado para designar o processo no qual se utiliza um desinfetante para controlar ou eliminar microrganismos patogênicos presentes fora do organismo animal (FONSECA, 1998).

A antissepsia também é um tipo de desinfecção, porém aplicado a tecidos vivos, como pele, mucosa ou ferimentos. Para tanto, utiliza-se antissépticos que nada mais são do que desinfetantes químicos, porém menos tóxicos ou mais diluídos do que aqueles empregados em objetos inanimados (BLOCK, 1991; FONSECA, 1998). O aumento da concentração de um antisséptico pode, além de destruir as células bacterianas, causar irritação e até a destruição do tecido normal do hospedeiro (PANKEY, 1984; HUBER, 1992).

Desta forma, o termo correto a ser empregado seria “antisepsia da pele” e não “desinfecção da pele”, no entanto, esta forma foi consagrada pelo uso, sendo aceita e empregada até mesmo na literatura científica (NASCIF JR, 2005).

A prevenção de novos casos de infecções pelo uso da antisepsia dos tetos e pela eliminação dos casos existentes reduz a incidência de mastite no rebanho leiteiro ano após ano. Já a redução da CCS e a diminuição dos casos de mastite clínica, geralmente podem ser observadas após alguns meses de utilização (BRITO & BRITO, 1998; RADOSTITS *et al.*, 2002; PHILPOT, 2002).

2.3. O papel do pré e pós-*dipping* no controle da mastite bovina

Um úbere saudável é indispensável para a produção de leite com qualidade e quantidade, para tanto, deve-se tomar o máximo cuidado na realização do *pré* e *pós-dipping* (PEDRINI & MARGATHO, 2003; WATTIAUX, 2011).

A palavra “*dip*”, da língua inglesa, significa mergulhar, imergir, sendo assim, a expressão *pré-dipping* ou “pré-imersão” significa imersão dos tetos em solução desinfetante antes da ordenha e, *pos-dipping* ou “pós-imersão”, significa imersão dos tetos após a retirada dos copos coletores do processo de ordenha. Ambos os termos tem se popularizado no Brasil entre as pessoas envolvidas com a atividade leiteira. (FONSECA, 1998).

Desta forma, mergulhar os tetos, cobrindo-os por inteiro acima da base do úbere com soluções desinfetantes adequadas é uma das práticas mais importantes e indispensáveis para redução dos casos de mastite (PEDRINI & MARGATHO, 2003; WATTIAUX, 2008).

O *pré-dipping* é de extrema importância, pois pode reduzir em 50% os índices de novas infecções dos tetos principalmente por patógenos de origem ambiental. Esta medida, juntamente com a secagem dos tetos com papel toalha descartável pode elevar a até 85% da redução da taxa de novas infecções (MULLER, 2002). Com a realização deste procedimento ocorre uma melhora na condição de pele do teto e,

assim, reduz-se as taxas de infecção da glândula mamária no rebanho (GOLDBERG *et al.* 1994 e CARNEIRO *et al.* 2009).

No *pós-dipping* a imersão dos tetos deve ocorrer imediatamente após a retirada dos equipamentos de ordenha, de forma a eliminar a grande maioria dos patógenos e reduzir os riscos destes microrganismos terem acesso à glândula mamária. Esta medida sanitária, juntamente ao tratamento de vacas secas, é responsável por uma diminuição significativa da mastite (PHILPOT & NICKERSON, 2000; REBHUN, 2000; MULLER, 2002).

2.4. Antissépticos mais utilizados para higienização dos tetos

Os desinfetantes são compostos basicamente pelo princípio ativo responsável pela ação antimicrobiana além de um veículo normalmente aquoso, no qual o princípio está diluído (MERIANOS, 2001). Em relação aos antissépticos utilizados na higienização dos tetos das vacas, estes devem obedecer alguns preceitos como: permanecer ativos na presença de matéria orgânica, como o leite; não podem ser irritantes nem tóxicos, e principalmente, não devem ser absorvidos pelos tecidos nem deixar resíduos no leite (QUINN *et al.*, 2005). Iodo, amônia quaternária, clorexidina e hipoclorito de sódio são alguns dos germicidas mais utilizados tratando-se de antissepsia dos tetos das vacas (REBHUN, 2000; RADOSTITS *et al.*, 2007). Alguns destes antissépticos tem em sua formulação, bases emolientes, como a glicerina, lanolina, propilenoglicol, sorbitol, óleos vegetais, minerais e colágeno no intuito de condicionar a pele dos tetos e minimizar a irritação (SANTOS & FONSECA, 2006). Vale salientar que de acordo com REBHUN (2000), altas concentrações de alguns emolientes podem reduzir a atividade germicida dos banhos de imersão.

O iodo é um químico amplamente utilizado no manejo de ordenha de bovinos leiteiros (FONSECA, 1998), sendo que cerca de 45 a 70% dos países do mundo utilizam produtos antissépticos à sua base. O consumo de iodo no Brasil ocupa a segunda posição do mercado de antissépticos para tetos, estando apenas atrás dos produtos à base de cloro (HEMLING, 2002). É um elemento químico pertencente ao

grupo dos halogênios, do qual também fazem parte o flúor, o cloro, o bromo e o astato. Foi descoberto em 1811 pelo francês Bernad Courtois. Em 1813, após estudos realizados por Gay-Lussac e Humphry Davy foi batizado de iodo do grego *ioeides*, “violeta”, em alusão à coloração do vapor por ele liberado (SCHAEFER, 2009). O iodo apresenta atividade bactericida, fungicida e virucida, atuando por meio da oxidação de compostos protéicos celulares e ácidos graxos insaturados. Apresenta ação rápida (menos de 1 minuto) e baixa toxicidade para tecidos vivos, e sua ação é diminuída frente à presença de matéria orgânica (FONSECA, 1998; GOTTARDI, 2001).

No estudo realizado por FINGER (2001), o autor destacou que o efeito de pré e pós-imersão dos tetos com solução sanitizante a base de iodo foi significativa na redução de mesófilos presentes na superfície dos tetos de bovinos leiteiros (1,99 Log UFC/cm² para 1,35 Log UFC/cm²).

Segundo FORET *et al.* (2006) em seus estudos no Chile utilizando 250 vacas leiteira da raça Holandesa, a realização do *pré* e *pós-dipping* com solução de iodo, verificaram uma considerável redução (24%) de novas enfermidades da glândula mamária quando comparado com animais onde o iodo não foi utilizado na antisepsia.

Ao analisarem a atividade *in vitro* do iodo a 1% e 2% sobre alguns microrganismos como *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp. e *Escherichia coli* isoladas de casos de mastite bovina clínica, PEDRINI & MARGATHO (2003) demonstraram que as soluções de iodo apresentaram melhor desempenho contra todos os microrganismos testados quando comparado aos outros desinfetantes testados neste estudo. Porém, há de se ressaltar que soluções de iodo devem ser utilizadas em imersão dos tetos em concentrações inferiores a 1% de princípio ativo, pois acima disso podem deixar resíduos no leite (JONES, 1998; GOTTARDI, 2001).

As soluções a base de cloro vem sendo utilizadas desde o final do século XVIII, quando o químico francês Berthollet descobriu o hipoclorito de sódio. A partir da primeira Guerra Mundial em 1915, Dakin popularizou o seu uso empregando-o para o tratamento de feridas infectadas com uma solução de hipoclorito de sódio 0,45% a 0,5% (BLOCK, 2001).

A sua apresentação mais comum é a do hipoclorito de sódio (NaOCl) presente na água sanitária na concentração aproximada de 2,5% de cloro ativo. Numa solução aquosa, o cloro dissocia-se podendo formar Cl_2 , ácido hipocloroso (HOCl) ou o íon hipoclorito (OCl^-). Estas formas de cloro encontradas a água podem ser chamadas de cloro livre, sendo o HOCl o grande responsável pela ação microbicida do hipoclorito de sódio (DYCHDALA, 2001).

O NaOCl apresenta amplo espectro de ação, 50 ppm de cloro é capaz de inativar o *M. tuberculosis* e 100 ppm é eficaz contra a maioria dos fungos. O hipoclorito tem sido amplamente utilizado no processo de desinfecção das tetas antes da ordenha e para a desinfecção de ordenhadeiras, tanques, resfriadores e ambientes. Vale ressaltar, que a presença de matéria orgânica pode reduzir o poder microbicida do hipoclorito de sódio, uma vez que parte do cloro pode combinar com compostos nitrogenados formando as cloraminas, podendo ser monocloraminas (NH_2Cl) ou dicloraminas (NHCl_2) (FERNANDES *et al.*, 2000; DYCHDALA, 2001).

AMARAL *et al.* (2004), ao utilizarem 150 ppm de hipoclorito na imersão dos tetos, destacaram uma redução de $5,1 \times 10^2$ para $9,4 \times 10$ UFC de *Staphylococcus* spp., uma redução de 82,8% dos isolados. Porém MEDEIROS *et al.*, (2009) ao estudarem a sensibilidade *in vitro* de 60 isolados de *Staphylococcus* spp. de glândulas mamárias de vacas com mastite subclínica frente ao cloro 2,5%, iodo 0,57%, clorexidina 2,0%, amônia quaternária 4,0% e ácido láctico 2,0% em quatro tempos distintos (15", 30", 60" e 300"), observaram que o iodo, a clorexidina e o ácido láctico apresentaram maior atividade desinfetante, por outro lado, praticamente 100% dos isolados foram resistentes ao hipoclorito de sódio.

A clorexidina é um composto clorado, eficaz contra diversos microrganismos, mesmo na presença de matéria orgânica (VERMELHO *et al.*, 2006). É Provavelmente o biocida mais utilizado em produtos antissépticos, principalmente para higienização das mãos, antissépticos orais e como desinfetante (McDONNELL & RUSSELL, 1999).

Dentre as características da clorexidina, destaca-se a baixa toxicidade e alta capacidade microbicida, podendo ser aplicado com segurança sobre a pele íntegra, ou mesmo em feridas e mucosas. Além disto, ela se destaca por apresentar efeito residual

elevado, retardando o processo de recolonização da pele e por possuir ação imediata de cerca de 20 segundos (FERNANDES *et al.*, 2000). Seu mecanismo de ação contra leveduras se dá pelo agente ativo de membrana que causam sua lise, além de que, altas concentrações causam coagulação intracelular (McDONNEL & RUSSELL, 1999).

PEDRINI & MARGATHO (2003) estudaram a sensibilidade de bactérias causadoras de mastites contagiosas e ambientais frente à clorexidina e obtiveram resultado satisfatório com uma solução contendo apenas 0,5% do princípio ativo. Além disso, a clorexidina se mostrou mais efetiva que o iodo quando utilizada no *pos-dipping*, funcionando como uma barreira a proliferação de bactérias, principalmente de *E. coli* (PANKEY *et al.*, 1984; JONES, 1998).

A escolha correta do desinfetante, bem como sua concentração e tempo de contato suficiente para sua atuação, são indispensáveis para o êxito de um programa de controle e prevenção de mastite, uma vez que os agentes desinfetantes tem como objetivo reduzir a população de microrganismos patogênicos e evitar a disseminação de enfermidades.

No entanto, deve-se ressaltar que na maioria das fazendas leiteiras, os agentes desinfetantes são escolhidos pelo preço, hábito de uso ou facilidade de aplicação. Contudo, deve-se avaliar as praticidades e as limitações de cada desinfetante, uma vez que o seu uso inadequado ou em baixas concentrações levam a uma seleção natural de cepas resistentes (FONSECA, 1998; BRITO *et al.*, 2000).

2.5. Pasteurização

Medidas higiênico-sanitárias quando não conduzidas adequadamente podem facilitar a contaminação do leite por microrganismos indesejáveis como os fungos, os quais podem causar alterações físico-químicas no mesmo, limitando sua durabilidade e de seus derivados, além de determinar problemas econômicos e de saúde pública (ANDRADE, 2001).

Dados referentes a doenças de origem alimentar associadas ao consumo de leite cru e seus derivados no Brasil, são escassos e inconsistentes, havendo poucos relatos

sobre a ocorrência de patógenos e seu envolvimento em surtos de doenças relacionadas ao consumo de produtos lácteos (FRANCO, *et al.*, 2003; NERO, *et al.*, 2004). Assim sendo, a presença destes microrganismos no leite pode representar potencial risco à saúde humana principalmente quando se considera que em vários locais no mundo existe o hábito do consumo de leite cru e seus derivados (OLIVAL, *et al.*, 2002; NERO, *et al.*, 2004). Ainda que a legislação brasileira determine que todo leite produzido deva ser previamente submetido a um tratamento térmico antes de ser comercializado, observa-se desde a década de 90 o crescimento do “leite informal”, que consiste no produto que não é submetido a qualquer tipo de inspeção oficial e que não possui garantias quanto à sua qualidade microbiológica (OLIVAL, *et al.*, 2002).

A manutenção da qualidade do leite após a ordenha requer algumas precauções tendo em vista que o mesmo é perecível e pode servir como meio de cultura para inúmeros microrganismos. Assim sendo, recomenda-se o emprego da pasteurização, método que consiste no uso conveniente do calor com a finalidade de destruir a microbiota patogênica sem alteração sensível da constituição física e do equilíbrio químico do leite, bem como sem prejuízo de seus elementos bioquímicos assim como de suas propriedades organolépticas normais (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 1980; PORCIONATO *et al.*, 2008).

A pasteurização, combinação de temperatura e tempo, foi inicialmente introduzida no início do século XX, com a premissa de evitar a transmissão oral de tuberculose, brucelose e outras doenças infecciosas provenientes do leite, sendo considerado um importante marco na saúde pública. No entanto, a pasteurização do leite é definida por o Comité do Codex Alimentarius para a higiene alimentar como "um tratamento térmico destinado a redução do número de qualquer microorganismos patogênicos presente no leite e em produtos lácteos, e se presente, a um nível não significativo, que não constituem perigo para a saúde (ANON, 2004).

A pasteurização rápida, permitida pela legislação brasileira, é um tratamento térmico aplicado ao leite que consiste no aquecimento à temperatura de 72 a 75°C durante 15 a 20 segundos, com objetivo de eliminar os microrganismos patogênicos que possam contaminar o leite, tornando-o um produto inócuo ao consumo humano.

Para prolongar seu tempo de prateleira, realiza-se resfriamento imediato em equipamento de placas até temperatura igual ou inferior a 4°C (BRASIL, 2002). No entanto, muitas vezes, inviável para pequena escala de produção, pois a maioria dos equipamentos fabricados é destinada a um grande volume de leite, apresenta alto custo e necessita de instalações complexas. Para os pequenos laticínios e produtores, uma das soluções pode ser o uso da pasteurização lenta (62-65°C por 30 minutos), que requer equipamentos de menor custo e de fácil operação e manutenção (SILVA, 2000).

Diversos binômios temperatura x tempo de pasteurização são aplicados legalmente em diversos países. Porém, a legislação brasileira estabelece que a pasteurização de leite fluido para consumo deve envolver a aplicação de um binômio de temperatura x tempo de 72-75°C/15-20 s, capaz de eliminar 100% das bactérias patogênicas e 99,9% dos microrganismos banais (BRASIL, 2002).

Pode-se empregar ainda a fervura como tratamento térmico, a qual promove redução da quantidade de microrganismos presentes no leite, embora provoque alterações em sua constituição físico-química. Este procedimento é realizado por até 15 minutos, e destrói todas as formas vegetativas de patógenos, como vírus, fungos, embora não seja eficaz para todos os endósporos (CARVALHAL, 1999).

No estudo realizado por RUZ-PERES, *et al.* (2010), os pesquisadores avaliaram a resistência de fungos filamentosos e leveduras isolados de leite cru bovino de rebanhos leiteiros frente à pasteurização e fervura. Obtiveram que a pasteurização rápida foi o procedimento no qual houve maior índice de resistência (72,18%) por parte das estirpes de leveduras e fungos filamentosos submetidos ao teste, seguida pela fervura (15,89%) e pasteurização lenta (0,99%).

Considerando o exposto acima, pode se verificar que os dados referentes à susceptibilidade de fungos filamentosos e leveduras às temperaturas habitualmente empregadas nos procedimentos de tratamento térmico do leite são escassos, não se conhecendo realmente, se estas metodologias exercem efeito sobre a viabilidade destes microrganismos, cujo potencial patogênico, nestas condições, ainda é desconhecido.

O presente trabalho foi delineado considerando-se a importância e relevância das leveduras, tendo em vista sua participação como agentes de importantes patologias muitas das quais com caráter zoonótico. Deve-se considerar ainda que o leite e seus derivados contaminados com estes microrganismos podem constituir potenciais vias de transmissão de zoonoses a eles relacionados.

III. OBJETIVOS

- A mastite provocada por fungos esta se tornando um problema crescente devido ao aumento da participação deste microrganismo no seu complexo etiológico. Desta forma, o presente estudo visou identificar leveduras envolvidas nos casos de mastite clínica e subclínica;

- A utilização de desinfetantes adequados desempenha uma função chave na rentabilidade da exploração leiteira, contribuindo para a produção de leite de alto padrão e para a obtenção de um estado sanitário adequado do rebanho. Sendo assim, esta pesquisa almejou avaliar a eficácia *in vitro* de quatro princípios ativos de desinfetantes comumente utilizados no *pré* e *pós-dipping* no combate à levedura.

- A presença de microrganismos no leite, muitos dos quais são responsáveis por zoonoses representa um fator que compromete a qualidade e a segurança deste produto. A eliminação destes microrganismos perigosos para os seres humanos é altamente desejável sendo a pasteurização o principal método utilizado. Este trabalho também objetivou avaliar *in vitro* a resistência de cepas de leveduras nos processos de pasteurização e fervura.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Caracterização das leveduras

Foram examinadas 428 amostras de leite provenientes de vacas apresentando mastite clínica ou subclínica procedentes de 41 propriedades de exploração leiteira situadas em 4 estados, São Paulo (6 fazendas), Paraná (14 fazendas), Santa Catarina (7 fazendas) e Rio Grande do Sul (14 propriedades). Os rebanhos eram constituídos de animais de várias raças, idades e encontrava-se em diferentes estágios de lactação, criados em sistema intensivo, com sistemas de ordenha mecânica ou manual. A mastite clínica foi caracterizada pelos sinais clínicos e/ou secreção anormal do leite, detectado pelo teste da caneca telada. A mastite subclínica foi identificada pelo CMT convencional (Califórnia Mastite Teste).

As amostras de leite foram colhidas após prévia lavagem dos tetos com água e sabão, secagem com papel toalha e antissepsia com álcool a 70° GL. Os primeiros jatos de leite foram descartados, em seguida foram coletados 5 ml de leite em frascos com tampa rosqueável, esterilizados e previamente identificados com o nome ou número do animal e quarto mamário, acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo e enviadas pelo correio (Sedex) ao laboratório de Genética da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. As amostras foram coletadas entre fevereiro e dezembro de 2009 e mantidas através de repiques semanais.

No laboratório as amostras foram semeadas em placas de Petri com ágar Sabouraud - Dextrose, previamente esterilizadas e foram incubadas a 37°C por 24 a 48 horas. As colônias de leveduras isoladas foram analisadas quanto às suas características macroscópicas (coloração, tamanho, forma e textura da colônia), microscópicas (características morfotintórias à técnica do Gram, forma e diâmetro da colônia da levedura), reprodutivas (formação de tubo germinativo e tipo de crescimento em ágar Fubá) e fisiológicas (assimilação e fermentação de açúcares e utilização de uréia) de acordo com os métodos descritos por LACAZ (1980), RICHARD *et al.* (1980),

KREGER-VAN RIJ (1984), BARNETT *et al.* (1993), LACAZ *et al.* (1991) e LACAZ *et al.* (1998).

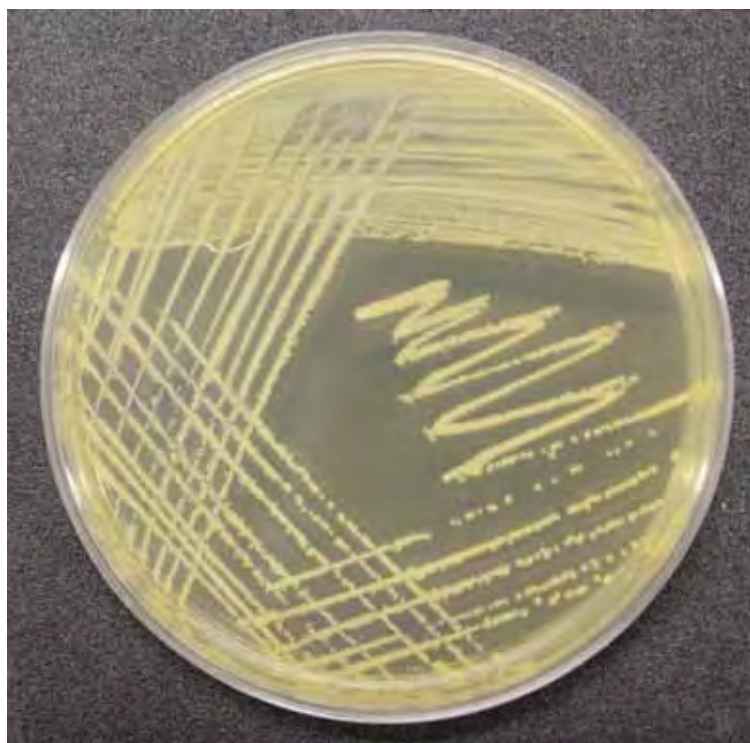


Figura 2. Placa de ágar Sabouraud – Dextrose, após incubação de 48 horas à 37°C, com crescimento de colônias isoladas de *Candida spp.*

4.2. Avaliação *in vitro* da eficácia dos desinfetantes

Foram estudados 45 isolados de *Candida spp* recuperadas de leite bovino de casos de mastite. Estas cepas de leveduras tiveram sua sensibilidade comparada com uma cepa de *C. albicans*.

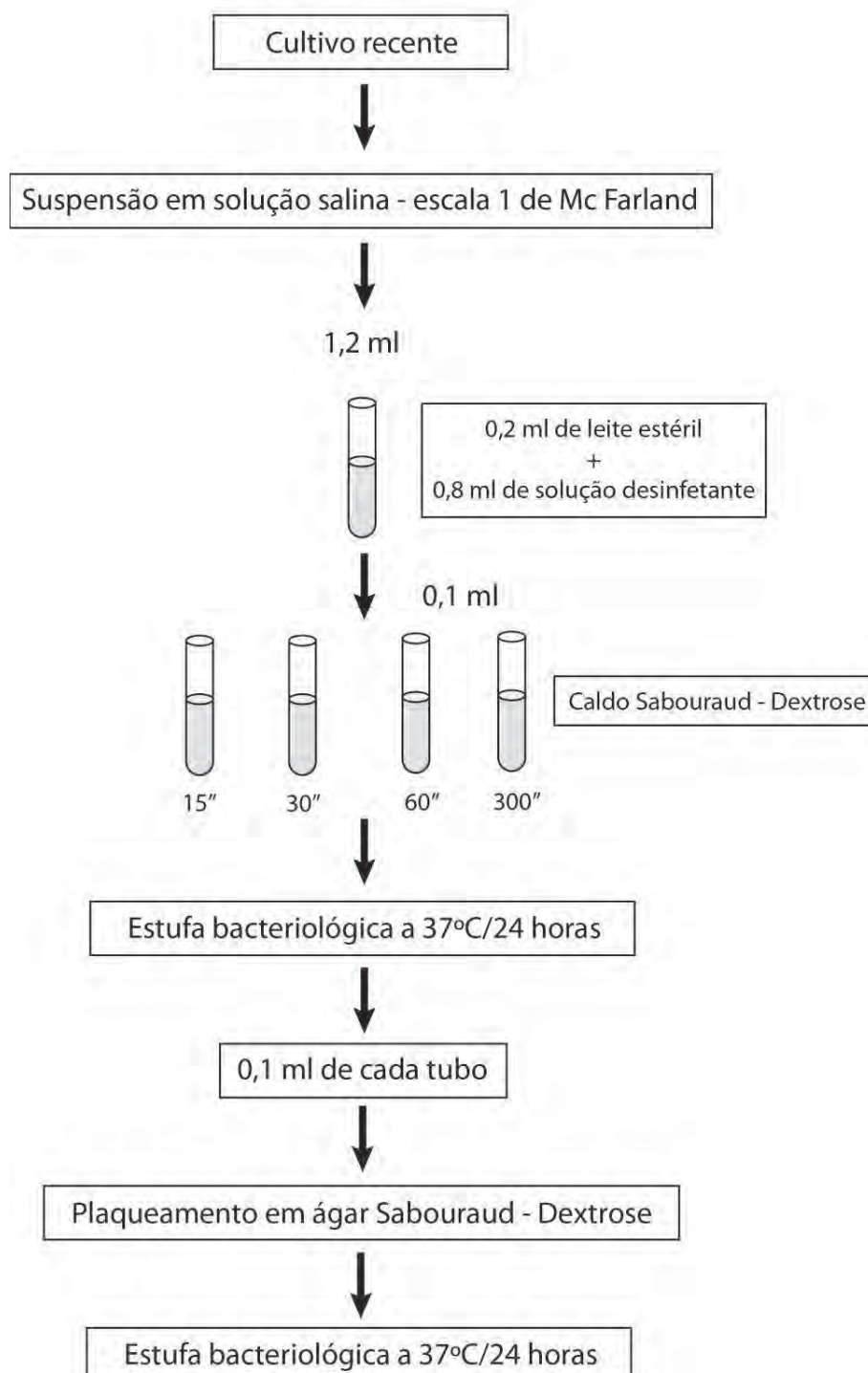
A determinação da eficácia dos desinfetantes utilizados no *pré* e *pós-dipping* foi realizado utilizando-se quatro princípios ativos de desinfetantes comerciais comuns.

São eles: iodo na concentração de 0,8%, iodo glicerinado a 0,8%, clorexidina a 2,0% e hipoclorito de sódio a 1%.

Para a análise experimental *in vitro*, foram utilizados cultivos recentes de leveduras *Candida* spp. em ágar Sabouraud - Dextrose, isolados a partir das amostras do leite bovino contaminado com mastite. Inicialmente foram preparadas suspensões de leveduras em 5 ml de solução salina estéril correspondendo a turbidez do tubo número 1 da escala de Mc Farland. Na sequência, 1,2 ml desta suspensão de leveduras foi adicionado em 0,2 ml de leite estéril.

Posteriormente, foi adicionado a esta mistura 0,8 ml da solução desinfetante. Imediatamente após a adição dos desinfetantes, cronometrou-se os seguintes tempos: 15 segundos, 30 segundos, 60 segundos e 300 segundos de contato. Decorrido estes tempos, uma alíquota de 0,1 ml de cada amostra foi repicada em caldo Sabouraud - Dextrose. Esta mistura foi incubada em estufa bacteriológica a 37°C durante 24 horas para verificar a turvação do meio, formação de película na superfície ou de precipitado no fundo dos tubos. Após a incubação, a suspensão foi repicada em meio sólido (ágar Sabouraud - Dextrose) para confirmação da presença ou ausência do microrganismo testado frente aos diferentes desinfetantes e tempo de exposição. O teste do desinfetante foi realizado em número de três repetições para cada isolado (COSTA, *et al.*, 1998) (Fluxograma 1).

Fluxograma 1



4.3. Avaliação *in vitro* do emprego do processo de pasteurização e fervura do leite contaminado com *Candida spp.*

Os testes foram realizados com base na metodologia descrita por MELVILLE *et al.* (1999), adaptada para fungos leveduriformes. Foram utilizados 44 cultivos recentes de leveduras *Candida spp.* em ágar Sabouraud - Dextrose, isolados a partir das amostras do leite bovino contaminado com mastite. Inicialmente, foi obtida uma suspensão celular de cada um dos isolados de leveduras em 5 mL de solução salina (0,85%) estéril, ajustada a uma turbidez equivalente ao tubo número 3 da escala de Mc Farland. Posteriormente, uma alíquota de 2 mL da suspensão do microrganismo foi transferida para um tubo de vidro estéril contendo 18 mL de leite integral estéril, obtendo-se assim uma diluição da ordem de 10^{-1} (correspondente à solução mãe/controle). Após homogeneização desta suspensão, um volume de 1 mL foi distribuído em 15 tubos de vidro estéreis. Cinco tubos foram utilizados para o teste de pasteurização rápida, cinco tubos para o teste de pasteurização lenta e cinco tubos para o teste de fervura. O restante da solução controle foi mantido no tubo original da diluição sob refrigeração, enquanto não estava sendo utilizado.

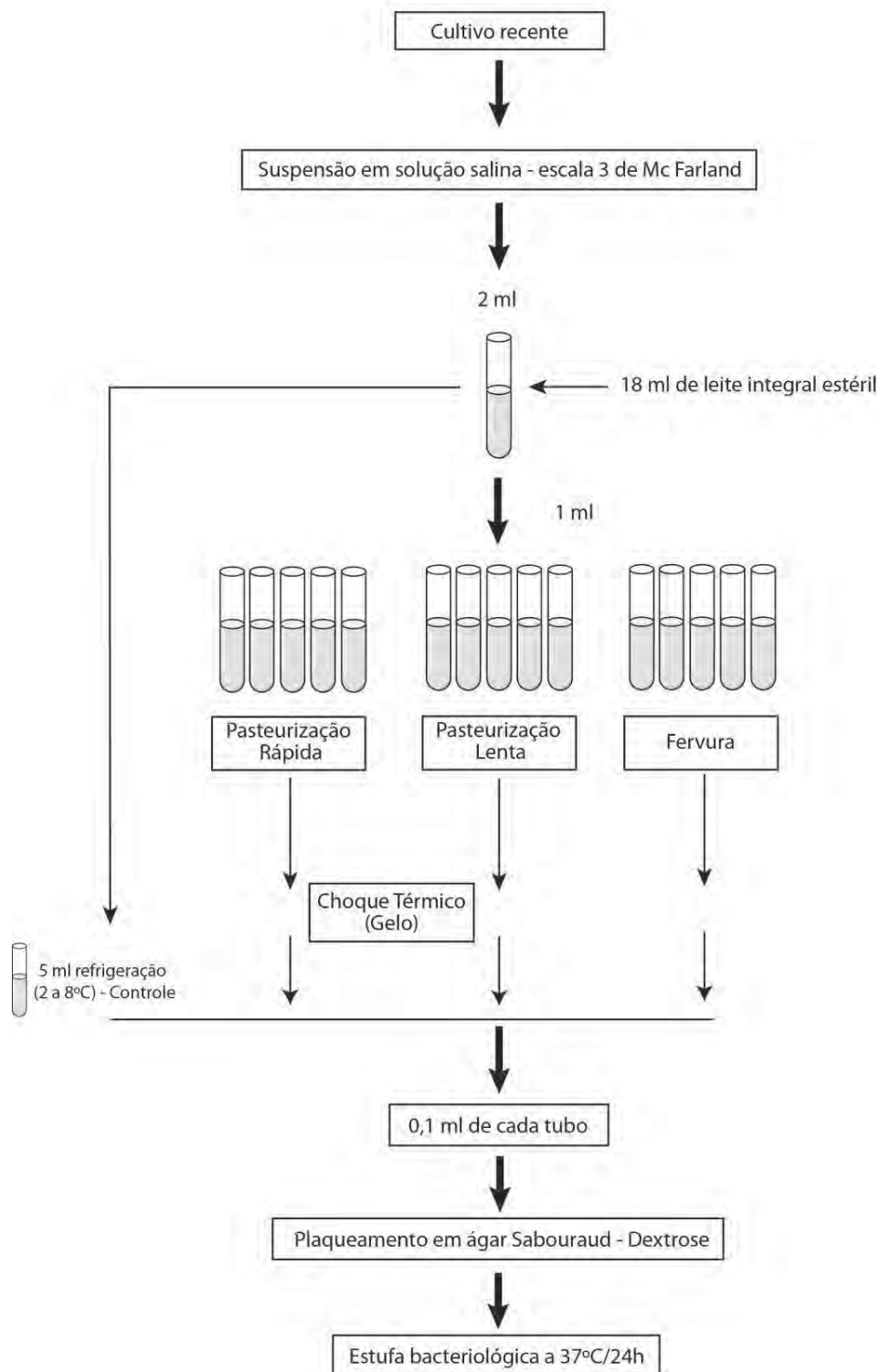
Foram avaliados os seguintes tempos/temperaturas empregadas nos processos de pasteurização permitidos para uso no Brasil: 62-65°C/30 minutos (pasteurização lenta) e 72-75°C/20 segundos (pasteurização rápida). Para estes testes utilizou-se um equipamento de banho-maria, adequando-se e aferindo-se as temperaturas/tempo em cada experimento. Decorrido o tempo de contato com a temperatura testada, os tubos com as amostras de leite foram imediatamente submetidos a um choque térmico em um recipiente contendo gelo por 30 minutos.

Foi também realizada a avaliação da susceptibilidade dos isolados à temperatura empregada no processo de fervura do leite. Para tanto, os cinco tubos destinados aos testes de fervura, foram submetidos ao calor até atingir a temperatura de fervura (aproximadamente 98°C).

Posteriormente, alíquotas de 0,1 mL de cada tubo que passou pelo processo de pasteurização rápida, pasteurização lenta e fervura bem como da solução controle

positivo e negativo, foram plaqueadas utilizando-se a técnica de *spread plate* (técnica de espalhamento em superfície) em ágar Sabouraud - Dextrose, e incubadas a 37°C em estufa microbiológica por um período 24 horas, para a contagem de unidades formadoras de colônias dos microrganismos/mL. Os testes da pasteurização lenta e rápida, e da fervura foram realizados em número de cinco repetições para cada isolado (Fluxograma 2). A estirpe foi considerada sensível quando foi observada ausência total de crescimento de colônias em pelo menos três dos cinco testes realizados.

Fluxograma 2



V. RESULTADOS

5.1. Caracterização das leveduras

Das quatrocentas e vinte e oito amostras de leite provenientes de vacas apresentando mastite, cinquenta e cinco foram positivas para *Candida spp.* As espécies de *Candida* isoladas dos bovinos com mastite estão apresentadas na Tabela 1 e as mais frequentemente isoladas foram *C. Krusei* (34,54%), *C. parapsilosis* (25,45%), *C. tropicalis* (18,18%) e *C. albicans* (12,72%).

Tabela 1. Espécies de *Candida* identificadas a partir de casos de mastite bovina em 41 rebanhos leiteiros de 4 estados brasileiros em 2009.

Espécies	Número de isolados	Porcentagem %
<i>Candida spp</i>	2	3,63
<i>Candida krusei</i>	19	34,54
<i>Candida albicans</i>	7	12,72
<i>Candida tropicalis</i>	10	18,18
<i>Candida parapsilosis</i>	14	25,45
<i>Candida rugosa</i>	1	1,81
<i>Candida glabata</i>	2	3,63
Total	55	100

5.2. Avaliação *in vitro* da eficácia dos desinfetantes

Na figura 3 encontram-se os resultados do papel de sensibilidade e resistência das leveduras frente as soluções de desinfetantes utilizados para o *pré* e *pós-dipping*.

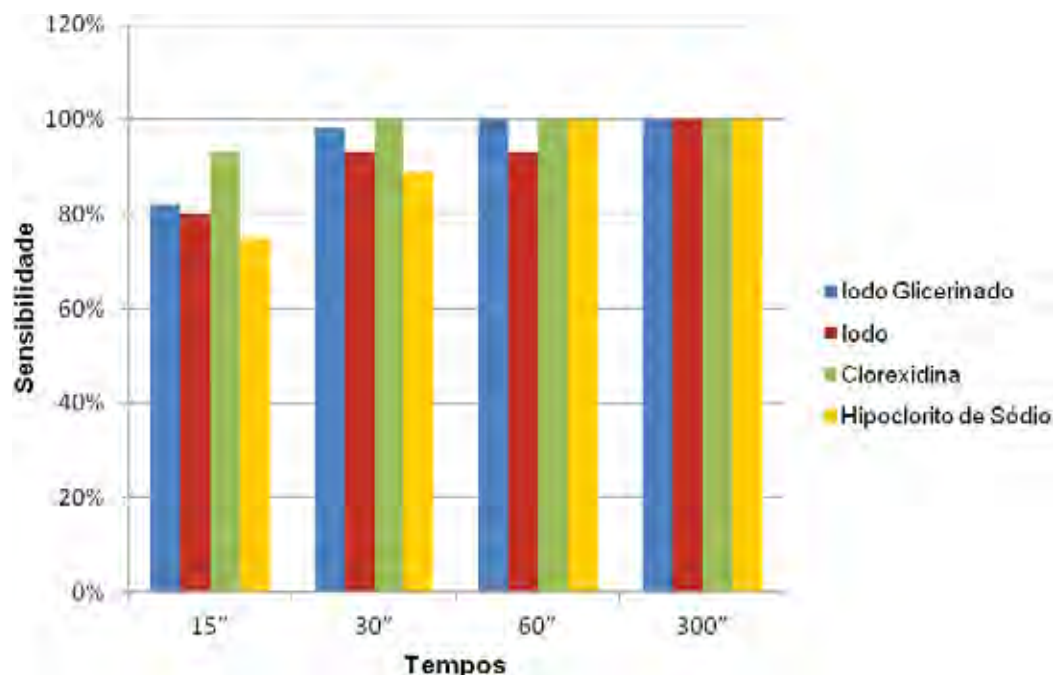


Figura 3. Porcentagem da eficácia *in vitro* dos desinfetantes utilizados no *pré* e *pós-dipping* frente a 45 amostras de *Candida spp* isoladas a partir de casos de mastite bovina em 41 rebanhos leiteiros de 4 estados brasileiros em 2009.

O perfil de sensibilidade das leveduras do gênero *Candida spp.* frente ao iodo glicerinado nos tempos de 15'', 30'', 60'' e 300'' foi de 82,23%, 97,78%, 100,00% e 100,00%, respectivamente. Com relação ao iodo isolado, observou-se que 80,00%, 93,34%, 93,34% e 100,00% das amostras de leveduras foram sensíveis aos diferentes tempos de contato com o desinfetante. Já a clorexidina, os isolados apresentaram 93,34%, 100,00%, 100,00% e 100,00% de sensibilidade. Quanto ao hipoclorito de sódio, observou-se que 75,56%, 88,89%, 100% e 100% foram sensíveis nos diferentes tempos estudados.

5.3. Avaliação *in vitro* do emprego dos processos de pasteurização e fervura do leite contaminado com *Candida spp.*

As leveduras isoladas e identificadas no subitem 4.1, foram submetidas às relações temperatura/tempo empregadas nos processos de pasteurização permitidos no Brasil e também no processo de fervura do leite.

Na tabela 2 podemos verificar os números absolutos (N) e as porcentagens (%) de resistência térmica apresentadas pelo gênero *Candida spp.* isoladas de mastite bovina provenientes de propriedades leiteiras em 4 estados brasileiros em 2009.

Tabela 2. Número absoluto (N) e porcentagem (%) de sobrevivência aos processos de pasteurização lenta, rápida e fervura, apresentado por 45 isolados de leveduras do Gênero *Candida*, isoladas a partir de casos de mastite bovina em 41 rebanhos leiteiros de 4 estados brasileiros em 2009.

Levedura	Pasteurização Lenta		Pasteurização Rápida		Fervura	
	N	%	N	%	N	%
<i>Candida spp.</i>	3 (45)	6,66	29 (45)	64,44	7(45)	15,55

Tabela 3. Média/Unidade Formadora de Colônia (U.F.C.) de *Candida spp.* isoladas a partir de casos de mastite bovina em 41 rebanhos leiteiros de 4 estados brasileiros em 2009.

Tratamento Térmico	Média/U.F.C.
Pasteurização Lenta	0,15
Pasteurização Rápida	413,72
Fervura	3,54

Em relação à pasteurização lenta, dos 45 isolados de *Candida spp.*, menos de 7% dos isolados resistiram à temperatura de 65°C por 30 minutos (Tabela 2), tendo-se observado uma média de 0,15 X 10 U.F.C./mL/isolado (Tabela 3). Referente ao

tratamento da pasteurização rápida, 64,44% dos isolados resistiram à temperatura de 75°C/20 segundos (Tabela 2), com uma média de $140,56 \times 10$ U.F.C./mL/isolado (Tabela 3). Em relação à fervura, 15,55% dos isolados resistiram a este procedimento (Tabela 2), tendo-se observado uma média de $3,54 \times 10$ U.F.C./mL /isolado.

VI. DISCUSSÃO

A produção leiteira no Brasil vem crescendo nos últimos anos, em 2005 foram produzidos 24.620,859 (24,6 bilhões) de litros de leite, já no ano de 2010 a produção de leite totalizou 30.715,460 (30,7 bilhões) litros de leite (IBGE, 2010).

O leite foi considerado como um dos produtos que apresenta elevadas possibilidades de crescimento, tanto para a produção quanto para a exportação, em conformidade com as projeções realizadas e descritas na tabela 4 abaixo. Estes dados revelam seu grande potencial de desenvolvimento e consolidação como produto de importância na economia nacional segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2011).

Tabela 4. Produção, Consumo e Exportação de Leite

LEITE (milhões de litros)									
Ano	Produção			Consumo			Exportação		
	Projeção	linf.	Lsup.	Projeção	linf.	Lsup.	Projeção	linf.	Lsup.
2010/11	31.569,6	30.691,2	32.447,9	31.801,9	30.034,8	33.569,1	209,3	-	625,0
2011/12	32.309,6	30.736,1	33.883,0	32.498,3	30.043,6	34.953,0	218,7	-	774,2
2012/13	32.989,1	30.873,5	35.104,7	33.148,7	30.106,2	36.191,1	229,5	-	899,2
2013/14	33.645,6	31.078,0	36.213,2	33.792,0	30.253,6	37.330,4	240,2	-	1.006,9
2014/15	34.295,6	31.338,7	37.252,5	34.431,7	30.455,8	38.407,7	250,9	-	1.103,7
2015/16	34.943,5	31.641,2	38.245,7	35.070,6	30.700,1	39.441,0	261,6	-	1.192,5
2016/17	35.590,6	31.975,3	39.206,0	35.709,1	30.976,7	40.441,5	272,2	-	1.275,3
2017/18	36.237,6	32.334,1	40.141,1	36.347,6	31.278,9	41.416,2	282,9	-	1.353,3
2018/19	36.884,5	32.712,6	41.056,3	36.986,0	31.602,1	42.369,9	293,6	-	1.427,2
2019/20	37.531,4	33.107,4	41.955,3	37.624,4	31.942,6	43.306,1	304,3	-	1.497,8
2020/21	38.178,2	33.515,8	42.840,7	38.262,8	32.298,1	44.227,5	315,0	-	1.565,5

Fonte: Elaboração da AGE/Mapa e SGE/Embrapa com dados do IBGE/Pesquisa Pecuária Municipal; MDIC/Aliceweb; Embrapa Gado de Leite.

No entanto, a mastite bovina continua sendo um grande problema para a indústria leiteira, apresentando alta prevalência e redução na quantidade e na qualidade do leite; apesar dos inúmeros programas propostos para controlá-la e em consequência diminuir os impactos econômicos ocasionados na atividade leiteira (FREITAS *et al.*, 2005; SPANAMBERG *et al.*, 2009).

As leveduras tem sido relacionadas como patógenos emergentes em função das mudanças verificadas nos sistemas de produção de leite e nos programas de controle da mastite bovina, principalmente com o uso de antimicrobianos por período prolongado. Diversas espécies tem sido isoladas de leite obtido de animais acometidos pela mastite, sendo o gênero *Candida* a mais frequente (KRUKOWSKI *et al.*, 2000; SANTOS & MARIN, 2005).

Candida é comumente considerada uma levedura patogênica oportunista, em hospedeiros sadios a levedura evoluiu para tornar-se um comensal de bastante sucesso, expressando uma série de compostos que facilitam a sua fixação nas superfícies de mucosas. Em hospedeiros debilitados as mesmas características se tornam fatores de virulência permitindo uma extensa fixação nas mucosas e permitindo uma invasão destes tecidos, deslocando assim o tênue equilíbrio entre comensalismo e patogenicidade em favor da levedura (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003).

A candidíase é uma infecção causada por fungos do gênero *Candida*, sendo que o agente mais comum é a *C. albicans*, a qual pode ser isolada, em condições normais, a partir de pele, orofaringe, mucosa vaginal e fezes. Várias espécies de *Candida*, incluindo *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae* e *C. guilliermondii* podem ser isoladas a partir de diferentes fontes, podendo não ser patogênicas ou podendo causar infecções, particularmente em pacientes imunocomprometidos, ou submetidos a tratamentos prolongados com antibióticos, corticosteróides ou drogas citotóxicas, dentre outras condições onde o organismo encontre-se debilitado (LACAZ *et al.*, 1998; LARONE, 1995; TRABULSI *et al.*, 1999; VARTIVARIAN *et al.*, 1993).

Candida krusei foi a espécie mais isolada (Tabela 1) o que coincide com as descrições de FARNSWORTH & SORENSEN (1972) para rebanhos nos Estados Unidos e de AALBAEK *et al.* (1994) em rebanhos na Dinamarca e também com a descrição de SANTOS & MARIN (2005) para rebanhos brasileiros. Vários relatos da literatura apresentam o isolamento das espécies de *C. krusei* e *C. albicans* em grande número em casos de mastite bovina (RICHARD *et al.*, 1994; COSTA, 1991; AALBAEK *et al.*, 1994; KRUKOWSKI *et al.*, 2000; FARNSWORTH & SORENSEN, 1972; CHENGAPPA *et al.*, 1984; SANTOS & MARIN, 2005).

A exploração moderna da pecuária leiteira envolve necessariamente a produção de leite de alta qualidade. O contrário do que notoriamente ocorre em todo o território nacional, onde o leite cru é de baixa qualidade (ARCURI *et al.*, 2006; NERO *et al.*, 2005; ROCHA *et al.*, 2006).

Dessa forma, a utilização de desinfetantes na exploração leiteira desempenha uma função chave na rentabilidade da fazenda, contribuindo para a produção de leite de alto padrão e para a obtenção de um estado sanitário adequado do rebanho, uma vez que a contaminação ambiental e o risco de doenças infecciosas são uma constante nos rebanhos leiteiros (FONSECA, 1998).

A eficiência e as limitações de cada antisséptico é muito importante, uma vez que, seu uso inadequado ou mesmo baixas concentrações da solução, leva a uma seleção natural de cepas resistentes em uma população de microrganismos (FONSECA, 1998; BRITO *et al.*, 2000).

Em relação aos desinfetantes utilizados neste trabalho, verificamos que a melhor atividade desinfetante *in vitro* foi obtida com a clorexidina. Resultados semelhantes e este desinfetante foram obtidos por PEDRINI & MARGATHO (2003), ao analisarem sua ação contra *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Corynebacterium spp.* e *Escherichia coli*. A clorexidina é bastante utilizado para o tratamento de infecções superficiais de tetos em vacas devido a o seu efeito cumulativo e contínuo, permanecendo na pele no mínimo por seis horas (SPINOSA *et al.*, 2002), além disso atua na presença de matéria orgânica e é de fácil aplicação. Além do mais, quando comparado ao iodo, a clorexidina, nas concentrações indicadas, causa menor reação tecidual nos tetos dos animais (PHILLIPS *et al.*, 1991)

Os resultados obtidos para o iodo isolado quando comparado ao glicerinado, apresentou menores porcentagens de microrganismo sensível ao antisséptico, pois as leveduras se mostraram mais resistentes nos tempos de 15, 30 e 60 segundos, tempos normais no processo de imersão do teto. No trabalho realizado por PEDRINI & MARGATHO (2003), as soluções de iodo a 2% e a 1% apresentaram melhor desempenho contra todos os microrganismos causadores de mastites contagiosa e ambiental. Porém nestas concentrações é importante destacar a possibilidade do

desinfetante deixar resíduos no leite (JONES, 1998). Para MEDEIROS *et al.* (2009) ao estudarem a sensibilidade *in vitro* de isolados de *Staphylococcus spp.* de vacas com mastite subclínica frente ao iodo 0,57% nos tempos de 15", 30", 60" e 300", obtiveram perfil de sensibilidade que foram de 93,90%, 97,80%, 100,00% e 100,00%, respectivamente. Neste sentido, podemos mencionar que o iodo glicerinado apresentou melhores resultados, além do mais, esta base emoliente em sua formulação, condiciona a pele dos tetos minimizando irritação no local.

Em relação ao hipoclorito de sódio, os resultados obtidos neste estudo foram insatisfatórios, pois 24,44% e 11,11% das amostras foram resistentes ao desinfetante nos tempos de 15 e 30 segundos. PEDRINI & MARGATHO (2003) relataram que o hipoclorito de sódio a 2% mostrou excelente eficácia contra todos os microrganismos testados, contudo essa concentração é extremamente irritante para a pele do animal. Constataram ainda que o hipoclorito de sódio a 0,5%, concentração recomendada para rotina, teve efeito antimicrobiano bastante reduzido.

A utilização do cloro como agente desinfetante é muito comum nas propriedades leiteiras do Brasil, uma vez que o produto apresenta baixo custo (AMARAL, 2004).

COSTA *et al.* (1998) também realizaram estudo sobre a atividade do cloro frente a amostras de *Staphylococcus spp* e constataram resistência *in vitro* deste desinfetante e ressaltaram a importância do uso adequado uma vez que a presença de matéria orgânica determina uma diminuição na eficiência do mesmo.

Ao avaliarmos o comportamento das leveduras do gênero *Candida spp.*, um dos microrganismos emergentes do complexo etiológico da mastite bovina frente a 3 diferentes processos térmicos (pasteurização lenta, rápida e fervura) empregados no leite, verificamos, que o processo da pasteurização rápida apresentou 6,66% das cepas resistentes quando submetidas ao teste do tratamento térmico, seguido pelo processo de fervura (15,55%) e pasteurização lenta (64,44%). Cabe salientar que as médias de U.F.C. de levedura/mL após a realização dos testes foram de $0,15 \times 10$ U.F.C./mL /isolado para pasteurização lenta, $413,72 \times 10$ U.F.C./mL /isolado para o processo de pasteurização rápida e $3,54 \times 10$ U.F.C./mL /isolado para a fervura.

A pasteurização lenta foi o mais eficiente dentre os tratamentos testados, em termos de capacidade de promover a redução da população de leveduras presentes nas amostras, considerando a comparação com as soluções controles, uma vez que apresentaram placas de petri com colônias incontáveis, preenchendo toda a área das placas com meio de cultura. Vale ressaltar, que todos os testes foram repetidos cinco vezes para assegurar maior confiabilidade dos resultados obtidos.

Ao estudarem a susceptibilidade de algas aclorofiladas - *Prototheca zopfii* frente aos processos de pasteurizações lenta e rápida do leite, MELVILLE *et al.* (1999), observaram que 85 % dos isolados testados apresentaram resistência em pelo menos um dos testes realizados, tendo concluído que, as variações de tempo e temperatura utilizados nos procedimentos de tratamento térmico, poderiam determinar variações na eficiência do método de pasteurização relativos a estes microrganismos.

A resistência de leveduras e fungos filamentosos após tratamento térmico representa sério problema para o leite e seus derivados, pois podem influenciar as características organolépticas de derivados lácteos como os queijos (JODRAL *et al.*, 1993). Além disso, a contaminação destes produtos com estes microrganismos pode representar potencial via de transmissão dos mesmos, bem como de suas toxinas para o homem (RUZ-PERES, 2005). Neste sentido, VASQUÉZ-BELDA (1995) relatou a presença de fungos toxigênicos em queijos com alta umidade e consistência mole. Outro derivado lácteo altamente consumido pela população mundial, e que pode sofrer influência da presença de fungos é o iogurte. JORDANO *et al.* (1989) isolaram algumas espécies de *Aspergillus* nestes produtos, enquanto LI & LI (1998) ao analisar amostras de iogurte verificaram um total de 67,33 % contaminadas por fungos filamentos e leveduras, apresentando uma média de $39,5 \times 10^2$ U.F.C./mL para os fungos filamentosos e incontáveis para as leveduras. Por sua vez SUZZI *et al.* (2003) isolaram um total de 179 leveduras em amostras de manteigas, as mais frequentes, foram identificadas como *Trichosporon asahii* (45), *C. parapsilosis* (33), *Rhodotorula mucilaginosa* (32), *Candida inconspicua* (29).

A pasteurização rápida é um tratamento térmico que visa eliminar os microrganismos patogênicos que possam contaminar o leite, tornando-o um produto

inócuo ao consumo humano (BRASIL, 2002). No entanto, mediante o exposto, verificamos a possibilidade da persistência de fungos no leite pasteurizado e fervido, especialmente no que se refere à pasteurização rápida, o que pode representar risco ao consumidor. Assim sendo, a resistência de leveduras após a realização de tratamento térmico, representa um risco para o consumo de leite e seus derivados, tendo em vista que estes microrganismos podem vir a causar doenças no consumidor, além é claro, de interferirem na elaboração de derivados lácteos.

VII. CONCLUSÕES

De acordo com os objetivos do estudo e os resultados obtidos, foi possível tecer as seguintes conclusões:

- Foi isolada uma variedade de espécies de leveduras nas amostras de leite analisadas, sendo as mais isoladas *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*.
- A maior atividade desinfetante *in vitro* foi verificada para a clorexidina, porém a utilização do hipoclorito de sódio como agente desinfetante ainda é muito comum nas propriedades leiteiras do Brasil, uma vez que o produto apresenta baixo custo comercial quando comparado aos demais desinfetantes. Conclui-se também neste item, a necessidade de avaliação periódica dos desinfetantes utilizados no *pré* e *pós-dipping*, pois existem variações no perfil de sensibilidade e resistência que podem comprometer os programas de controle da mastite bovina causada pelas leveduras emergentes.
- O processo de pasteurização rápida foi o procedimento no qual houve maior sobrevivência por parte das leveduras submetidas ao teste na metodologia aplicada, seguido pelo processo de fervura e o de pasteurização lenta o que pode representar potencial risco ao consumo de leite e seus derivados, tendo em vista que estes microrganismos podem vir a causar doenças, principalmente em crianças e idosos, bem como podem interferir com os procedimentos utilizados na elaboração de derivados lácteos.

VIII. 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**, v.102, p.451-456, 1994.

ÁLVARES, B.L. **A base da qualidade**. Revista Balde Branco, 2005.

ALTERTHUM, F.; CARVALHAL, L. **Controle de microrganismos**. [S.l.: s.n.], cap. 7, p.75-86, 1999.

AMARAL, L.A.; ROMANO, A.P.M.; NADER FILHO, A.; ROSSI JR, O.D. Avaliação da eficiência da desinfecção de teteiras e dos tetos no processo de ordenha mecânica de vacas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.24, n.4, p.173-177, 2004.

ANDRADE, M.A. Mastite bovina subclínica: prevalência, etiologia e testes de sensibilidade a drogas antimicrobianas. **Revista Vet News**, v.49, p.10-6, 2001.

ANON 2004. **Code of Hygienic Practice for Milk and Milk Products**. Washington DC, USA, 29 March–2 April 2004: Joint FAO/WHO Food Standards Programme – Codex Committee on Food Hygiene, 26th Session,

ARCURI, E.F.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; PINTO, S.M.; ÂNGELO, F.F.; SOUZA, G.N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.3, p.440-446, 2006.

BARBALHO, T.C.F. MOTA, R.A. Isolamento de agentes bacterianos envolvidos em mastite subclínica bovina no Estado de Pernambuco. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.2, n.2, 2001

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts: characteristics and identification**. London, Cambridge, University Press, p.811, 1993.

BAUMGARTNER, M.; SPERGSE, J.; SCHODER, G.; WINTER, P. Outbreak of clinical yeast mastitis in a dairy herd following simultaneous intramammary antibiotic treatment of 23 cows. **Wiener Tierärztliche Monatsschrift**, v.95, p.15-21, 2008.

BLOCK, S.S. **Desinfection, sterilization and preservation**. 4, ed. London; Lea & Febiger, 1991.

BLOCK, S.S. **Disinfection, sterilization and preservation**. 5. ed. Philadelphia; Lippincott Williams & Wilkins, 1162p, 2001.

BRADLEY, A.J. **Bovine mastitis: an evolving disease**. The Veterinary Journal, v.163, p.1-13, 2002.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa no 51, de 18 de setembro de 2002. Brasília, DF. **Diário Oficial da União** de 20/09/2002, seção 1, p.13-22.

BRITO, J.R.F.; BRITO, M.A.V.P. **Programas de controle das mastites causadas por microrganismos contagiosos e do ambiente**. Juiz de Fora: EMBRAPA-CNPGL, 25p., 1998. (Documento, 71)

BRITO, J.R.F.; BRITO, M.A.V.P.; VERNEQUEZ, B.R.S. Contagem bacteriana da superfície de tetas de vacas submetidas a diferentes processos de higienização, incluindo a ordenha manual com participação do bezerro para estimular a descida do leite. **Revista da Universidade Federal de Santa Maria**, v.30, n.5, 2000.

BUENO, V.F.F.; NICOLAU, E.S.; MESQUITA, A.J.; RIBEIRO, A.R.; SILVA, J.A.B.; COSTA, E.O.; COELHO, K.O.; COUTO, D.V. Etiologia e suscetibilidade à antimicrobianos dos agentes da mastite bovina isolados na região de Pirassununga-SP-Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v.32, n.1, p.33-44, 2003.

CARNEIRO, D.M.V.F.; DOMINGUES, P.F.; VAZ, A.K. Imunidade inata da glândula mamária bovina: resposta à infecção. **Ciência Rural**, v.39, p.1934-1943, 2009.

CHAHOTA, R.; KATOCH, R.; MAHAJAN, A.; VERMA, S. Clinical bovine mastitis caused by *Geotrichum candidum*. **Veterinarski ARHIV**, v.71, p.197-201, 2001.

CHENGAPPA, M.M.; MADDUX, R.L.; GREER, S.C.; PINCUS, D.H.; GEIST, L.L. Isolation and identification of yeast and yeastlike organisms from clinical veterinary sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v.19, n.3, p.427-428, 1984.

COLOMBO, A. L.; GUIMARAES, T. Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.5, p.599-607, 2003.

COSTA, E.O. Importância econômica da mastite infecciosa bovina. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v.1, p.21-26, 1991.

COSTA, E.O.; GANDRA, C.R. PIRES, M.F.; COUTINHO, S.D.; CASTILHO, W.; TEIXEIRA, C.M. Survey of bovine mycotic mastitis in dairy herds in the State of São Paulo, Brazil. **Mycopathologia**, v.124, p.13-17, 1993

COSTA, E.O.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T.; GARINO JR, F.; SILVA, J.A.B.; THIERS, F.O. Avaliação *in vitro* dos desinfetantes utilizados na pós ordenha (teat dipping) para controle da mastite bovina. **Revista Napgama**, v.1, n.1, p.18-22, 1998.

COSTA, E.O.; MELVILLE, P.A.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T. Estudo da etiologia das mastites bovinas nas sete principais bacias leiteiras do estado de São Paulo. **Revista Napgama**. São Paulo, ano III, n. 4, p. 6-13, 2000.

CRAWSHAW, W.M.; MACDONALD, N.R.; DUNCAN, G. Outbreak of *Candida rugosa* mastitis in a dairy herd after intramammary antibiotic treatment. **Veterinary Records**, v.156, p.812-813, 2005.

DIAS, R.V.C. Principais métodos de diagnóstico e controle da mastite bovina. **Acta Veterinaria Brasília**, v.1, n.1, p.23-27, 2007.

DYCHDALA, G.R. Chlorine and chlorine compounds In: BLOCK SS. (Ed.) Disinfection, sterilization and preservation. 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1162p., 2001.

EMBRAPA. GADO DE LEITE. **Estatísticas do leite**. Juiz de Fora, 2011. Disponível em: <<http://www.cnpgl.embrapa.br>>. Acesso em 30 set 2011.

FARNSWORTH, R.J.; SORENSEN, D.K. Prevalence and species distribution of yeasts in mammary glands of dairy cows in Minnesota. **Canadian Journal Comparative Medicine**, v.36, p.329-332, 1972.

FERNANDES, A.T.; FERNANDES, M.A.V.; RIBEIRO FILHO, N. **Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde**. São Paulo: Atheneu, 953p., 2000.

FERREIRO, L. FERREIRO, C.L.R.; BANGEL JR, J.J.; FERNANDES, J.C.T.; SOARES, H.C. Mastite bovina na Grande Porto Alegre, RS – Brasil. **Arquivos da Faculdade de Veterinaria - UFRGS**, v.13, p.81-88, 1985.

FINGER, R.M. **Fatores de riscos da higiene de vacas com elevado número de bactérias mesofílicas aeróbias no leite.** Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

FONSECA, L.F.L. **Qualidade do leite e sua relação com equipamento de ordenha e sistema de resfriamento.** I Simpósio Internacional sobre Qualidade do Leite. Curitiba, PR, Brasil, p.54-56,1998.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle de mastite.** São Paulo: Lemos Editorial, 2000.

FORET, C.J.; AGUERO, H.; JANOWICZ, P. Efficacy of Two Barrier Iodine Teat Dips under Natural Exposure Conditions. **Journal Dairy Science**, v.89, p. 2279–2285, 2006.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M.T.; GELLI, D. Foodborne diseases in Southern South America. In: MILIOTIS, M.; BIER, J. (Ed). International Handbook of Foodborne Pathogens. Nova Iorque: Marcel Dekker; 2003. p.733-43.

FREITAS, M.F.L. PINHEIRO JÚNIOR, J.W.; STAMFORD, T.L.M.; RABELO, S.S.; DA SILVA, D.R.; DA SILVEIRA FILHO, V.M.; SANTOS, F.G.B.; DE SENA, M.J.; MOTA, R.A. Perfil da Sensibilidade *in vitro* de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no Agreste do Estado de Pernambuco **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.2, p.171-177, 2005.

FUNAYAMA, S.; GUGELMIN, C.; GONÇALVES, D.; NASCIMENTO, A.C.; SILVA, C.J.; BORSARI, A.P. Uma nova estratégia imunológica para o diagnóstico de mastite bovina subclínica. **Tuiuti: Ciência e Cultura**, n.38, p.43-55, Curitiba, 2006.

GIANOLA, D.; HERINGSTAD, B.; KLEMETSDAL, G.; CHANG, Y. M. Longitudinal analysis of clinical mastitis at different stages of lactation in Norwegian cattle. **Livestock Production Science**, 88:251-261. 2004

GOLDBERG, J.J.; MURDOUGH, P.A.; HOWARD, A.B.; DRECHSLER, P.A. Evaluation of a 1 percent iodophor postmilking teat sanitizer. **Journal of Dairy Science**, v.77, n.33, p.740-747, 1994.

GOTTARDI, W. Iodine and iodine compounds. In: BLOCK S.S (Ed). Disinfection, sterilization, and preservation. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; p. 159–183, 2001.

HARMON, R.J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 7, p. 2103-2112, 1994.

HEMLING, T.C. Teat condition - prevention and cure through teat dips. In: BRITISH MASTITIS CONFERENCE, 2002, **Proceedings...**, Brockworth: Institute for Animal Health/Milk Development Council, p. 1-14, 2002.

HUBER, W.G. Quimioterapia de doenças microbianas, fúngicas e virais: anti-sépticos e desinfetantes. In: BOOTH, N. H.; MACDONALD, L.E. (Ed). Farmacologia e terapêutica em veterinária, 6. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 617-641, 1992.

HURLEY, W.L., MORIN, D.E. Factors affecting susceptibility to mastitis. **Lactation biology**. Disponível em: <<http://classes.ansci.illinois.edu/ansc438/Mastitis/susceptibility.html>> Acesso em 21 out 2011.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: WWW.ibge.gov.br. Acesso em 16 nov 2011.

JENSEN, H.E.A.; MONTEROS, E.; CARRASCO, L. Caprine mastitis due to Aspergillosis and Zygomycosis: a pathological and immunohistochemical study. **Journal of Comparative Pathology**, v.114, p.183-191, 1996.

JODRAL, M.; LINAN, E.; ACOSTA, I.; GALLEGU, C.; ROJAS, F.; BENTABOL, A. **Mycoflora and toxigenic *Aspergillus flavus* in Spanish milks**. Int J Food Microbiology, v.18, p. 171-4, 1993.

JONES, G.M. Milking practices recommended to assure milk quality and prevent mastitis. **Journal of Dairy Science**, p.404-227, 1998.

JAY, J.M. **Microbiología de alimentos**. 6 ed., Porto Alegre, Artmedia, 711 p., 2005

JORDANO, R.; JODRAL, M.; MARTINEZ, P.; SALMERON, J.; POZO, R. Aflatoxinproducing strains of *Aspergillus flavus* in yogurt. **Journal of Food Protection** v. 52, p. 823-824, 1989.

KELLER, B.; SCHEIBL, P.; BLECKMANN, E.; HOEDEMAKER, M. Differentiation of yeasts in mastitis milk. **Mycoses**, v.43, supl.1, p.17-19, 2000.

KREGER-VAN RIJ, N.J.W. **The yeast: a taxonomic study**. Amsterdam, Elsevier, p.1082, 1984.

KRUKOWSKI, H.; TIETZE, M.; MAJEWSKI, T.; RÓZANSKI, P. Survey of yeast mastitis in dairy herds of small-type farms in the Lublin region, Poland. **Mycopathologia**, v.150, p.5-7, 2000.

LACAZ, C.S. **Candidíases**. São Paulo, Edusp, 190p.,1980.

LACAZ C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. **Micologia Médica**. 8ª ed Sarvier, São Paulo, 695p., 1991.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. **Guia para identificação de fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. Sarvier, São Paulo, 445p. 1998.

LARONE, D.H. **Medically important fungi. A guide to identification**. 3. ed. Washington: ASM Press, 10p., 1995.

LASSA, H.; MALINOWSKY, E. Resistance of yeasts and algae isolated from cow mastitic milk to antimicrobial agents. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v.51, p.575-578, 2007.

LI, F.; LI, Y. - Study on the contamination level and the tolerable limit of mould and yeast in yoghurt. **Wei Sheng Yan Jiu**. v. 27, n. 4, p. 257-258, 1998.

LOFTSGARD, G.; LINDQUIST, K. Bovine mycotic mastitis. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.1, p.201-220, 1960.

LOPES, S.T.A; BIONDO, A.W; SANTOS, A.P. **Manual de Patologia Clínica Veterinária**. 3 ed. Santa Maria: p.42-43, 2007.

MAFFEI, C. M. L. **Amostras de *C. albicans* isoladas de gestantes: fatores de virulência, sensibilidade a antifúngicos, tipagem fenotípica e genotípica**. 183p., 1996. Tese (Doutorado em Microbiologia), Universidade de São Paulo, São Paulo 1996.

MACHADO, P.F.; BARANCELLI, G.; PEREIRA, A.R. CCS: Leite com mais qualidade e melhor rendimento industrial. **Indústria de Laticínios**, v.2, p.65-68, 1998.

MACHADO, P.F.M.; PEREIRA, A.R.; SARRIES, G.A. Composição do leite de tanques de rebanhos brasileiros distribuídos segundo sua contagem de células somáticas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, p.2765-3768, 2000.

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - Assessoria de Gestão Estratégica. **Projeções do Agronegócio Brasil 2010/11 a 2020/21**. Brasília, 2011. Disponível em: <
http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Ministerio/gestao/projecao/PROJECOES%20DO%20AGRONEGOCIO%202010-11%20a%202020-21%20-%202_0.pdf>. Acesso em 25 out 2011.

McDONNEL, G.; RUSSELL, A.D. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. **Clinical Microbial Reviews**, v.12, p.147-179, 1999.

MEDEIROS, E.S.; DOS SANTOS, M.V.; JUNIOR, J.W.P.; DE FARIA, E.B.; WANDERLEY, G.G.; BTELES, J.A.A.; MOTA, R.A. Avaliação *in vitro* da eficácia de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-*dipping* frente a amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.1, p.71-75, 2009.

MELVILLE P.A.; WATANABE E.T.; BENITES N.R.; RIBEIRO A.R.; BUENO J.A.; GARINO F.; COSTA E.O. Evaluation of the susceptibility of *Prototheca zopfii* to pasteurization of milk. **Mycopathologia**, v. 146, p. 83-89, 1999.

MENDONÇA, C.L.; FIORAVANT, M.C.S.; SILVA, J.A.B.A. Etiologia da mastite bovina. **Veterinária Notícias**, v.5, n.1, p.107-118, 1999.

MERIANOS, J.J. Surface active agents. In: BLOCK, S. S. (Ed.) Disinfection, sterilization and preservation. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1162p, 2001.

Ministério da Agricultura. Decreto no 30.691, de 29 de março de 1952, alterado pelo Decreto no 1255, de 25 de junho de 1962. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Brasília: Ministério da Agricultura; 1980. p.89.

MORETTI, A.; PASQUALI, P.; MENCARONI, G.; BONCIO, L.; PIERGILI FIORETTI D. Relationship between cell counts in bovine milk and the presence of mastitis pathogens (yeasts and bacteria). **Zentralbl Veterinarmed**, v.45, p.129-132, 1998.

MÜLLER, E.E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. In: SIMPÓSIO SOBRE SUSTENTABILIDADE DA PECUÁRIA LEITEIRA NA REGIÃO SUL DO BRASIL, 2, 2002, **Anais...**, Maringá: p.206-217, 2002.

NASCIF JR., I.A. **Diagnóstico da mastite subclínica bovina pela condutividade elétrica do leite, cmt e contagem de células somáticas: influência das estações do ano, fases da lactação e ordenhas da manhã e da tarde**. 47p. 2001 Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2001.

NASCIF JR., I.A. **Avaliação da eficácia do ácido láctico frente ao iodo na anti-sepsia dos tetos após a ordenha na prevenção da mastite bovina**. 65p. 2005 Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

NERO, L. A.; MATTOS, R.M.; BELOTI, V. ; BARROS, F.A.M.; PINTO, N.A.P.J.; ANDRADE, J.N.; SILVA, P.W.; FRANCO, M.G.D.B. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Dissertação Instrução Normativa 51. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.1, p.191-195, 2005.

NERO, L.A.; MATTOS, M.R.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; NETTO, D.P.; PINTO, J.P.A.N.; ANDRADE, N.J.; SILVA, W.P.; FRANCO, B.D.G.M. Hazards in non-

pasteurized milk on retail sale in Brazil: prevalence of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and chemical residues. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, n.3, p.211-215, 2004.

NOBRE, M.O.; NASCENTE, P.S.; MEIRELES, M.C.; FERREIRO, L. Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. Revisão Bibliográfica. **Ciência Rural**, v.32, p.175-184, 2002.

OLIVAL, A.A.; SPEXOTO, A.A.; CAMPOS, D.F.S.; FERREIRA, F.; FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V.; DIAS, R.A. Hábitos de consumo do leite informal, associados ao risco de transmissão de doenças, no município de Pirassununga, SP. **Revista de Higiene Alimentar**, v.16, p. 35-40, 2002.

PANKEY, J.W. Postmilking teat antisepsis In: JARRET, J.A. Symposium on bovine mastitis. The Veterinary Clinics of North America, Large Animal Practice, Philadelphia, v. 6, n.2, p.335-348, 1984.

PAULA, M.C.; RIBAS, N.P.; MONARDES, H.G.; ARCE, J.E.; ANDRADE, U.V.C. Contagem de células somáticas em amostras de leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.5, 2004.

PEDRINI S.C.B.; MARGATHO L.F.F. Sensibilidade de micro-organismos patogênicos isolados de casos de mastite clínica em bovinos frente a diferentes tipos de desinfetantes. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.70, n.4, p.391-395; 2003.

PHILLIPS, M.F.; VASSEUR, P.B.; GREGORY, C.R. Clorhexedine diacetate versus povidone-iodine for preoperative preparation of the skin: a prospective randomized comparison in dogs and cats. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.27, p.105-108, 1991.

PHILPOT, W.N. & NICKERSON, S.C. **Winning the Fight Against Mastitis**. Naperville, IL: Westfalia-Surge, 188p., 2000.

PHILPOT, W.N. & NICKERSON, S.C. **Vencendo a luta contra a mastite**. Westfalia Landtechnik do Brasil Ltda. Campinas, 6 ed. 189p. .2002

PHILPOT, W.N. Qualidade do leite e controle da mastite: passado, presente e futuro. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE QUALIDADE DE LEITE E CONTROLE DE MASTITE, 2., 2002, Ribeirão Preto. **Anais...** São Paulo: Instituto Fernando Costa, p. 23-38. 2002.

PORCIONATO, M.A.F.; REIS, C.B.M. dos; BARREIRO, J.R.; MORENO, J.F.G.; MESTIERI, L. **Efeito da fervura, resfriamento ou congelamento na qualidade do leite cru**. Revista Acadêmica Ciência Agrária e Ambientais, v. 6, n. 4, p. 511-517, 2008.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

RAINARD, P.; RIOLLET, C. Innate immunity of the bovine mammary gland. Review article. **Veterinary Research**, v.37, p.369-400, 2006.

RADOSTISTS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCUFF, K.W. **Clínica Veterinária – Um tratado de doenças de bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**. São Paulo: Editora Guanabara Koogan, 2002.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W. **Veterinary Medicine: a Textbook of the Disease of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats**, 10th ed. Saunders, Philadelphia. p.673–762, 2007.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia vegetal**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

REBHUN, W.C. **Doenças do Gado Leiteiro**. São Paulo: Editora Roca, p.339-377, 2000.

RIBEIRO, M.E.R.; PETRINI, L.A.; AITA, M.F.; BALBINOTTI, M.; STUMPF JR, W.; GOMES, J.F.; SCHRAMM, R.C.; MARTINS, P.R.; BARBOSA, R.S. Relação entre mastites clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira Agrociência**, v.9, n.3, p-287-290, 2003.

RIBEIRO, M.G.; MOTTA, R.G.; PAES, A.C. ALLENDORF, S.D.; SALERNO, T.; SIQUEIRA, A.K.; FERNANDES, M.C.; LARA, G.H.B. Peracute bovine mastitis caused by *Klebsiella pneumoniae*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, p.485-488, 2008.

RICHARD, J.L.; MACDONALD, J.S.; FICHTER, R.E.; ANDERSON, A.J. Identification of yeasts from infeted bovine mammary glands and their experimental infectivity in cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v.48, p.1991-1994, 1980.

ROCHA, J.S.; BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Condições de processamento e comercialização de queijo-de-minas frescal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.2, p.263-272, 2006.

ROSENBERGER, G. **Exame Clínico dos Bovinos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993.

RUZ-PEREZ, M.; YOKOYA, E.; PASSARELLI, D.; CANTARINO, S.C.; BENITES, N.R.; MELVILLE, P.A. Pesquisa de fungos no leite de tanques de refrigeração de

propriedades de exploração leiteira. **Arquivo Instituto Biológico**, v.71, p.663-665, 2004.

RUZ-PEREZ, M. **Avaliação da presença de fungos em amostras de leite cru e estudo da susceptibilidade destes microrganismos às relações temperatura/tempo empregadas no processo de pasteurização e fervura**. 92f. 2005 Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicadas às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

RUZ-PEREZ, M. Resistência de fungos filamentosos e leveduras isolados de leite cru bovino à pasteurização e fervura. **Veterinária e Zootecnia**, v.17, n.1, p.62-70, 2010.

SANTOS, R.C.; MARIN, J.M. Isolation of *Candida* spp. From mastitic bovine milk in Brazil. **Mycopathologia**, v.159, p.251- 253, 2005.

SANTOS M.V.; FONSECA L.F.L. **Estratégias para Controle de Mastite e Melhoria da Qualidade do Leite**. Editora Manole, Barueri. 328p, 200.

SARAN, A. Mastitis Bovina: Enfermedades de la ubre y su control en Israel; **Inst. Vet. Kimron**, p.72, 1986.

SCHAEFER, S. **Iodo**. Disponível em: <http://www.tabela.oxigenio.com/nao_metas/elemento_quimico_iodo.htm>. Acesso em 21 nov 2011.

SHEENA A.; SIGLER L. **Candida krusei isolated from a sporadic case of bovine mastitis**. Canadian Veterinary Journal, v.36, n.6, p.365, 1995

SILVA, W.P.; DESTRO, M.T.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.G.M. Biochemical characteristic of typical and atypical *Staphylococcus aureus* in mastitic Milk and

enviromental sample of brazilian dairy farms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, n.2, 2000.

SILVA, N. Doença da glândula mamária: mamite/mastite. In: MARQUES, D. C. Criação de bovinos. 7.ed. Belo Horizonte: Consultoria Veterinária e Publicações, p.435-451, 2003.

SPANAMBERG, A.; HARTFELDER, C.; FUENTEFRIA, A.M.; VALENTE, P. Diversity and enzyme production by yeasts isolated from raw milk in Southern Brazil. **Acta Scientiae Veterinaire**, v.32, p.195-199, 2004.

SPANAMBERGI, A.; SANCHES, E.M.C.; SANTURIO, J.M.; FERREIRO, F. Mastite micótica em ruminantes causada por leveduras. **Ciência Rural**, v.39, n.1, p.282-290, 2009

SPINOSA, H.S.; GORNIK, S.L.; BERNADINI, M.M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 489p, 2002.

SUZZI, G.; SABIRONE, M.; MARTUSCELLI, M.; GATTI, M.; FORNASARI, M. E.; NEVIANI, E. F. Yeasts associated with manteca, **Journal ems Yeast**, v.3, n.2, p.159-166, 2003.

THOMPSON K,G.; DI MENNA, M.E.; CARTER, M.E.; CARMAN, M.G. Mycotic mastitis in two cows. **New Zealand Veterinary Journal**, v.26, p.176-177, 1978.

TOZZETTI, D.S.; BATAIER, M.B.N.; ALMEIDA, L.R. Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas – revisão de literatura. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, n.10, 2008.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**. 3 ed., São Paulo: Atheneu, p.239-285, 1999.

VARTIVARIAN, S.E.; ANAISSIE, E.J.; BODEY, G.P. Emerging fungal pathogens in immunocompromised patients: classification, diagnosis, and management. **Clinical Infectious Diseases**, v.17, p.487-491, 1993.

VASQUEZ-BELDA, B. Incidência de hongos toxigenicos em queserias de la zona de Arzua (La Coruña España). **Food Science and Technology International**, v.1; p.91-95, 1995.

WATTIAUX, M.A. **Mastite: prevenção e detecção**. *The Babcock Institute*. Disponível em: <<http://www.babcock.wisc.edu/?q=node/221>>. Acesso em 01 dez 2011.

WAWRON, W.; SZCZUBIAL, M. Treating mastitis mycotica in cows. **Medycyna Weterynaryjna**, v.57, p.863-866, 2001.

WILSON, D. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* em leite a ser pasteurizado. **Revista de Saúde Pública**, v.11, p.1-11, 1997.

YAMAMURA, A.A.M.; MÜLLER, E.E.; PRETTO-GIORDANO, L.G.; COSENZA, M.; SILVA, P.F.N.; GODOY, A. Isolamento de *Prototheca* spp. de vacas com mastite, de leite de tanques de expansão e do ambiente de animais. **Semina: Ciências Agrárias**, v.28, p.105-114, 2007.