

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE LINHAGENS DE *Prototheca zopfii*
ISOLADAS DO LEITE DE VACAS E SENSIBILIDADE “IN VITRO” A
ANTIMICROBIANOS E ANTI-SÉPTICOS

TATIANA SALERNO

Botucatu – SP
2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE LINHAGENS DE *Prototheca zopfii*
ISOLADAS DO LEITE DE VACAS E SENSIBILIDADE “IN VITRO” A
ANTIMICROBIANOS E ANTI-SÉPTICOS

TATIANA SALERNO

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

Orientador: Prof. Ass. Dr. Márcio Garcia Ribeiro
Co-Orientador: Prof. Titular Hélio Langoni

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Salerno, Tatiana.

Caracterização genotípica de linhagens de *Prototheca zopfii* isoladas do leite de vacas e sensibilidade *in vitro* a antimicrobianos e anti-sépticos / Tatiana Salerno. – Botucatu : [s.n.], 2007

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2007.

Orientador: Márcio Garcia Ribeiro

Assunto CAPES: 50502034

1. Bovino - Doenças - Aspectos genéticos
2. Mastite em bovino

CDD 636.20896

Palavras-chave: Genotipagem; Mastite; *Prototheca zopfii*; Prototecose bovina; Tratamento.

Nome do Autor: Tatiana Salerno

Título: CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE LINHAGENS DE *Prototheca zopfii* ISOLADAS DO LEITE DE VACAS E SENSIBILIDADE “IN VITRO” A ANTIMICROBINOS E ANTI-SÉPTICOS

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Ass. Dr. Márcio Garcia Ribeiro

Presidente e Orientador

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Ass. Dr. Antônio Carlos Paes

Membro Titular

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof^a. Dr^a. Alice Maria Melville Paiva Della Libera

Membro Titular

Departamento de Clínica Médica

FMVZ – USP – São Paulo

Data da Defesa: 30 de novembro de 2007.

Dedicatória

Dedico este trabalho:

Aos meus pais (Alexandrina e Gilberto),

Que sempre me incentivaram com muito amor, compreensão e deram-me a chance de estudar em uma faculdade, mesmo diante de tantas dificuldades. Obrigada por todos os esforços, sem a ajuda e o amor de vocês não estaria aqui.

Ao meu irmão Alessandro,

Meu “filho”, que tanto amo e que embora esteja distante carrego sempre em meu coração.

Ao meu marido Alexandre,

Pelo amor, auxílio em todos os momentos, carinho, compreensão e socorros prestados.

Aos meus filhotes (Lucky “in memorian”, Belinha, Júnior, Thor e Minie)

Por alegrarem todos os meus dias e pelo amor incondicional.

Dedico esta pesquisa:

*Ao meu orientador, Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro,
Pelo incentivo, confiança, dedicação e profissionalismo.*

*Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Hélio Langoni,
Pelos ensinamentos e apoios mesmo à distância.*

*Ao meu “orientador” Prof. Dr. Antônio Carlos Paes,
Que me acompanha desde 2004 em todos os estágios realizados no
departamento. Obrigada pela confiança, incentivo, amizade e carinho.*

*À Profa. Dra. Jane Megid,
Pelo acolhimento e incentivo no ingresso do mestrado.*

*Ao Prof. Dr. Uwe Roesler,
Pela atenção e auxílio na realização deste trabalho.*

Agradecimentos

À minha família pelo amor, apoio, palavras confortantes e compreensão pelas ausências e “stress”. Amo todos vocês!!!

Ao meu marido Alexandre pela alegria, dedicação exclusiva, amor e companheirismo. Obrigada por dividir sua vida comigo!!!

Ao meu orientador Prof. Márcio Garcia Ribeiro, pelas publicações e trabalhos realizados em grupo, pelo auxílio, tempo, paciência redação e correção desta dissertação. Meus sinceros agradecimentos.

Agradeço também à Elizete, Nicole e em especial ao Nicolas, pelos momentos alegres, que ficarão marcados por todas nossas vidas.

Ao Prof. Antônio Carlos Paes, pelo qual sinto profunda admiração e respeito pela inteligência e profissionalismo e a sua esposa Carmela. Obrigada por todo carinho, amizade e conselhos.

Ao Prof. Hélio Langoni e Cidinha pela dedicação, carinho e amizade.

Profa. Jane Megid, Prof. Paulo Francisco Domingues, Prof. Rafael Modolo, Prof. José Paes de Almeida Nogueira Pinto e Profa. Simone Baldini, obrigada pela atenção e auxílios prestados.

À Profa. Alice Maria Melville Paiva Della Libera pelo carinho, atenção e participação fundamental em minha formação profissional.

Ao técnico Fernando José Paganini Listoni, por fazer com que eu me encantasse pela microbiologia, contribuindo para meu crescimento profissional. Obrigada pelo apoio, amizade e ensinamentos.

Aristeu, obrigada pela disponibilidade, esclarecimentos e rapidez com os dados estatísticos.

Tânia, Adriana, Wanderley, Sérgio, Benedito, Rodrigo Carreira, Kadu e Marcos, obrigada pelos momentos alegres e agradável convívio.

À Dna Ana, e demais funcionárias que mantêm a ordem e limpeza do departamento, agradeço o carinho e o cuidado com o meu “segundo lar”.

À Vitória, Janaína, Dani, Marcela (Bernenta), Gustavo Lara, Camile, Camila, Susan, Marta, Jeniffer, Rodrigo (Fartura), Acácia Elias, Fábio (Shima), Taíssa, André Peres Barbosa, Audrey Rennó, Juliano Hoffmann, Luciano, Juliana Machado, Henry, Cláudia, Walquíria, Liguito, Veruska, Cristiane, Luciana, Marcela Zampoli Troncarelli, Nair, Vanessa Salgado, Ana Paula Contente, Lucilene, Felipe, Patrícia, Haroldo, Leila, Priscila, Deolinda, Mirella, Roberto Bolsanello e a todos os pós-graduandos, residentes e estagiários do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, obrigado pelo convívio, amizade e momentos alegres.

À Loredana e todos os pós-graduandos, técnicos, residentes e professores da Inspeção, o meu profundo agradecimento pelos auxílios, paciência, disponibilidade e prontidão.

Ao meu “compadre” Rodrigo Costa da Silva pela grande amizade, apoio, auxílio e momentos de descontração.

A minha “mãe” adotiva Amanda Keller Siqueira, agradeço todos os momentos que passamos juntas, divertidos ou mesmo aqueles com alguns “estresses” e é claro, pelos jantares e almoços nos finais de

semana. Obrigada pela companhia, ajuda e ombro amigo. Nossa amizade também é muito importante para mim.

À Simone Mangia, pela amizade e convivência.

À Melissa Hartman pelo convívio desde a graduação, pelos ataques de risos e amizade,

Às minhas amigas de graduação, Vanessa Archioli, Ana Cíntia Bresolim e Tatiana Tavares, que mesmo distantes, sempre encontraram tempo para um telefonema ou “e-mail” agradável e divertido, matando um pouco a saudade. Adoro vocês!!!

À Dra. Priscilla Anne Melville, pelos ensinamentos que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

Profa. Titular Elizabeth Oliveira da Costa, Prof. Ass. Dr. Válter Ferreira Félix Bueno, Profa. Ass. Dra. Aline Artioli Machado Yamamura, agradeço o fornecimento das cepas de Prototheca spp, essenciais para a realização do presente estudo.

Ao Prof. Dr. Uwe Roesler, pela disponibilidade e contribuição, fundamentais para o trabalho.

Às bibliotecárias da FMVZ-UNESP, pela atenção, correções e auxílios com as referências.

À Denise, Maria e José Roberto (funcionários da pós-graduação) pela atenção, paciência, bom humor e informações solicitadas.

À Capes pelo apoio financeiro a pesquisa.

À todos aqueles que por um lapso de memória não foram citados e que contribuíram para este estudo, mesmo com um gesto de carinho, muito obrigada!

Epígrafe

“Tua caminhada ainda não terminou...A realidade te acolhe dizendo que pela frente o horizonte da vida necessita de tuas palavras e do teu silêncio.

Se amanhã sentires saudades, lembra-te da fantasia e sonha com tua próxima vitória. Vitória que todas as armas do mundo jamais conseguirão obter, porque é uma vitória que surge da paz e não do ressentimento. É certo que irás encontrar situações tempestuosas novamente, mas haverá de ver sempre o lado bom da chuva que cai e não a faceta do raio que destrói.

Tu és jovem. Atender a quem te chama é belo, lutar por quem te rejeita é quase chegar a perfeição. A juventude precisa de sonhos e se nutrir de lembranças, assim como o leito dos rios precisa da água que rola e o coração precisa de afeto.

Não faças do amanhã o sinônimo de nunca, nem o ontem te seja o mesmo que nunca mais.

Teus passos ficaram. Olhes para trás... mas vá em frente, pois há muitos que precisam que chegues para poderem seguir-te”.

CHARLES CHAPLIN

(16 de Abril de 1889 - 25 de Dezembro de 1977)

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Classificação taxonômica do gênero <i>Prototheca</i>	26
Quadro 2 -	Principais características morfológicas e bioquímicas utilizadas na diferenciação das espécies de <i>Prototheca</i>	29
Quadro 3 -	Principais descrições da prototecose mamária bovina em diferentes países dos continentes Europeu, Americano e Asiático.....	31
Quadro 4 -	Principais descrições da prototecose mamária bovina no Brasil...	32

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Sensibilidade microbiana “in vitro” em cepas-controle do gênero *Prototheca* frente a diferentes antimicrobianos indicados para a terapia da mastite. Botucatu, 2007..... 62
- Tabela 2 - Sensibilidade microbiana em linhagens de *P. zopfii* isoladas de casos de mastite bovina clínica e subclínica e de tanque de expansão. Botucatu, 2007..... 63
- Tabela 3 - Média, valores mínimos e máximos para a concentração inibitória mínima (CAM) do hipoclorito de sódio (%) e iodo (%), em estirpes de *Prototheca zopfii* isoladas de casos de mastite clínica (n=24), subclínica (n=2) e tanque de expansão (n=1), em quatro Estados brasileiros. Botucatu, 2007..... 66

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Média \pm desvio-padrão e valores mínimo e máximo para a concentração algicida mínima (CAM) do hipoclorito de sódio (%) e iodo (%), em estirpes de <i>Prototheca zopfii</i> isoladas de casos de mastite clínica (n=24), subclínica (n=2) e tanque de expansão (n=1), em quatro Estados brasileiros. Botucatu, 2007.....	65
--	----

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

® - marca registrada

™ - “trademark”

% - porcentagem

> - maior que

< - menor que

µg - micrograma

µg/mL – micrograma por mililitro

µL – microlitro

µm – micrômetro

90x150mm – noventa por cento e cinqüenta milímetros de diâmetro

°C – graus Celsius

BHI – caldo cérebro e coração

CAAF – citologia aspirativa com agulha fina

CAB – concentração bactericida mínima

CAM – concentração algicida mínima

CIM – concentração inibitória mínima

CLSI/NCCLS – “Clinical and Laboratory Standards Institute/National Committee for Laboratory Standards”

CMT – “California mastitis test”

DMSO – dimetilsulfóxido

ELISA – “Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”

g - grama

HE – hematoxilina-eosina

IC95% - intervalo de confiança de noventa e cinco por cento

mg/L – miligrama por litro

mL - mililitro

mm - milímetro

PAS – ácido periódico de Schiff

PCA – “Plate count agar”

PCR – reação em cadeia pela polimerase

PEM – meio de enriquecimento de *Prototheca*

pH – pressão de hidrogênio

PIM – meio de isolamento de *Prototheca*

SAG – Stammsammlung für Algenkulturen der Universität Göttingen

UFC – unidade formadora de colônia

UFC/mL – unidade formadora de colônia por mililitro

U.I. – unidade internacional

RNA – ácido ribonucléico

* Em virtude do uso consagrado na literatura técnica, algumas abreviaturas seguem sua grafia no inglês.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	xviii
ABSTRACT.....	xix
1 INTRODUÇÃO.....	20
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	24
2.1 Algas do gênero <i>Prototheca</i>	24
2.1.1 Classificação Taxonômica.....	24
2.1.2 Propriedades Gerais.....	26
2.2 Infecções por <i>Prototheca</i> spp nos animais e no homem.....	30
2.2.1 Mastite bovina por <i>Prototheca</i> spp.....	30
2.2.1.1 Etiologia.....	30
2.2.1.2 Epidemiologia.....	31
2.2.1.3 Patogenia.....	34
2.2.1.4 Clínica.....	36
2.2.1.5 Métodos diagnósticos.....	36
2.2.1.6 Tratamento e resistência microbiana.....	39
2.2.1.7 Profilaxia e controle da prototecose mamária.....	42
2.2.1.7.1 Medidas gerais de profilaxia e controle.....	43
2.2.1.7.2 O uso de anti-sépticos no controle da mastite.....	44
2.2.2 Prototecose em animais de companhia.....	48
2.2.3 Prototecose no homem e aspectos de saúde pública.....	49
3 OBJETIVOS.....	53
3.1 Geral.....	53
3.2 Específicos.....	53
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	54
4.1 Delineamento experimental.....	54

4.2	Obtenção das estirpes de <i>P. zopfii</i>	54
4.3	Identificação e manutenção das estirpes de <i>P. zopfii</i>	55
4.4	Perfil de sensibilidade “in vitro” aos antimicrobianos e efeito algicida dos anti-sépticos.....	56
4.4.1	Contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) das cepas de <i>P. zopfii</i>	56
4.4.2	Teste de sensibilidade microbiana (difusão com discos)	57
4.4.3	Avaliação da “concentração algicida mínima” (CAM).....	58
4.4.3.1	Preparo dos inóculos.....	58
4.4.3.2	Anti-sépticos.....	58
4.4.3.2.1	Determinação da “concentração algicida mínima” do hipoclorito de sódio e da tintura de iodo frente aos isolados de <i>P. zopfii</i>	58
4.5	Genotipagem das linhagens de <i>P. zopfii</i>	59
4.6	Análise estatística.....	60
4.6.1	Testes estatísticos.....	60
5	RESULTADOS.....	61
5.1	Unidades Formadoras de colônias de <i>P. zopfii</i>	61
5.2	Teste de sensibilidade microbiana (difusão com discos).....	61
5.3	“Concentração algicida mínima” (CAM) para o hipoclorito de sódio e tintura de iodo.....	64
5.4	Genotipagem das linhagens de <i>P. zopfii</i>	66
6	DISCUSSÃO.....	67
7	CONCLUSÕES.....	78
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
	ANEXOS.....	102
	TRABALHO CIENTÍFICO.....	01

SALERNO, T. **Caracterização genotípica de linhagens de *Prototheca zopfii* isoladas do leite de vacas e sensibilidade “in vitro” a antimicrobianos e anti-sépticos**. Botucatu, 2007. 101p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Nos últimos anos, *Prototheca zopfii* tem sido considerada uma das causas mais importantes de mastite de origem ambiental, refratária a terapia convencional. As infecções mamárias por *P. zopfii* acarretam alterações na composição do leite e redução na produção leiteira. O presente estudo avaliou a sensibilidade “in vitro” de 27 linhagens de *P. zopfii* isoladas do leite de vacas no Brasil frente a diferentes antimicrobianos e anti-sépticos, aliado a caracterização genotípica dos isolados. Nistatina (100,0%) e gentamicina (66,7%) foram as drogas mais efetivas para as 27 linhagens estudadas. A multi-resistência a três ou mais antimicrobianos foi observada em 100,0% das estirpes, principalmente frente a ampicilina, cefoperazona, cloxacilina, enrofloxacina, florfenicol, neomicina e tetraciclina. Hipoclorito de sódio (0,03-0,15%) e iodo (0,15-0,62%) revelaram efetividade “in vitro” para todos os isolados em baixas concentrações. A caracterização genotípica pela técnica de PCR baseada no fragmento 18S rDNA mostrou similaridade à cepa controle de *P. zopfii* SAG 2021^T, caracterizando todos os isolados como pertencentes ao genótipo 2. O presente estudo descreve pela primeira vez no Brasil, a caracterização genotípica de linhagens de *P. zopfii* isoladas de leite obtido de vacas com mastite clínica, subclínica e de tanque de expansão.

Palavras-chave: Genótipo; leite bovino; mastite; *Prototheca zopfii*; prototecose; sensibilidade microbiana.

SALERNO, T. **Genotypic characterization of *Prototheca zopfii* strains isolated from bovine milk and “in vitro” antimicrobial and anti-septic susceptibility.** Botucatu, 2007. 101p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

In last years, *Prototheca zopfii* has been considered one of the most important causes of mastitis from environmental origin, refractory to conventional therapy. The mammary infections caused by *Prototheca zopfii* lead to severe alterations in composition of the milk, and reduction in production. The present study evaluate the "in vitro" antimicrobials and anti-septic susceptibility, of 27 *P. zopfii* strains isolated from milk in cattle raised in Brazil, allied to the genotypic characterization of isolates. Nystatin (100.0%) and gentamicin (66.7%) were the most-effective drugs for 27 *P. zopfii* strains. Multiple drug resistance for three or more antimicrobials was observed in 100.0% of strains predominantly for ampicillin, cefoperazone, cloxacillin, enrofloxacin, florfenicol, neomycin e tetracycline. Sodium hypochlorite (0.03-0.15%) and iodine (0.15-0.62%) revealed “in vitro” efficacy in all isolates in low concentrations. The genotypic characterization using PCR technique based on the 18S rDNA displayed similarity to the strain-control of *P. zopfii* SAG 2021^T characterizing all isolates belonging to the genotype 2. The present study describe by first time in Brazil the genotype characterization of *P. zopfii* strains isolated from milk, obtained in clinical and subclinical bovine mastitis and bulk tank milk.

mastite; *Prototheca zopfii*; Prototecose; sensibilidade microbiana.

Keywords: Genotype; milk bovine; mastitis; *Prototheca zopfii*; protothecosis; microbial susceptibility.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Prototheca* tem sido mundialmente associado a infecções no homem e em animais (TANIYAMA et al., 1994; LASS-FLÖRL & MAYR, 2007). O organismo foi primeiramente descrito por Wilhelm Krüeger, em 1894, identificado na seiva de árvores (KRÜEGER, 1894) e classificado como alga em 1913 (CHODAT, 1913). Lerche (1952) na Alemanha descreveu pela primeira vez casos de mastite bovina por *Prototheca zopfii* (*P. zopfii*). No mesmo ano, Mehnert demonstrou a alga nas fezes de suínos (VAN KRUININGEN, 1970).

Davies et al. (1964) relataram pioneiramente a doença no homem em lesão sub-cutânea progressiva podal. Posteriormente, diversas manifestações clínicas foram descritas incluindo bursite (NOSANCHUK & GREENBERG, 1973; NARYSHKIN et al., 1987), peritonite (GIBB et al., 1991; MELÓN et al., 2007), gastroenterite (SUDMAN, 1974; COSTA et al., 1995), entre outras apresentações sistêmicas (DAVIES et al., 1964; IACOVIELLO et al., 1992).

Em animais de companhia, a prototecose foi reconhecida como entidade nosológica em 1963, descrita em cão. Em felinos domésticos, o primeiro relato da enfermidade foi reportado em 1976 (KAPLAN et al., 1976). No Brasil, a doença em animal de companhia foi descrita somente em 2006, em cão com histórico de colite hemorrágica crônica (FARIAS et al., 2006).

A prototecose mamária bovina é reconhecida como a principal manifestação clínica em animais de produção (TANIYAMA et al., 1994; RADOSTITS et al., 2007). No Brasil, o primeiro relato da enfermidade ocorreu em 1989, diagnosticada em vacas com mastite no Estado do Mato Grosso do Sul (COSTA et al., 1999).

P. zopfii pode ser isolada das fezes e do ambiente de criação de suínos, embora pareça não apresentar patogenicidade para esta espécie (WEBER & ENDERS, 1993; ROESLER et al., 2003). Diferentemente dos bovinos, não há até o momento a descrição do acometimento da glândula mamária em outras espécies de animais de produção como: ovinos, caprinos, eqüinos e bubalinos.

A mastite, definida classicamente como inflamação da glândula mamária, é considerada uma das principais doenças que acometem animais de exploração

leiteira, acarretando diversos prejuízos econômicos decorrentes de alterações na composição físico-química e na celularidade do leite (SCHALM et al., 1971), queda na produção, gastos com medicamentos e assistência veterinária, descarte precoce de fêmeas e morte ocasional de animais, aliado à importância da enfermidade no contexto de saúde pública (COSTA et al., 1995).

A inflamação da glândula mamária em animais possui etiologia complexa, podendo resultar de processos traumáticos, fisiológicos, alérgicos e, principalmente, infecciosos. A mastite infecciosa é causada predominantemente por agentes de origem bacteriana e, secundariamente, por fungos, algas e vírus (WATTS, 1988), podendo manifestar-se sob as formas aguda, sub-aguda ou crônica. Além disso, a mastite também é classificada em clínica e subclínica com base na intensidade do processo inflamatório (SMITH, 1994).

A forma clínica caracteriza-se por queda acentuada na produção, alterações na composição e aspecto macroscópico do leite (presença de grumos, sangue, dessora, pus), acompanhada muitas vezes de manifestações na glândula mamária (edema, hiperemia, aumento da sensibilidade, presença de nódulos, abscessos) e/ou sistêmicas nos animais (decúbito, anorexia, febre, prostração, taquicardia, taquipnéia). Em contraste, a forma subclínica não provoca alterações macroscópicas no leite e na glândula mamária, acarretando queda da produção láctea (RADOSTITS et al., 2007).

Epidemiologicamente a mastite é subdividida em contagiosa ou ambiental de acordo com a origem da infecção e vias de transmissão. Na transmissão contagiosa a infecção ocorre predominantemente no momento da ordenha, enquanto na ambiental é adquirida no intervalo entre ordenhas, assim como no momento da ordenha (COSTA et al., 1997).

Em diferentes países tem-se destacado o aumento significativo na frequência de mastite bovina ocasionada por algas do gênero *Prototheca*, especialmente *P. zopfii* (CHEVILLE et al., 1984; TANIYAMA et al., 1994). No Brasil, o microrganismo é apontado nos últimos anos como um dos mais preocupantes agentes causais de mastite de origem ambiental, descrito praticamente em todos os Estados do país com importância na exploração de bovinos de leite, sob a forma de casos

esporádicos ou de surtos (LANGONI, 1992, RIBEIRO et al., 1998; COSTA et al., 2004; BUENO et al., 2006; YAMAMURA et al., 2007).

A infecção mamária bovina por *P. zopfii* desencadeia quadros de mastite clínica ou subclínica, com evolução para processos piogranulomatosos de difícil resolução tecidual (CHEVILLE et al., 1984), levando a alterações no tecido glandular mamário e destruição parcial ou total do parênquima glandular (LANGONI, 2003). Não existem até o momento protocolos terapêuticos efetivos ou que possuam reprodutibilidade de resultados nas infecções mamárias pelo gênero *Prototheca*. Diferentes estudos têm utilizado produtos químicos diversos na terapia da prototecose mamária (antimicrobianos, anti-sépticos e algicidas), com resultados pouco efetivos, ou no mínimo, controversos.

O insucesso terapêutico da prototecose mamária bovina utilizando antimicrobianos convencionais têm direcionado o controle e a profilaxia da enfermidade na adoção de boas práticas de ordenha, no diagnóstico periódico de mastite, na secagem dos animais acometidos, na ablação química do quarto mamário e/ou no descarte das fêmeas (RIBEIRO et al., 1998; COSTA et al., 2004).

Estudos recentes na Europa têm procurado caracterizar genotipicamente as linhagens de *P. zopfii* isoladas de animais, com vistas a contribuir no esclarecimento da virulência e da epidemiologia da prototecose, em especial nos mecanismos de transmissão da alga, que possam nortear ações de controle e profilaxia. Com base em estudos genotípicos, pesquisadores alemães propuseram a classificação de *P. zopfii* em três biotipos: I, II e III. O biotipo I predomina nas fezes, contaminando estábulos de bovinos (variantes RZI-1, RZI-2 e RZI-3), o biotipo II em linhagens isoladas de mastite bovina (variantes RZII-1, RZII-2 e RZII-3) e o biotipo III em estirpes isoladas do ambiente de criatórios de suínos (variantes RZIII-1 e RZIII-2) e de casos humanos de onicoprototecose (variante RZIII-3) (ROESLER et al., 2003; MÖLER et al., 2006). Recentemente, o mesmo grupo de pesquisadores, utilizando técnicas moleculares, demonstrou que *P. zopfii* biotipo III encontra-se filogeneticamente distante dos outros biotipos, reclassificando-o como uma nova espécie denominada *Prototheca blaschkeae* sp.

nov. (*P. blaschkeae*) [ROESLER et al., 2006]. No mesmo estudo foi proposto que os biotipos I e II fossem re-classificados em genótipos 1 e 2 (MÖLLER et al., 2006; ROESLER et al., 2006).

Considerando os prejuízos decorrentes da prototecose mamária em bovinos, da crescente ocorrência e disseminação de *P. zopfii* em rebanhos leiteiros, da ineficácia de protocolos terapêuticos contra a alga e da ausência de caracterização genotípica de estirpes isoladas no Brasil, o presente estudo objetivou caracterizar genotipicamente linhagens de *P. zopfii* isoladas do leite de vacas de propriedades leiteiras no Brasil e avaliar o efeito algicida, “in vitro”, de diferentes antimicrobianos e anti-sépticos frente aos isolados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ALGAS DO GÊNERO *Prototheca*

O termo alga foi proposto inicialmente por Lineau, em 1753, para designar microrganismos extremamente primitivos que começavam a despertar o interesse de pesquisadores quanto a sua biologia (BICUDO & MENEZES, 2006). Registros fósseis indicam que organismos similares às algas viveram há mais de três bilhões de anos, incluindo-as entre os organismos vivos mais primitivos do reino *Plantae* (BOLD & WYNNE, 1985; PORE et al., 1983).

As algas são, por vezes, conceituadas como vegetais inferiores, biologicamente simples, contendo clorofila e parede celular espessa composta por celulose (FRANK et al., 1969). No entanto, alguns pesquisadores afirmam que embora sejam capazes de realizar a fotossíntese, diferem das plantas principalmente quanto aos processos reprodutivos (BOLD & WYNNE, 1985). Quinn et al. (2005) definem algas como microrganismos eucarióticos, saprofíticos, contendo muitas vezes clorofila, capazes de realizar fotossíntese.

As algas do gênero *Prototheca* são microrganismos unicelulares, aclorofilados, ubíquos, sem capacidade fotossintética. Diversos autores postulam que o gênero *Prototheca* seria uma mutação das algas verdes do gênero *Chlorella* (TYLER et al., 1980; QUINN et al., 2005), uma vez que as espécies pertencentes a estes gêneros são morfológicamente semelhantes (BUTLER, 1954; PORE, 1972; QUINN et al., 2005).

2.1.1 Classificação Taxonômica

A taxonomia do gênero *Prototheca* ainda é controversa. Determinada linha de pesquisadores afirma que este gênero ocupa posição taxonômica intermediária entre algas e fungos, por apresentarem características morfológicas e reprodutivas

semelhantes às algas, embora possuam peculiaridades dos fungos, como a ausência de cloroplasto e nutrição heterotrófica (ARNOLD & AHEARN, 1972).

Rippon (1988) referiu que o gênero *Prototheca* foi classificado como alga por West em 1913, visto que os endosporos destes microrganismos são produzidos de forma idêntica à observada para as algas do gênero *Chlorella*.

Nas últimas décadas, estudos morfo-fisiológicos reconheceram cinco espécies do gênero: *P. zopfii*, *Prototheca wickerhamii* (*P. wickerhamii*), *Prototheca stagnora* (*P. stagnora*), *Prototheca filamenta* (*P. filamenta*) e *Prototheca moriformis* (*P. moriformis*) [ARNOLD & AHEARN, 1972].

Arnold & Ahearn (1972) desenvolveram um método para identificar as espécies do gênero *Prototheca*, fundamentado em testes de assimilação de carboidratos e de álcoois. Com base neste método bioquímico foi observado que determinadas espécies que haviam sido descritas anteriormente, incluindo *Prototheca ciferri*, *Prototheca portoricencis* e *Prototheca segbwema* possuíam o mesmo perfil de *P. zopfii* (KAPLAN, 1977). De maneira similar, Sudan & Kaplan (1973) utilizando a técnica de imunofluorescência verificaram que *P. moriformis*, bem como outras espécies previamente descritas, incluindo *Prototheca chlorelloides*, *Prototheca pastoriensis*, *Prototheca trispora*, *Prototheca ubrizsyi*, apresentavam estreita relação com *P. zopfii*, sendo prudente reagrupá-las em uma única espécie, *P. zopfii*.

Subsequentemente, o estudo da estrutura celular de *P. filamenta* permitiu sua reclassificação como pertencente ao reino *Fungi*, gênero *Sarcinosporon*, espécie *Sarcinosporon inkin* (NADAKAVUKAREN & MCCRACKEN, 1973; KING & JONG; 1975). Pore et al. (1977) ao estudarem a morfologia e fisiologia de *P. filamenta*, recomendaram nova designação de *Fissuricella filamenta*, propondo assim, um novo gênero. Em 1985, Pore reconheceu *P. zopfii*, *P. wickerhamii*, *P. stagnora* e *P. moriformis* como as espécies de importância do gênero *Prototheca*.

Recentemente, com base em estudos moleculares e de assimilação de açúcares e álcoois, *P. zopfii* foi classificada em três biotipos (I, II e III) (ROESLER et al., 2003; MÖLER et al., 2006). Posteriormente, com o aprofundamento do estudo molecular, o biotipo III foi reclassificado como uma nova espécie

denominada *P. blaschkeae* e os biotipos I e II classificados respectivamente, como genótipos 1 e 2 (MÖLER et al., 2006; ROESLER et al., 2006).

Atualmente o gênero é classificado como pertencente ao reino *Viridiplantae* ou *Plantae*, família *Chlorellaceae* (ROESLER, 2007) (Quadro 1), contendo cinco espécies: *P. zopfii*, *P. wickerhamii*, *P. blaschkeae*, *P. stagnora* e *P. ulmea* (UENO et al., 2002; ROESLER et al., 2006; RANJAN et al., 2006), das quais as duas primeiras reconhecidamente patogênicas para o homem e animais.

Quadro 1 – Classificação taxonômica do gênero *Prototheca**.

<i>Eukariota</i> (Domínio)
<i>Viridiplantae</i> (Reino)
<i>Chlorophyta</i> (Filo)
<i>Trebouxiophyceae</i> (Classe)
<i>Chlorellales</i> (Ordem)
<i>Chlorellaceae</i> (Família)
<i>Prototheca</i> (Gênero)
<i>P. zopfii</i> , <i>P. wickerhamii</i> , <i>P. blaschkeae</i> , <i>P. stagnora</i> e <i>P. ulmea</i> (Espécies)

* Adaptado de Roesler, 2007.

2.1.2 Propriedades Gerais

Prototheca spp são algas unicelulares, aeróbias, imóveis. Em tecidos ou em meios de cultura apresentam-se esféricas a ovaladas, com diâmetro variável entre 3 a 30 µm, de acordo com a espécie, estágio de desenvolvimento e meio de cultura utilizado. Possui citoplasma basofílico granular, contendo um ou vários vacúolos e pequeno núcleo central que pode não ser observado em formas imaturas. Apresentam mitocôndrias aparentemente restritas à porção periférica do citoplasma, corpúsculos lipídicos, nucléolo, complexo de Golgi e retículo endoplasmático (CHEVILLE et al., 1984; PORE, 1985).

A parede celular é hialina com aproximadamente 0,5µm de espessura (ACHA & SZYFRES, 2001) que se distingue das demais, como no gênero *Chlorella* , por

possuir duas camadas de esporopolenina (polímeros e/ou ésteres carotenóides) não contendo quitina e celulose. Certas espécies contêm cápsula de mucopolissacarídeo, comum em algas verdes e/ou em plantas superiores (ATKINSON et al., 1972).

Quando cultivadas em ágar Sabouraud dextrose, mantidas em condições de aerobiose a 37°C, as colônias de *P. zopfii* apresentam-se planas, de tonalidade branco-amarelada, com 3 a 6 mm de diâmetro, mostrando bordas e superfície irregulares (PORE, 1985; BEXIGA et al., 2003; RANJAN et al., 2006). Em ágar sangue ovino ou bovino (5%) desfibrinado, em condições de aerobiose a 37°C, após 48 horas de incubação mostram colônias de 2 a 4 mm de diâmetro, não hemolíticas, rugosas, de tonalidade acinzentada (BEXIGA, et al., 2003). *P. wickerhamii* forma colônias hemisféricas regulares com superfície mucóide, enquanto *P. stagnora* apresenta colônias planas, com margem regular e superfície mucóide (PORE, 1985).

As diferentes espécies de *Prototheca* reproduzem-se assexuadamente por septação interna, também denominada endosporulação (PORE, 1985). Este processo origina a formação de esporangiosporos (células-filhas) no interior do esporângio (célula-mãe). Joshi et al. (1975) utilizando a microscopia eletrônica observaram que a cada 5-6 horas, na presença de nutrientes adequados, as células vegetativas multiplicam-se e, durante o processo de maturação celular, o citoplasma da célula-mãe sofre clivagens irregulares. São originadas de 2 a 20 endosporos ou esporangiosporos, que sintetizam suas próprias paredes e se desenvolvem para formar o esporângio. A célula-mãe acaba se rompendo e libera células-filhas que repetem o ciclo reprodutivo (PADHYE et al., 1979; PORE, 1985; QUINN et al., 2005).

As células “dauer” (“células em descanso”) ou hipnosporos foram descritas por Wilhelm Krüger, em 1984, apresentando características distintas dos esporângios e esporangiosporos. Possuem tamanho intermediário entre estas células, contendo parede espessa e grande quantidade de depósito de nutrientes de reserva, como lipídios e amido. Mediante condições adequadas de nutrientes, temperatura e oxigênio, os hipnosporos modulam-se em células vegetativas que,

em condições nutricionais e de tensão de oxigênio, iniciam o ciclo reprodutivo (KRÜGER, 1984; PORE, 1985).

Os esporângios de *P. wickerhamii* são esféricos, medindo 3 a 10 µm de diâmetro, enquanto os de *P. zopfii* são geralmente ovais, alongados ou esféricos, com 7 a 30 µm de diâmetro (PORE, 1985; LASS-FLÖRL & MAYR, 2007). Outra característica de *P. wickerhamii* é que o esporângio apresenta a forma de mórula, com endosporos arranjados simetricamente, enquanto que outras espécies como *P. zopfii* não apresentam estruturas de septações múltiplas (LASS-FLÖRL & MAYR, 2007). *P. stagnora* apresenta morfologia esférica, medindo 7 a 14 µm de diâmetro, e cápsula com 1 a 5 µm de espessura (PORE, 1985).

A morfologia da alga pode ser avaliada utilizando diferentes métodos tintoriais, incluindo as colorações de Gram (TYLER et al., 1980; RIBEIRO et al., 1998), Giemsa, panótico (RIBEIRO et al., 1998), Shör, hematoxilina-eosina (HE) [CORBELLINI et al., 2001], azul de algodão, tinta nanquim (CHEVILLE et al., 1984) e ácido periódico de Schiff (PAS) [CHAO et al., 2002]. O estudo morfotintorial da alga revela microrganismos ovais e cilíndricos, com cápsula bem definida, contendo número variável de endosporos, bem delimitados pela coloração de Giemsa (RIBEIRO et al., 1998).

As espécies do gênero *Prototheca* são heterotróficas utilizando glicose como fonte de carbono orgânico e nitrogênio, além de sais inorgânicos (sais de amônio). Necessitam de oxigênio e tiamina para a multiplicação (PORE, 1985). São diferenciadas utilizando testes de assimilação de carboidratos e álcoois (ARNOLD & AHEARN, 1972; ROESLER et al., 2001).

Ao estudarem as características fisiológicas do gênero, Arnold & Ahearn (1972) verificaram diferentes padrões de assimilação entre as espécies de *Prototheca*. *P. zopfii* assimila o propanol, mas não assimila a trealose e a sacarose. *P. wickerhamii* utiliza trealose, porém não assimila a sacarose e o propanol. *P. stagnora* assimila a sacarose tardiamente, mas não assimila a trealose e o propanol (KAPLAN, 1977; ROESLER et al., 2001).

A sensibilidade “in vitro”, frente ao clotrimazol permite diferenciar, de maneira simples, as espécies *P. wickerhamii* de *P. zopfii*, visto que linhagens da primeira

são sensíveis a este antimicrobiano (CASAL & GUTIERREZ, 1983). No entanto, o diagnóstico definitivo das espécies deve ser fundamentado na assimilação de açúcares e álcoois (RIBEIRO et al., 1998).

Prototheca spp toleram ampla variação de pH (PORE et al., 1983) e apresentam multiplicação à temperatura ambiente (25 a 30°C) e à 37°C, exceto *P. stagnora* que se desenvolve em temperatura ambiente, mas tem a multiplicação limitada ou inibida à 37°C (KAPLAN, 1977). As principais características microbiológicas e bioquímicas utilizadas na rotina diagnóstica para diferenciação das cinco espécies de *Prototheca* estão apresentadas no Quadro 2.

Quadro 2 – Principais características morfológicas e bioquímicas utilizadas na diferenciação das espécies de *Prototheca****.

Propriedades	<i>P. zopfii</i>	<i>P. wickerhamii</i>	<i>P. stagnora</i>	<i>P. ulmea</i>	<i>P. blaschkeae</i>
Tamanho celular (µm)	7 – 30	3 – 10	7 – 14	NI	NI
Tamanho médio dos endosporos (µm)	6,5	3,2	3,5	NI	NI
Glicose	+	+	+	+	+
Galactose	(+/-)	+	+	-	+
Sacarose	-	-	+**	NT	NT
Trealose	-	+*	-	-	-
Maltose	+*	-	+*	-	NT
Frutose	+	+	+	-	NT
Lactose	V	V	V	-	NT
N-propanol	+	-	+	-	NT
Etanol	+	+	NT	NT	NT
Glicerol	+	+	V	NT	-
Produção de cápsula	-	-	+	+	-
Multiplicação à 37°C	+	+	-	NT	+
Sensibilidade ao clotrimazol	-	+	+	NT	NT

+: positiva; +*: positiva em até 7 dias; +**: positiva em até 14 dias; -: negativa; (+/-): positiva para *P.zopfii* genótipo 1 e negativa para *P. zophii* genótipo 2; NI: não informado; NT: não testado; V: variável. ***Adaptado de Poyton & Branton, 1972; Pore, 1985; Roesler et al., 2001; Lass-Flörl & Mayr, 2007

2.2 INFECÇÕES POR *Prototheca* spp NOS ANIMAIS E NO HOMEM

Embora as algas pertencentes ao gênero *Prototheca* sejam consideradas saprófitas, ao longo dos anos, a prototecose tem sido reportada no homem e em diversas espécies de animais domésticos e silvestres incluindo bovinos, suínos, cães, gatos, coelhos, ratos, cervos, serpentes, peixes, castores e quirópteros (TYLER et al., 1980; PORE et al., 1983; HOLLINGSWORTH, 2000), demonstrando ser organismo de amplo espectro de infecciosidade e também de potencial zoonótico. As espécies comumente envolvidas em infecções tanto no homem como nos animais são *P. zopfii* e *P. wickerhamii* (RIPPON, 1988; IACOVIELLO et al., 1992).

2.2.1 Mastite Bovina por *Prototheca* spp

P. zopfii é, seguramente, a principal espécie do gênero *Prototheca* que acomete os bovinos. Embora estejam descritos casos de prototecose bovina com manifestações sistêmicas, como linfadenite (MIGAKI et al., 1969; ROGERS, 1974; TANYIAMA et al., 1994) e enterite (MIGAKI et al., 1969; ROGERS, 1974; COSTA et al., 2000b), a principal manifestação nesta espécie é a infecção da glândula mamária. A prototecose mamária assume grande importância na pecuária leiteira pelos prejuízos econômicos desencadeados com a queda na produção, alterações na qualidade do leite, perda da capacidade funcional glandular e descarte prematuro de fêmeas (LERCHE, 1952, MCDONALD et al., 1984b; AALBAEK et al., 1994).

2.2.1.1 Etiologia

P. zopfii, *P. wickerhamii*, *P. stagnora*, *P. blaschkeae* e *P. ulmea* são reconhecidas como as principais espécies do gênero *Prototheca* (UENO et al.,

2002; ROESLER et al., 2006). No entanto, somente *P. zopfii* e *P. wickerhamii* estão associadas à prototecose mamária bovina (PORE, 1985).

Em anos recentes, estudos de caracterização genotípica têm demonstrado que linhagens de *P. zopfii* biotipo II (genótipo 2) predominam na mastite bovina (ROESLER et al. 2003).

2.2.1.2 Epidemiologia

Desde o primeiro relato em 1952, a prototecose bovina vem sendo registrada de forma crescente nos continentes Europeu, Americano e Asiático (Quadro 3).

Quadro 3 – Principais descrições da prototecose mamária bovina em diferentes países dos continentes Europeu, Americano e Asiático.

Países	Agente Etiológico	Referência
Alemanha	<i>P. zopfii</i>	Lerche, 1952
Estados Unidos	<i>Prototheca</i> spp	Frank et al., 1969
Canadá	<i>Prototheca</i> spp	Bodenhoff & Madsen, 1978
Canadá	<i>P. zopfii</i>	Dion, 1979
Estados Unidos	<i>P. zopfii</i>	Cheville et al., 1984
Estados Unidos	<i>P. zopfii</i>	McDonald et al., 1984a
Nova Zelândia	<i>P. zopfii</i>	Hodges et al., 1985
Reino Unido	<i>P. zopfii</i>	Spalton, 1985
Israel	<i>P. zopfii</i>	Kuttin et al., 1986
Estados Unidos	<i>P. zopfii</i>	Pore et al., 1987
Estados Unidos	<i>Prototheca</i> spp	Anderson et al., 1988
Japão	<i>Prototheca</i> spp	Furuoka, et al., 1989
Canadá	<i>Prototheca</i> spp	Higgins & Larouche, 1989
Iraque	<i>Prototheca</i> spp	Shnawa & Al-Sadi, 1990
Panamá	<i>Prototheca</i> spp	Tarte et al., 1991
Romênia	<i>Prototheca</i> spp	Ognean, et al., 1992
Alemanha	<i>Prototheca</i> spp	Wihelm et al., 1992
Dinamarca	<i>P. zopfii</i>	Aalbaek, 1994
México	<i>Prototheca</i> spp	Almeraya, 1994
México	<i>Prototheca</i> spp	Porras, 1994
Bélgica	<i>P. zopfii</i>	Lagneau, 1996
Índia	<i>Prototheca</i> spp	Katoch et al., 1997
Dinamarca	<i>P. zopfii</i>	Jensen, et al., 1998
Hungria	<i>P. zopfii</i>	Jánosi et al., 2000
Espanha	<i>P. zopfii</i>	Abacara et al., 2001
Taiwan	<i>P. zopfii</i>	Chuang et al., 2002
Polônia	<i>P. zopfii</i>	Malinowsky et al., 2002
Portugal	<i>P. zopfii</i>	Bexiga et al., 2003
Itália	<i>P. zopfii</i>	Buzzini et al., 2004

No Brasil, a prototecose bovina foi diagnosticada primeiramente no Estado do Mato Grosso do Sul, em 1989, em vaca holandesa com mastite clínica (Costa et al., 1989^{*}). Posteriormente, foi descrita por diversos autores, com destaque para as regiões sudeste, sul e centro-oeste do país (Quadro 4). Em dias atuais, considera-se que *Prototheca* spp assumam importância como agente causal de mastite de origem ambiental, para praticamente todos os Estados da Federação com destaque na exploração de bovinos de leite.

Quadro 4 – Principais descrições da prototecose mamária bovina no Brasil.

Estado	Agente Etiológico	Referência
Mato Grosso do Sul	<i>Prototheca</i> spp	Costa et al., 1989 [*]
São Paulo	<i>Prototheca</i> spp	Costa et al., 1992
São Paulo	<i>Prototheca</i> spp	Langoni, 1992
São Paulo	<i>Prototheca</i> spp	Costa et al., 1994
São Paulo	<i>P. zopfii</i>	Langoni et al., 1995
São Paulo	<i>Prototheca</i> spp	Costa et al., 1996 a, b e c
São Paulo	<i>P. zopfii</i>	Costa et al., 1997
São Paulo	<i>Prototheca</i> spp	Langoni, 1997
Minas Gerais	<i>P. zopfii</i>	Brito & Veiga, 1997
São Paulo	<i>Prototheca</i> spp	Costa et al., 1998
São Paulo	<i>P. zopfii</i>	Ribeiro et al., 1998
Rio Grande do Sul	<i>P. zopfii</i>	Vargas et al., 1998
São Paulo	<i>P. zopfii</i>	Benites et al., 1999
São Paulo	<i>P. zopfii</i>	Costa et al., 1999
Paraná	<i>P. zopfii</i>	Filippsen et al., 1999
Rio Grande do Sul	<i>P. zopfii</i>	Gomes, et al., 1999
São Paulo	<i>Prototheca</i> spp	Costa et al., 2000a
São Paulo e Minas Gerais	<i>Prototheca</i> spp	Costa et al., 2000b
Rio Grande do Sul	<i>P. zopfii</i>	Corberllini et al., 2001
São Paulo	<i>P. zopfii</i>	Costa et al., 2001
São Paulo	<i>P. zopfii</i>	Costa et al., 2004
Santa Catarina	<i>Prototheca</i> spp	Vaz et al., 2005
Goiás	<i>P. zopfii</i>	Bueno et al., 2006
Minas Gerais	<i>P. zopfii</i>	Costa et al., 2007
Paraná	<i>Prototheca</i> spp	Yamamura et al., 2007

As algas do gênero *Prototheca* são organismos ubíquos, presentes preferencialmente no solo, nos esgotos, em lagos, no limo de árvores, em matéria

^{*} Costa, E.O. (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP). Comunicação pessoal, 1989 apud Melville, 1995.

orgânica, nas fezes ou locais com excesso de umidade (MCDONALD et al., 1984a).

O microrganismo possui elevada resistência às condições ambientais adversas, visto que algumas estirpes podem ser isoladas em locais com pH extremamente variável (3 e 11) e em água contaminada (PORE et al., 1983). Também podem resistir a altas temperaturas, incluindo os processos de pasteurização lenta e rápida, conforme observado por Melville et al. (1995).

A mastite bovina por *Prototheca* spp é classificada como ambiental. As propriedades acometidas usualmente apresentam histórico de condições inadequadas de manejo, higiene dos animais e/ou da ordenhadeira - que incluem falhas na realização do pré e pós-dipping, não alimentação das vacas após ordenha, permanência de animais em locais com acúmulo de barro e matéria orgânica (COSTA et al., 1998) -, deficiências no diagnóstico periódico de mastite no rebanho, incorreta anti-sepsia na terapia intramamária, além de pouco cuidado no exame de saúde da glândula mamária em animais recém-adquiridos. Neste contexto, Ribeiro et al. (1999) reportaram a ocorrência de grave prototecose mamária em fêmea bovina recém adquirida em leilão tradicional no município de São Paulo. Os autores alertaram no estudo para a importância do exame prévio e minucioso da glândula mamária em animais adquiridos em leilões, exposições, feiras ou outros eventos desta natureza, com vistas a diminuir os riscos de introdução de patógenos de glândula mamária no rebanho.

Corbellini et al. (2001) verificaram a ocorrência do microrganismo em rebanhos de vacas de produção leiteira nas quais o tratamento intramamário foi realizado em condições higiênicas inadequadas e que apresentavam falhas na rotina de ordenha.

Ribeiro (2001) observou nos Estados de São Paulo e Minas Gerais, maior ocorrência de *Prototheca* spp em rebanhos leiteiros em períodos chuvosos (primavera/verão), quando comparado ao período das secas (outono/inverno), aventando que os períodos do ano com maiores índices pluviométricos e umidade favoreceriam a transmissão e ocorrência da prototecose mamária bovina.

Pore et al. (1983) afirmaram que a principal forma de veiculação da alga do ambiente para os animais seria mediante traumatismos e contaminação de ordenhadeiras. Posteriormente foi observado que a transmissão do microrganismo em propriedades com exploração de leite bovino ocorre predominantemente por via ascendente, pelo canal do teto (COSTA et al., 1997), por intermédio das fezes, água, fômites contaminados (cânulas intramamárias) e ocasionalmente, veiculados por insetos (PORE et al., 1983).

Costa et al. (1992) isolaram *Prototheca* spp das fezes de bezerros que receberam experimentalmente a alga por via oral, em solução fisiológica e em leite. Neste estudo, foi ressaltada a importância dos bezerros na cadeia epidemiológica da prototecose bovina, apontados também como responsáveis na transmissão da enfermidade, mediante a eliminação fecal do agente no meio ambiente.

A presença de *P. zopfii* no intestino de tilápias (*Tilapia niloticus*) capturados em açudes de propriedades leiteiras que apresentam a enfermidade em bovinos, alertam para a possibilidade destes peixes contribuírem na disseminação da infecção, através da eliminação da alga pelas fezes em lagos e açudes de propriedades rurais vizinhas (COSTA et al., 2001), favorecendo a contaminação da água utilizada para o consumo dos animais ou na higiene da ordenha.

2.2.1.3 Patogenia

Independente do microrganismo envolvido, a infecção da glândula mamária pelo gênero *Prototheca* ocorre usualmente pela via ascendente (canal do teto), com posterior colonização do tecido glandular (SMITH, 1994).

A infecção mamária por *Prototheca* spp induz severa reação inflamatória (CHEVILLE et al., 1984) e as lesões encontram-se distribuídas irregularmente no parênquima mamário (CORBELLINI et al., 2001).

Histopatologicamente, na prototecose mamária é observada infiltração de linfócitos, macrófagos, neutrófilos e focos de eosinófilos no tecido conectivo interalveolar (JÁNOSI et al., 2001). Corbellini et al. (2001) destacaram também a

presença de neutrófilos e macrófagos no lúmen alveolar, contendo o microrganismo fagocitado, além de células gigantes em infiltrados intersticiais (JÁNOSI et al., 2001).

De acordo com Furuoka et al. (1989), as infecções intramamárias por *Prototheca* spp são caracterizadas por inflamação piogranulomatosa. Cheville et al. (1984) inocularam experimentalmente *P. zopfii* em glândulas mamárias de vacas sem mastite, no intuito de avaliar a resposta imune celular frente à alga. Observaram que no interior dos fagócitos as algas apresentavam núcleo proeminente, com grande nucléolo e quantidade de amido no citoplasma. Em estágios mais avançados verificaram que o microrganismo apresentava fragmentação das membranas plasmática e nuclear, com redução da massa citoplasmática. As linhagens de *P. zopfii* em infecções tardias apresentavam ausência de organelas citoplasmáticas. Diante destes achados, os autores concluíram que as algas deste gênero provavelmente não se replicam intracelularmente, e que os macrófagos iniciam a fagocitose, porém, não conseguem destruí-la totalmente, possivelmente por não romperem sua parede celular, embora possam lisar as organelas internas. Roesler & Hensel (2003) afirmaram que a habilidade do microrganismo em manter-se viável no interior de macrófagos, possibilita ao gênero *Prototheca* induzir infecções mamárias crônicas, com persistente eliminação pelo leite.

Linfadenite serosa aguda e infiltração eosinofílica também são achados histopatológicos em linfonodos supramamários de vacas com prototecose. Focos circunscritos de necrose, atrofia alveolar e proliferação fibroblástica são observados em quadros crônicos. A infiltração de células mononucleares apresenta-se mais pronunciada se comparada às alterações provocadas por bactérias, ocorrendo a formação de microgranulomas secundários às infecções pelo gênero *Prototheca* (JÁNOSI et al., 2001).

No Brasil, Benites (1999) avaliou histopatologicamente o tecido glandular de vacas com prototecose, caracterizando o processo inflamatório por infiltrado misto, com predominância de células mononucleares (macrófagos, plasmócitos e linfócitos) no estroma glandular e eosinófilos no lúmen alveolar.

2.2.1.4 Clínica

A infecção mamária por *P. zopfii* desencadeia quadros de mastite clínica ou subclínica, aguda ou crônica, das quais a mastite crônica é considerada a forma predominante (CHEVILLE et al., 1984; GONZÁLEZ et al., 1998). Provoca alterações severas no tecido glandular mamário, levando a destruição parcial ou total do parênquima glandular (LANGONI, 2003).

Melville (1995) ao avaliar 1.922 glândulas mamárias de vacas com mastite clínica e 10.918 com mastite subclínica, observou que 178 (9,26%) e 129 (1,18%), respectivamente, apresentavam-se infectadas por *Prototheca* spp, reiterando que as infecções mamárias pela alga manifestam-se principalmente sob a forma de mastite clínica.

A mastite causada por *Prototheca* spp acarreta queda na produção láctea, endurecimento da glândula mamária, presença de grumos e flocos no leite, ocorrendo em um ou mais quartos mamários, na lactação ou no período seco, geralmente sem manifestações sistêmicas nos animais. Pode evoluir para processos piogranulomatosos, levando em muitos casos, a perda da função da glândula acometida (SPALTON, 1985). Alterações na composição do leite também são observadas, havendo expressiva redução nos teores de lactose, caseína, gordura e sólidos totais (JÁNOSI et al., 2001), além do aumento da celularidade.

2.2.1.5 Métodos Diagnósticos

O histórico de infecção mamária crônica no rebanho, com alta ocorrência de mastite clínica, baixa efetividade no tratamento intramamário, excesso de matéria orgânica no ambiente, uso indevido de antimicrobianos via intramamária, queda acentuada na produção, negligência no exame de saúde da glândula mamária em animais recém-adquiridos no plantel, ausência de diagnóstico microbiológico em animais com mastite e/ou elevada contagem de células somáticas (CCS), são achados clínico-epidemiológicos sugestivos de mastite por microrganismos ambientais, incluindo *P. zopfii*. No entanto, o diagnóstico definitivo deve ser

firmado com base no isolamento microbiano e identificação bioquímica dos microrganismos.

O isolamento da alga pode ser obtido utilizando cultura em ágar sangue ovino ou bovino (5%) desfibrinado, mantido em condições de aerobiose, a 37°C. Após 48 a 72 horas são observadas colônias de 2 a 4 mm de diâmetro, rugosas, com coloração acinzentada, sem produção de hemólise para *P. zopfii*, e colônias hemisféricas regulares com superfície mucóide para *P. wickerhamii* (PORE, 1985; BEXIGA et al., 2003; RANJAN et al., 2006). Em ágar MacConkey as colônias são pequenas ou não se desenvolvem (RIBEIRO et al., 1998).

Meios de cultura que contenham glicose, como o ágar Sabouraud dextrose, são apropriados para o cultivo microbiano de *Prototheca* spp entre 25 à 37°C, em aerobiose. Ao redor de 2 a 7 dias, são observadas colônias de 3 a 6 mm de diâmetro, brancas, planas, com bordas irregulares e superfície rugosa (PORE et al., 1983; COSTA et al., 1997). No entanto, bactérias e fungos contaminantes podem sobrepujar o isolamento das colônias de *Prototheca* spp, dificultando o diagnóstico. Para suprimir o efeito de contaminantes bacterianos, podem ser adicionados ao meio 100 mg/L de cloranfenicol (COSTA et al., 1997).

Os meios de enriquecimento de *Prototheca* (PEM) e de isolamento de *Prototheca* (PIM), também possuem substâncias inibitórias (5-fluorocitosina) e podem ser utilizados para o isolamento seletivo das algas dos gêneros *Prototheca* e *Chlorella*. Recomenda-se que amostras de leite coletadas de tanques de expansão ou mesmo de tanques isotérmicos de caminhões sejam cultivadas no meio PEM (PORE et al., 1987). Amostras de ambiente como água e fezes, além de superfícies de teteiras, também podem ser utilizadas para o isolamento da alga em rebanhos leiteiros, com vistas a identificar a origem da contaminação (COSTA et al., 1997).

As colônias sugestivas da alga deverão ser submetidas às provas morfotintoriais e bioquímicas, assimilação de açúcares e álcoois, visando a diferenciação das espécies de *Prototheca* (JÁNOSI et al., 2001). A diferenciação de *P. wickerhamii* e *P. zopfii* pode ser obtida submetendo estas espécies ao teste de sensibilidade “in vitro” frente a discos impregnados com 50µg de clotrimazol,

que resulta na sensibilidade de *P. wickerhamii* ao antimicrobiano (CASAL & GUTIERREZ, 1983; ROESLER et al., 2001; QUINN et al, 2005).

A observação da morfologia microscópica pode ser realizada com preparações a fresco, coradas com tinta nanquim ou azul de algodão (COSTA et al., 1999). Langoni et al. (1995) recomendam também esfregaços da cultura corados por Gram ou azul de metileno a 3% para a visualização da alga à microscopia. Preparações citológicas podem ser coradas pelos métodos de Gram, Giemsa, Shör, HE, grindley e grocotts, possibilitando a identificação da alga em qualquer estágio de desenvolvimento (CORBELINNI et al., 2001). A coloração de Gram revela microrganismos de tonalidade azulada. Em contraste, exames citológicos corados por HE mostram o organismo com parede refringente, de coloração eosinofílica (TYLER et al., 1980), com citoplasma pouco corado e septações internas (CHAO et al., 2002; ZAITZ et al., 2006a).

Cortes histológicos da glândula mamária também são utilizados no diagnóstico (JÁNOSI et al., 2001). Porém, de acordo com Sudman & Kaplan (1973), a alga é facilmente reconhecida quando os endosporos estiverem visíveis. Do contrário, poderão ser confundidas com fungos dos gêneros: *Paracoccidioides*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Blastomyces*, *Rhinosporidium* e com o protozoário do gênero *Pneumocystis*.

Em 1999, a citologia aspirativa com agulha fina – CAAF foi utilizada pela primeira vez no Brasil com o intuito de diagnóstico de mastite bovina subclínica (DOMINGUES et al., 1999). Estudos subseqüentes utilizaram o método de CAAF, associado a microscopia eletrônica de varredura, no diagnóstico de infecção mamária em bovinos por *P. zopfii*. A CAAF do parênquima mamário apresentou como características o baixo custo e reduzida agressão tecidual, permitindo diagnóstico rápido e acurado em casos de mastite bovina pela alga (RIBEIRO et al., 1999).

Adicionalmente, Thiele & Bergmann (2002) utilizaram técnicas de imunofluorescência, tanto em cortes histológicos quanto em lâminas, no diagnóstico da prototecose.

Nos últimos anos, testes sorológicos como o ELISA (“Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”) foram desenvolvidos no intuito de identificar anticorpos anti-*P. zoppii* no sangue e leite de animais acometidos. A eficácia do ELISA na identificação de animais infectados foi de 96% de sensibilidade e 94% de especificidade, sugerindo a possibilidade de uso da técnica na rotina diagnóstica (ROESLER et al. 2001).

A microscopia eletrônica de varredura ou transmissão são métodos de uso restrito, em virtude do custo elevado e carência de laboratórios que mantém a técnica na rotina. Entretanto, o método possibilita a confirmação diagnóstica e a visualização em detalhe das diferentes fases de reprodução da alga (BERROCAL et al., 1997; COSTA et al., 2004).

Recentemente, as técnicas de diagnóstico molecular como o sequenciamento genético e o PCR foram utilizados na prototecose bovina, visando caracterizar biotipos e genótipos, notadamente no estudo de *P. zoppii* (MÖLLER et al., 2006; ROESLER et al., 2006). No entanto, não estão disponíveis no Brasil estudos de caracterização genotípica de linhagens do gênero *Prototheca* isoladas de animais, tampouco do homem.

2.2.1.6 Tratamento e Resistência Microbiana

Não existem, até o momento, protocolos terapêuticos efetivos para a prototecose mamária bovina. Tendo em vista que o animal infectado constitui risco potencial para o plantel, o controle da enfermidade em rebanhos leiteiros repousa no diagnóstico precoce, cuidados na re-introdução de animais adquiridos, adoção de medidas higiênicas na ordenha, ablação química de quartos afetados, ou mesmo o descarte de animais acometidos (RIBEIRO et al., 1998; COSTA et al., 2004).

Embora determinados antimicrobianos apresentem certa efetividade “in vitro”, os resultados “in vivo” são pouco efetivos (FRANK et al., 1969). Além disso, muitos princípios ativos que se mostram efetivos “in vitro” não estão disponíveis para o uso veterinário, especialmente por via intramamária (JÁNOSI et al., 2001).

Bodenhoff & Madsen (1978) verificaram moderada sensibilidade “in vitro” de linhagens do gênero *Prototheca* à estreptomicina, gentamicina e polimixina B. Porém, no mesmo estudo, os autores assinalaram que a alga foi resistente a maioria dos antimicrobianos utilizados na prática veterinária.

A sensibilidade “in vitro” de cinco estirpes de *P. zopfii*, cinco de *P. wickerhamii* e uma estirpe de *P. stagnora* frente a 43 antimicrobianos foi investigada revelando maior efetividade da canamicina, gentamicina, neomicina, oxitetraciclina, polimixina B e terizidona. Linhagens de *P. zopfii* também mostraram-se sensíveis à oleandomicina, penicilina, sulfaguanidina, sulfadiazina, nitrofurazona e nitrofurantoína (CAMARGO, 1978).

Mendes & Lacaz (1980) avaliaram a ação “in vitro” do cetoconazol sobre *Prototheca* sp e observaram que a concentração inibitória mínima do antimicrobiano foi de 160 µg/mL para *P. zopfii* e *P. wickerhamii*, e 80 µg/mL para *P. stagnora*. O perfil de sensibilidade de *P. wickerhamii* foi investigado utilizando 49 antimicrobianos. Tobramicina, sisomicina, ribostamicina, paromomicina, neomicina, polimixina B, canamicina, gentamicina, colistina, dibecamicina, framacetina e lividomicina foram as drogas que se mostraram mais efetivas (CASAL & GUTIEREZ, 1981).

O estudo da sensibilidade “in vitro” de 24 linhagens de *P. zopfii* frente a seis antifúngicos e dez quimioterápicos revelou efetividade para os seguintes antimicrobianos: nistatina, econazol, miconazol, anfotericina B, mandelamina e nitro-5-hidroxi-8-quinoleína (CASAL & AROCA, 1983). McDonald et al. (1984b) avaliaram 48 estirpes de *P. zopfii* isoladas de infecções intramamárias, verificando sensibilidade “in vitro” de 100,0% das estirpes à nistatina e anfotericina B, 43,8% à polimixina B, 37,5% à gentamicina e 2,1% à canamicina.

A sensibilidade “in vitro” de 28 estirpes de *P. zopfii* isoladas de mastite clínica e subclínica, mostrou resistência das linhagens a diversos antimicrobianos, incluindo itraconazol, fluconazol, cetoconazol, clotrimazol, miconazol e tioconazol. Foi encontrada sensibilidade das estirpes somente para a anfotericina B (35,7%) e nistatina (21,4%) (MALINOWSKY et al., 2002).

Marques et al. (2006) relataram que a sensibilidade microbiana “in vitro” de *P. wickerhamii* frente à nistatina foi superior à anfotericina B. No mesmo estudo, observaram que *P. zopfii* apresentou sensibilidade semelhante frente a esses antimicrobianos.

O perfil de sensibilidade “in vitro” de 105 estirpes de *P. zopfii* frente a 25 antimicrobianos revelou sensibilidade parcial à amicacina (16,1%), gentamicina (17,1%) e netilmicina (20,0%), quando realizado em ágar Müller-Hinton. Entretanto, quando utilizado o ágar Sabouraud foi observado 100,0% de sensibilidade parcial dos microrganismos aos mesmos antimicrobianos e 29,5% para neomicina, 85,7% para polimixina B e 93,3% para tobramicina. Os demais antimicrobianos utilizados, como cloranfenicol, tetraciclina, oxacilina, penicilina, cefalotina, lincomicina, vancomicina, eritromicina, sulfazotrim, ampicilina, cefacetil, enrofloxacina, amoxicilina, cefoxitina, sulfonamina, ácido nalidíxico, clindamicina, carbenicilina e nitrofurantoína não mostraram efetividade para as 105 estirpes testadas (MELVILLE, 2000).

Em estudo “in vivo”, a utilização de miconazol e nistatina na terapia de vacas com inflamação da glândula mamária por *P. zopfii* não obteve êxito (VANDAMME, 1983).

Devido a grande resistência de *P. zopfii* aos antimicrobianos convencionais, diversas investigações envolvendo drogas anti-sépticas, algicidas, própolis e extrato de sementes de frutas cítricas têm sido ensaiadas experimentalmente “in vitro” e/ou “in vivo” com vistas à terapia da prototecose (BRITO et al., 1994; LANGONI et al. 1995; COSTA et al., 1996 b,c).

No Brasil, Brito et al. (1994) não obtiveram sucesso no tratamento de mastite por *Prototheca* spp utilizando soluções de desinfetantes preparadas com extrato de sementes de frutas cítricas a 50%, em solução de água destilada contendo 3% de timerosal. Diferentemente, Langoni et al. (1995) descreveram sucesso terapêutico em 84,8% de casos de mastite clínica bovina por *P. zopfii*, utilizando própolis intramamário a 10% em solução de dimetilsulfóxido a 20%.

Costa et al. (1996b) submeteram animais infectados por *Prototheca* spp à tratamentos intramamários em quatro glândulas utilizando timerosal, em solução

aquosa, associado à cefalosporina, obtendo 100,0% de cura microbiológica, mas sem melhora aparente do quadro clínico. Neste mesmo estudo, cinco quartos mamários foram tratados com nistatina, dos quais somente um apresentou cura clínica.

O uso “in vitro” de digluconato de clorexidine a 0,2% no meio de Müller-Hinton revelou aumento do halo de inibição em dez linhagens de *P. zopfii* utilizando gentamicina e amicacina (COSTA et al., 1996c).

Estudos “in vitro”, investigando a efetividade do dimetilsulfóxido (DMSO) e do fluconazol em meio Sabouraud frente a 29 estirpes de *P. zopfii* isoladas de mastite clínica e subclínica em vacas, revelaram apenas 37,9% de sensibilidade da alga ao fluconazol. No entanto, quando adicionado DMSO (5%) ao meio de Sabouraud, foi verificada inibição do isolamento de *P. zopfii* em 62,1% das linhagens estudadas (RIBEIRO et al., 2006).

Apesar dos diferentes princípios ativos utilizados em ensaios “in vitro” ou “in vivo” em linhagens do gênero *Prototheca*, não existe até o momento protocolo seguro e efetivo que possa ser indicado na terapia da prototecose mamária.

2.2.1.7 Profilaxia e Controle da Prototecose Mamária

A profilaxia e controle da prototecose mamária em rebanhos leiteiros têm se mostrado extremamente difícil, em virtude da baixa sensibilidade da alga às drogas convencionais, da alta disseminação ambiental do microrganismo e desenvolvimento de infecção persistente nos animais, tanto no decorrer da lactação, quanto no período seco (JÁNOSI et al, 2001). A escolha de um bom produto para a realização do pré e pós-dipping durante as ordenhas, associado a adoção de práticas higiênicas na ordenha e entre-ordenhas, controle sanitário dos animais recém-ingressos no rebanho e cuidados na terapia intramamária, tendem a minimizar os casos de mastite por *P. zopfii*.

2.2.1.7.1 Medidas Gerais de Profilaxia e Controle

A adoção de procedimentos corretos durante a ordenha e a manutenção de animais em ambiente limpo são medidas que contribuem para a profilaxia e controle da prototecose em rebanhos leiteiros (GOMES, 1999).

A qualidade da água utilizada na limpeza dos tetos, utensílios de ordenha e ordenhadeira deve ser levada em consideração no controle da mastite por *Prototheca* spp (PORE et al., 1983). A secagem dos tetos com papel toalha descartável e o esgotamento dos animais, evitando a sobreordenha, também auxiliam na prevenção da doença nos animais em lactação. Recomenda-se ainda, que seja fornecida alimentação imediatamente após a ordenha, forçando a permanência dos animais em pé até o completo fechamento do canal do teto (COSTA et al., 1999).

Entretanto, a refratariedade do gênero *Prototheca* às medidas terapêuticas convencionais, a tendência ao agravamento e cronicidade do processo, e a alta capacidade de disseminação da alga intra-rebanho, resultam na indicação da ablação química dos tetos acometidos ou descarte dos animais, em virtude de representarem prejuízo econômico e risco de novas infecções (RIBEIRO et al., 1999).

Costa et al. (1999) recomendam a cauterização química dos tetos com nitrato de prata 0,75%, nas vacas com um quarto afetado e o descarte de animais que possuam dois ou mais quartos acometidos. Em contraste, González (1998) afirmou que a medida mais eficaz para o controle de mastites por *Prototheca* spp é o descarte dos animais infectados. Recomenda-se que os quartos afetados sejam ordenhados por último, sendo o leite descartado devido ao risco de transmissão do patógeno ao homem e a outros animais (COSTA et al., 1992), assim como contaminação da ordenhadeira e utensílios de ordenha.

Além dessas medidas, faz-se necessário o monitoramento continuado de saúde da glândula mamária do rebanho, incluindo a realização diária do teste de Tamis (para a detecção dos casos de mastite clínica) e mensal do “California Mastitis Test” – CMT, para o diagnóstico da mastite subclínica, com vistas ao

encaminhamento do leite para o diagnóstico microbiológico precoce da prototecose, que possam minimizar os prejuízos nos rebanhos (COSTA et al., 1999).

Ribeiro et al. (1999) alertam para a necessidade da realização de análises microbiológicas do leite antes da aquisição de novos animais, em virtude da possibilidade da introdução do agente nos rebanhos, bem como o diagnóstico microbiológico periódico no plantel, especialmente em animais com mastite clínica, de evolução crônica.

O encaminhamento de material suspeito para cultura microbiológica ainda permanece como método mais confiável de diagnóstico da prototecose mamária em bovinos de exploração leiteira (RIBEIRO et al., 1999). Entretanto, a necessidade de 48-72 horas para o isolamento do microrganismo pode contribuir para o subdiagnóstico laboratorial, visto que os agentes usuais de mastite são isolados em sua grande maioria, com 24 horas de incubação. Portanto, recomenda-se que o leite de animais com mastite seja encaminhado para laboratórios de apoio veterinário, com vistas a favorecer o diagnóstico de patógenos de importância para animais incluindo o gênero *Prototheca*.

2.2.1.7.2 O Uso de Anti-Sépticos no Controle da Mastite

A limpeza e a desinfecção são métodos utilizados para prevenir a ocorrência de doenças (DOMINGUES & LANGONI, 2001).

A desinfecção consiste em controlar ou eliminar microrganismos indesejáveis utilizando agentes físicos ou químicos, genericamente denominados de “desinfetantes”, que geralmente são aplicados em objetos ou estruturas inanimadas. Estes compostos atuam na estrutura ou metabolismo de microrganismos eliminando as formas vegetativas, mas não necessariamente as formas esporuladas de determinados patógenos (DOMINGUES & LANGONI, 2001).

Anti-sepsia consiste no processo de desinfecção empregando geralmente substâncias químicas de propriedades menos tóxicas ou mais diluídas que

aquelas utilizadas em objetos inanimados (DOMINGUES & LANGONI, 2001). O termo anti-séptico deriva do grego e significa “contra putrefação”. Esta denominação utilizada especialmente para preparações aplicadas topicamente em tecidos vivos, visa fundamentalmente, prevenir ou interromper a multiplicação e/ou a ação deletéria dos microrganismos por destruí-los ou inibir suas atividades metabólicas (BLOCK, 1991). Usualmente a concentração destes produtos é baixa, para evitar lesões e irritação tecidual (HUBER et al., 1992).

Na mastite, a anti-sepsia dos tetos constitui ponto importante nas ações de profilaxia e controle da enfermidade em rebanhos leiteiros, visto que o ambiente, a ordenhadeira, os utensílios de ordenha, a pele do úbere e tetos, e as mãos dos ordenhadores são reservatórios primários dos patógenos. A utilização de anti-sépticos imediatamente antes da ordenha (“pré-dipping”) em baixas concentrações, tem sido preconizada como medida de controle da infecção da glândula mamária ocasionada por microrganismos de origem ambiental, visto que diminuem a contaminação dos tetos por fezes, terra e matéria orgânica. Já o “pós-dipping”, preconizado na imersão imediata dos tetos após a ordenha, utiliza anti-sépticos em concentração superior ao “pré-dipping”, e possui ação predominante no controle de microrganismos de mastite contagiosa (RIBEIRO, 1996).

A alta manipulação dos tetos na ordenha, a demora na oclusão do esfíncter do teto pós-ordenha e a presença de microrganismos contagiosos na pele do úbere, tetos e nas mãos dos ordenhadores, são fatores predisponentes que justificam o uso de anti-sépticos após a ordenha (“pós-dipping”), como medida simples, barata e eficaz no controle e profilaxia da mastite (RIBEIRO, 1999). A realização de pré e pós-dipping utilizando iodo, cloro, clorexidine ou quaternários de amônio contribuem para a redução de novas infecções (COSTA et al., 1999).

O iodo é um dos antimicrobianos mais antigos e eficientes. Foi utilizado pela primeira vez em 1939 com fins anti-sépticos em lesões humanas (GOTTARDI, 1991). Tanto na forma de tintura como iodóforo é reconhecido como efetivo anti-séptico e desinfetante. Apresenta amplo espectro de ação sobre bactérias na forma vegetativa, além da ação em fungos e vírus, penetrando rapidamente a parede celular dos microrganismos (PANKEY et al., 1984; GOTTARDI, 1991).

Diversos autores relatam sua eficácia como anti-séptico de uso em seres humanos e em animais (WESEN & SCHULTZ, 1970; NICKERSON et al., 1986; BODDIE et al., 1993). No “pré-dipping” usualmente é recomendado a 0,1% e no “pós-dipping” entre 0,5 a 1% (Ribeiro, 1999).

Fox et al. (1991) ao utilizarem iodóforo a 1%, associado a glicerina, observaram redução da colonização da glândula mamária por microrganismos contagiosos. Resultado semelhante na profilaxia da mastite bovina foi observado por Fox (1992) ao utilizar anti-sépticos como iodóforo a 1%, associado a glicerina a 10% e clorexidine a 0,5%, associado a glicerina a 4,8%.

Anti-sépticos que contém hipoclorito de sódio geralmente são preparados a partir de diluições de produtos comerciais utilizados para clarificar roupas. Possui baixo custo, boa ação germicida, porém tem a desvantagem de possuir forte odor (PANKEY et al, 1984). Deve ser mantido ao abrigo da luz solar, visto que elevadas temperaturas reduzem a estabilidade da solução. A presença de matéria orgânica diminui a capacidade bactericida (DOMINGUES & LANGONI, 2001). Possui baixa toxicidade, embora altas concentrações possam levar a irritação dos tetos e lesões nas mãos do ordenhador (PANKEY et al., 1984). A eficácia do hipoclorito como anti-séptico recomendável na pós-ordenha foi descrita inicialmente por Neave et al. (1969), Kingwill et al. (1970) e Drechsler et al. (1990). Como anti-séptico na pré-ordenha é utilizado entre as concentrações 0,8 a 1,2% e na pós-ordenha a 4% (RIBEIRO, 1999).

No Brasil, Domingues et al. (1996) ao estudarem a eficiência da higienização do óstio do teto de vacas leiteiras antes do início da ordenha utilizando o hipoclorito de sódio a 3%, verificaram redução de 74,1% do número de microrganismos imediatamente após a anti-sepsia. A recuperação clínica de glândulas mamárias afetadas por abscessos utilizando o hipoclorito a 1% no tratamento pós-operatório, mostrou elevado percentual de cura (84,3%) das lesões nos animais (SILVA et al. 2002).

Sintetizado em 1950, o clorexidine é um produto químico que apresenta amplo espectro de ação microbicida e baixa toxicidade (DENTON, 1991). Possui atividade bactericida, não apresenta coloração e odor (PANKEY et al., 1984;

DENTON, 1991) apresentando alta persistência na pele do teto (PANKEY et al., 1984). Mantém atividade entre pH 5,5 a 7,0 e seu armazenamento deve ser em recipiente de vidro (polietileno ou polipropileno), uma vez que outros materiais poderão interagir com o anti-séptico. Quando diluído pode ser estocado a temperatura ambiente (DENTON, 1991). Na mastite bovina, Boddie et al. (1993) observaram redução do número de novos casos por microrganismos contagiosos ao utilizarem clorexidine a 0,5% ou iodo a 1% como anti-sépticos na pós-ordenha.

Melville et al. (2002) descreveram a ação “in vitro” do clorexidine a 0,01%, do sulfato de cobre a 0,1% e do nitrato de prata a 0,3%, em estirpes de *P. zopffii* isoladas de mastite no Brasil. O estudo revelou o efeito algicida destes produtos, que foi justificado por alterações na estrutura celular do microrganismo, sugerindo, portanto, a utilização destes compostos como alternativas profiláticas e eventualmente terapêuticas na prototecose mamária.

Os compostos quaternários de amônio (cloretos aquil e dimetil benzil amônio) são bactericidas atuando principalmente em bactérias Gram-negativas. Em baixas concentrações, soluções formuladas para a imersão de tetos não são tóxicas e/ou irritativas. Porém, soluções de quaternário de amônio a 10% ou concentrações superiores são tóxicas, podendo levar até o óbito se ingeridas. Os compostos a base de quaternários de amônio não volatizam rapidamente e apresentam boa atividade na presença de matéria orgânica (PANKEY et al., 1984; MERIANOS et al., 1991). Não está bem esclarecido o modo de ação destes compostos, porém, assume-se que a ação do produto decorre de alterações na estrutura da membrana citoplasmática dos microrganismos. Merianos (1991) referiu que alterações na permeabilidade da membrana promovem a saída de metabólitos e co-enzimas, gerando distúrbios na osmolaridade celular que culminam com a morte dos microrganismos.

Pedrini & Margatho (2003) ao avaliarem a sensibilidade “in vitro” de diferentes anti-sépticos sobre microrganismos causadores de mastite ambiental e contagiosa em bovinos, verificaram que soluções de iodo entre 1 e 2% apresentaram melhor desempenho frente a todos os isolados. No mesmo estudo, o hipoclorito de sódio a 0,5% não foi efetivo contra os agentes. O cloreto de

benzalcônio a 1% apresentou efetividade restrita para bactérias Gram-positivas, enquanto o clorexidine a 0,5% mostrou-se efetivo contra os isolados.

A anti-sepsia dos tetos na pré e pós-ordenha é considerada um dos métodos mais recomendados para prevenir a infecção mamária no período de lactação, por ser uma medida eficaz, prática e de baixo custo. Pode prevenir mais de 50% de novas infecções. Porém, isoladamente, não substitui boas condições de manejo de ordenha, havendo a necessidade de associar outras medidas profiláticas para o controle efetivo da mastite no rebanho leiteiro (PHILPOT & PANKEY, 1978).

2.2.2 Prototecose em Animais de Companhia

Em animais de companhia as principais manifestações clínicas da prototecose são representadas por distúrbios entéricos (VAN KRUININGEN, 1970; MIGAKI et al., 1982), tegumentares (VAN KRUININGEN, 1970; TYLER et al., 1980; GINEI et al., 1997), oculares e neurológicos (GAUNT et al., 1984).

P. zopfii destaca como a espécie mais comumente isolada de casos disseminados em cães e gatos, enquanto *P. wickerhamii* geralmente é isolada de casos cutâneos (GREENE, 2006).

Em cães, a via oral parece representar a principal forma de infecção, visto que a colite hemorrágica é a manifestação clínica mais evidente nesta espécie animal. A prototecose cutânea é relativamente incomum e decorre provavelmente de inoculação traumática (DILLBERGER et al., 1988; SIQUEIRA et al., 2007). A prototecose canina apresenta-se usualmente como doença disseminada, devido a grande variedade de tecidos acometidos (HOLLINGSWORTH, 2000; GREENE, 2006).

Em felinos há referências de prototecose exclusivamente cutânea causada por *P. wickerhamii*, sugerindo inoculação da alga por processos traumáticos, de maneira similar aos cães (FINNIE & COLOE, 1981; GREENE, 2006).

À semelhança da prototecose em seres humanos, em animais, a doença também pode estar relacionada a estados imunossupressivos, ou co-infecção com doenças de base imunossupressoras (CHAO et al., 2002; GREENE, 2006).

No Brasil, o primeiro relato de prototecose em animal de companhia foi descrito em cão apresentando colite hemorrágica crônica. O agente foi isolado a partir de biópsia intestinal. Com base em testes de assimilação de substratos, o microrganismo foi diagnosticado como *P. zopfii*. Exames citológicos e de microscopia eletrônica auxiliaram na confirmação diagnóstica. O animal possuía acesso a ambiente de criação de vacas leiteiras, aventando-se que a infecção do animal tenha ocorrido pela ingestão de água e/ou alimentos contaminados pela alga, proveniente do ambiente (FARIAS, et al., 2006). Subseqüentemente, a linhagem de *P. zopfii* foi submetida a caracterização molecular, caracterizada como pertencente ao genótipo 2 (Ribeiro, 2007)*.

2.2.3 Prototecose no Homem e Aspectos de Saúde Pública

Clinicamente, a prototecose em seres humanos tem sido descrita principalmente sob a forma de lesões cutâneas (DAVIES et al., 1964; IACOVIELLO et al. 1992; ZHAO et al. 2004) e, secundariamente, em casos de bursite (NOSANCHUK & GREENBERG, 1973; ABHEL et al., 1980; NARYSHKIN et al., 1987), peritonite (GIBB et al., 1991; SANDS et al., 1991; MELÓN et al., 2007) e gastroenterite (SUDMAN, 1974; COSTA et al., 1995; RAZ et al., 1998).

A alga tem sido isolada a partir de secreções, excreções e de diferentes órgãos de pacientes (PORE et al., 1983). O microrganismo foi isolado das fezes (SUDMAN, 1974; COSTA et al., 1995; RAZ et al., 1998), sangue, conteúdo de abscesso peritoneal (HENEY et al., 1991; KUNOVA et al., 1996; MOHABEER et al., 1997), fígado (CHAN et al., 1990), articulações (NOSAUNCHUNK & GREENBERG, 1973), encéfalo e líquido de pacientes com prototecose clínica (KAMINSKY et al., 1992; ZHANG et al., 2007).

As manifestações tegumentares caracterizam-se pelo desenvolvimento de lesões decorrentes geralmente de inoculação transcutânea do microrganismo, secundárias aos processos traumáticos ou cirúrgicos (DAVIES et al., 1964; CHAO

* Ribeiro, M.G. (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP – Campus de Botucatu). Comunicação pessoal, 2007.

et al., 2002). As lesões surgem comumente sob a forma de áreas nodulares, eritematosas, úlcerações e com menor freqüência em erupções granulomatosas extensas (KAPLAN, 1977; CHAO et al., 2002).

Entre as espécies do gênero, *P. wickerhamii* é a mais freqüentemente isolada de pacientes com manifestações cutâneas (ZAITZ et al., 2006a), enquanto que em casos sistêmicos há predominância de *P. zopfii* (VAN BEZOOIJEN & NEWLING, 2002). Em contraste, Zhao et al. (2004) descreveram prototecose exclusivamente cutânea por *P. zopfii* com lesões na região da face e pescoço em paciente imunocompetente.

Até o final da década de 80, os casos de prototecose no homem foram descritos principalmente em pessoas sem doenças intercorrentes, nas quais o microrganismo parece apresentar baixa virulência. Porém, a partir da década de 90, o número de casos aumentou significativamente assumindo maior ocorrência devido à associação da prototecose com pacientes imunossuprimidos, acometidos por neoplasias, diabéticos (AHMAD et al., 2006), transplantados, submetidos à terapia imunossupressiva prolongada (CHAO et al., 2002; THIELE & BERGMANN, 2002; LASS-FLÖRL & MAYR, 2007) e, em especial, portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida - aids (COX et al., 1974; TYRING et al., 1989; KAMINSKI et al., 1992; PIYOPHIRAPONG et al., 2002).

No Brasil, o primeiro caso de prototecose humana foi relatado em 1983, no Estado do Rio Grande do Sul, em paciente com lesão nodular no cotovelo (AGOSTINI, 1983).

Raríssimos estudos têm se preocupado com o impacto do ambiente na transmissão do microrganismo, como o manuseio do solo, atividades de jardinagem ou o contato estreito com animais domésticos e o ambiente dos criatórios. Marcano & Feo (1981) descreveram prototecose por *P. zopfii* nas unhas da mão de mulher hígida. De maneira similar, Zaitz et al. (2006b) relataram o primeiro caso brasileiro de onicototecose por *P. wickerhamii* nas mãos de paciente saudável.

O risco ocupacional da doença foi enfatizado por Chao et al. (2002), que descreveram a prototecose cutânea em fazendeiras e laboratorista. A ingestão de

leite e derivados contaminados com a alga também tem sido apontada como relevante dentre as possibilidades de infecção para o homem (COSTA et al., 1995).

O elevado valor nutricional do leite e derivados lácteos inclui estes produtos de origem animal entre as principais fontes nutritivas para o homem, notadamente pelo alto teor de proteínas, vitaminas e minerais essenciais para o desenvolvimento e manutenção da saúde (RUSSOF, 1970; LANGONI, 1999). A presença de microrganismos no leite e derivados, principalmente àqueles de potencial zoonótico - incluindo o gênero *Prototheca* -, compromete a qualidade e torna o produto de risco para a transmissão do patógeno para o homem (COSTA et al., 1995).

No Brasil, ainda permanece o hábito do consumo de leite e derivados lácteos crus, submetidos ou não ao tratamento térmico adequado (MELVILLE et al., 1995). Neste contexto, faz-se importante salientar para o risco do consumo de leite e derivados na transmissão de patógenos e suas toxinas. Ao estudar 40 estirpes de *P. zopfii*, Melville (1995) demonstrou a termo-resistência de 34 estirpes frente às condições de temperatura adotadas nos processos usuais de pasteurização lenta e rápida, denotando preocupação com a veiculação da alga para o homem pela ingestão do leite e derivados.

Costa et al. (1995) descreveram a ocorrência de distúrbio gastrointestinal em homem voluntário que consumiu queijo fresco fabricado com leite sabidamente contaminado por *P. zopfii*. O isolamento da alga foi obtido a partir das fezes do indivíduo reforçando o potencial zoonótico do microrganismo como doença de veiculação alimentar.

A alta capacidade de disseminação de *P. zopfii* em rebanhos leiteiros, o incremento da frequência da prototecose mamária no Brasil, a multi-resistência do microrganismo aos antimicrobianos e anti-sépticos convencionais e o potencial zoonótico da alga, são peculiaridades da prototecose que reforçam a sua importância como enfermidade da glândula mamária em bovinos. Adicionalmente, os estudos recentes sobre a genotipagem de *P. zopfii* isoladas de casos de mastite bovina na Europa, acenam com perspectivas de melhor entendimento da

virulência e da epidemiologia da prototecose mamária bovina, especialmente no tocante aos mecanismos de transmissão, com vistas a contribuir na adoção de ações de profilaxia e controle. Com base nestas considerações, o presente estudo teve por objetivo avaliar a sensibilidade “in vitro” de linhagens de *P. zopfi* isoladas do leite de vacas no Brasil frente a antimicrobianos e anti-sépticos, e caracterizar o perfil genotípico dos isolados.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAIS

- Avaliar a sensibilidade microbiana “in vitro” de linhagens de *P. zopfii* isoladas do leite de vacas no Brasil frente a antimicrobianos e anti-sépticos e caracterizar o perfil genotípico dos isolados.

3.2 ESPECÍFICOS

- Determinar o perfil de sensibilidade microbiana de linhagens de *P. zopfii* isoladas do leite de vacas frente a diferentes princípios ativos de antimicrobianos, disponíveis comercialmente no Brasil para a terapia da mastite bovina;
 - Avaliar a multi-resistência dos isolados frente aos antimicrobianos;
 - Determinar a efetividade “in vitro” dos anti-sépticos hipoclorito de sódio e tintura de iodo frente aos isolados;
 - Caracterizar genotipicamente linhagens de *P. zopfii* isoladas do leite de vacas e seus reflexos na epidemiologia da prototecose mamária;
 - Comparar o perfil genotípico com a sensibilidade microbiana das linhagens frente aos antimicrobianos e anti-sépticos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram estudados o perfil de sensibilidade microbiana “in vitro” e a caracterização genotípica de 27 linhagens de *P. zopfii* isoladas no Brasil, de casos de mastite bovina clínica, subclínica e de tanque de expansão, frente a diferentes antimicrobianos, disponíveis comercialmente para terapia de mastite e aos anti-sépticos hipoclorito de sódio e tintura de iodo.

4.2 OBTENÇÃO DAS ESTIRPES DE *P. zopfii*

Foram utilizadas no estudo, 27 estirpes de *P. zopfii* provenientes de 10 propriedades leiteiras dos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Goiás e Paraná, isoladas do leite de vacas com mastite clínica, subclínica e de tanque de expansão (Anexo A). Destas, 12 foram cedidas pelo Prof. Ass. Dr. Márcio Garcia Ribeiro, do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública (DHVSP) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ – UNESP/Botucatu, SP; 08 foram cedidas pela Profa. Titular Elizabeth Oliveira da Costa, do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira – NAPGAMA, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – FMVZ – USP; 04 pelo Prof. Ass. Dr. Válter Ferreira Félix Bueno do Centro de Pesquisa em Alimentos, do Departamento de Medicina Veterinária da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás (UFG), e 03 pela Profa. Ass. Dra. Aline Artioli Machado Yamamura, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual de Londrina – UEL, PR.

Como controle-positivo foram utilizadas cepas de *P. zopfii* genótipo 1 (SAG 2063^T), *P. zopfii* genótipo 2 (SAG 2021^T) e *P. blaschkeae* (SAG 2064^T), depositadas, respectivamente, no Genbank números AY973040, AY940456 e AY973041, cedidas gentilmente para o estudo pelo Prof. Dr. Uwe Roesler, do Instituto de Saúde Pública Veterinária e Higiene Animal da Universidade de Leipzig, Alemanha.

4.3 IDENTIFICAÇÃO E MANUTENÇÃO DAS ESTIRPES DE *P. zopfii*

As estirpes provenientes de outros laboratórios foram encaminhadas ao Serviço de Diagnóstico Microbiológico de Enfermidades Infecciosas dos Animais do DHVSP – FMVZ – UNESP/Botucatu, SP, em ágar estoque (Difco™), em temperatura de refrigeração (4-8°C).

Todas as estirpes foram re-isoladas no meio de ágar-sangue (Oxoid™) bovino desfibrinado (5%) e mantidas em condições de aerobiose, a 37°C, por 72 horas, observadas a cada 24 horas de incubação, para avaliação da pureza dos estoques. As linhagens de *P. zopfii* foram re-classificadas com base nas características morfo-tintoriais e de cultivo, aliado ao teste de assimilação de carboidratos utilizando trealose, glicose, sacarose e do n-propanol (CAMARGO & FISCHMAN, 1979; PORE, 1985). Para a assimilação dos substratos foram utilizadas placas (90x150mm) contendo o meio “yeast nitrogen base” (Difco™), acrescido de ágar bacteriológico (Oxoid™), inoculados com suspensão de 1mL de cada estirpe em solução salina. Após a solidificação do meio, foram adicionados aproximadamente 0,0037g de glicose e trealose, 0,0200g de sacarose e 10µL do n-propanol, em pontos equidistantes da placa. Todas as placas foram incubadas em condições de aerobiose, a 37°C, realizando-se leituras diárias até o 14º dia, considerando positivas para a assimilação dos açúcares e do álcool as linhagens que apresentaram a formação de halo ao redor do ponto de inoculação dos substratos.

Todas as estirpes utilizadas foram estocadas em duplicata, no meio de Lignières, mantidas a temperatura ambiente (25-30°C), no laboratório de Serviço de Diagnóstico Microbiológico de Enfermidades Infecciosas dos Animais do DHVSP da FMVZ – UNESP/ Botucatu, SP, até o momento do processamento pelas diferentes técnicas.

4.4 PERFIL DE SENSIBILIDADE “IN VITRO” AOS ANTIMICROBIANOS E EFEITO ALGICIDA DOS ANTI-SÉPTICOS

A avaliação da sensibilidade “in vitro” das linhagens de *P. zopfii* frente aos antimicrobianos e o efeito algicida dos anti-sépticos foram realizados, respectivamente, pelo método de difusão com discos e ensaios em tubos.

O perfil de sensibilidade “in vitro” dos isolados aos antimicrobianos foi avaliado com base no princípio do teste de sensibilidade microbiana, utilizando o método clássico de difusão com discos (BAUER et al., 1966; CLSI/NCCLS, 2003).

O efeito algicida dos anti-sépticos em tubos (“concentração algicida mínima”) foi realizado segundo uma adaptação no princípio da técnica de concentração bactericida mínima (TRABULSI et al., 2005). A “concentração algicida mínima” foi caracterizada como a menor diluição (concentração) da droga capaz de impedir a multiplicação da alga, após plaqueamento em meio de cultura.

4.4.1 Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) das Cepas de *P. zopfii*

Todas as linhagens de *P. zopfii* foram submetidas à contagem das unidades formadoras de colônias em superfície, utilizando o método de contagem de microrganismos em placas (SILVA et al., 1997), como base para a preparação dos inóculos para os testes “in vitro” em tubos, frente aos anti-sépticos.

Inicialmente, todas as estirpes estocadas foram plaqueadas no meio de ágar sangue bovino (Oxoid™), em condições de aerobiose, a 37°C, mantidas por 72 horas, com objetivo de avaliar a pureza do estoque. Em seguida, duas a três colônias típicas foram resuspendidas em 4mL de água MiliQ esterilizada, dispostas em tubos, e ajustada a turvação da solução por densidade óptica, no tubo 1 da escala de Mac Farland (Bier, 1984). A partir desta suspensão, os tubos foram homogeneizados em agitador magnético e elaboradas diluições na escala decimal (1/10), a saber: 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} .

Alíquota de 0,1mL da diluição 10^{-3} foi colhida em duplicata para cultivo em ágar, visando a contagem padrão no “plate count agar” – PCA (Difco™), utilizando a técnica de “pour plate”, ou rotineiramente conhecida como “derramamento em placa”, com o auxílio de bastão de vidro em “L”, mantendo-as incubadas a 37 °C, em aerobiose, por até 96 horas. A contagem da UFC de cada linhagem foi realizada pela visualização macroscópica das colônias no meio de cultura.

4.4.2 Teste de Sensibilidade Microbiana (Difusão com Discos)

As 27 estirpes de *P. zoppii* e as três cepas controle foram submetidas ao teste de sensibilidade microbiana - método de difusão com discos - (BAUER et al., 1966), utilizando-se antimicrobianos indicados para terapia intramamária e/ou sistêmica da mastite bovina, disponíveis comercialmente para o uso na rotina veterinária (RIBEIRO, 2007*), a saber: ampicilina (10µg), cefoperazona (75µg), cloxacilina (1µg), enrofloxacina (5µg), estreptomicina (10µg), florfenicol (30µg), gentamicina (10µg), neomicina (30µg), nistatina (100 U.I.) e tetraciclina (30µg). A leitura dos halos de inibição e interpretação dos resultados foi realizada de acordo com manual “Clinical and Laboratory Standards Institute” – CLSI (CLSI/NCCLS, 2003).

Foram consideradas multi-resistentes as estirpes que mostraram resistência simultânea a três ou mais dos antimicrobianos utilizados.

4.4.3 Avaliação da “Concentração Algicida Mínima” (CAM)

4.4.3.1 Preparo dos Inóculos

* Ribeiro, M.G. (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP – Campus de Botucatu). Comunicação pessoal, 2007.

À semelhança da técnica de UFC, todas as estirpes de *P. zopfii* foram plaqueadas no meio de ágar sangue bovino desfibrinado (5%), mantidas em condições de aerobiose, a 37°C, por 72 horas. Duas a três colônias de cada linhagem foram repicadas em tubos contendo 10mL de caldo infusão cérebro e coração – BHI (Oxoid™), e incubadas em aerobiose, a 37°C. A turvação dos tubos foi ajustada por densidade óptica equivalente ao tubo 1 da escala de MacFarland (Bier,1984).

4.4.3.2 Anti-Sépticos

Foram utilizados dois princípios ativos distintos de anti-sépticos disponíveis na forma líquida para avaliação da “concentração algicida mínima”, a saber: hipoclorito de sódio a 10% (Chemco®) e tintura de iodo a 10% (Dinâmica®).

4.4.3.2.1 Determinação da “Concentração Algicida Mínima” do Hipoclorito de Sódio e da Tintura de Iodo Frente aos Isolados de *P. zopfii*

Para cada estirpe de *P. zopfii* foram utilizados 10 tubos esterilizados. No primeiro tubo foi depositado 1mL do hipoclorito de sódio à 10%. Nos 9 tubos subseqüentes foram distribuídos 0,5mL de água Mili-Q esterilizada. Em seguida, transferiu-se 0,5mL do hipoclorito de sódio a 10% do primeiro para o segundo tubo e realizou-se a homogeneização. Este mesmo processo foi realizado sucessivamente nos demais tubos com descarte de 0,5mL do tubo 10. Logo após, foi acrescido em cada tubo 0,5mL do inóculo de *P. zopfii* produzido de acordo com o item 4.4.3.1, perfazendo as seguintes diluições: 5%, 2,5%, 1,25%, 0,62%, 0,31%, 0,15%, 0,07%, 0,03%, 0,01% e 0,009%.

Os tubos foram incubados em condições de aerobiose, mantidos a 37°C, por aproximadamente 12. Em seguida, uma alíquota (10µL) de cada tubo foi semeada no meio de ágar sangue (Oxoid™) bovino desfibrinado (5%) e incubada em aerobiose, a 37°C, mantida por 7 dias, com leituras a cada 24 horas, visando a avaliação da “concentração algicida mínima” da droga testada.

O mesmo processo supracitado foi realizado utilizando a tintura de iodo a 10%, para a determinação da “concentração algicida mínima”.

Todas as estirpes de *P. zopfii* foram submetidas em duplicata para a determinação da CAM utilizando o iodo e o hipoclorito de sódio.

Como solução controle, foram preparadas suspensões em tubos previamente esterilizados, contendo 0,5 mL de água Mili-Q esterilizada, acrescido de 0,5 mL do inóculo, ajustado a turbidez da escala 1 de MacFarland (Bier, 1984).

4.5 GENOTIPAGEM DAS LINHAGENS DE *P. zopfii*

Todas as linhagens de *P. zopfii* foram submetidas à caracterização genotípica utilizando a técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR), baseada na identificação de fragmentos 18S rDNA, utilizando pares de bases (“primers”) específicos (Anexo B). A PCR das linhagens de *P. zopfii* foi realizada em termociclador ajustado para a realização de 35 ciclos, com a seguinte especificação: denaturação a 94°C/30 segundos, anelamento a 58°C/30 segundos (63°C para *P. blaschkeae*) e extensão a 72°C/40 segundos.

Os produtos amplificados de PCR foram analisados em gel de agarose (1%), corados por brometo de etídio (MÖLLER et al., 2006). O procedimento de genotipagem das linhagens foi realizado em colaboração com o Dr. Uwe Roesler, da Universidade de Leipzig, Alemanha.

Como controle-positivo foram utilizadas as cepas *P. zopfii* genótipo 1 (SAG 2063^T), *P. zopfii* genótipo 2 (SAG 2021^T) e *P. blaschkeae* (SAG 2064^T).

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

4.6.1 Testes Estatísticos

A associação entre o perfil de sensibilidade microbiana dos isolados, a “concentração algicida mínima” do hipoclorito de sódio e do iodo e a genotipagem das 27 linhagens isoladas do leite de vacas foram comparadas entre si utilizando o teste de χ^2 , contrastando as freqüências utilizando o intervalo de confiança de 95%. Os valores mínimos e máximos, para a concentração algicida mínima (CAM) do hipoclorito de sódio e do iodo foram realizados pelo teste Mann-Whitney. Todos os cálculos foram realizados utilizando-se o programa EpiInfo 6.0 (Centers for Disease Control, Atlanta), considerando nível de significância $\alpha=0,05$ (TRIOLA, 1999).

5. RESULTADOS

5.1 UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS DE *P. zopfii*

Os valores das UFC/mL das 27 linhagens de *P. zopfii* utilizadas como base para preparar os inóculos para a realização dos testes “in vitro” de “concentração algicida mínima” apresentaram variação entre $4,1 \times 10^5$ a $6,8 \times 10^5$. Para as cepas controle foram encontrados valores de $5,2 \times 10^5$ a $6,2 \times 10^5$ UFC/mL (Anexo C).

5.2 TESTE DE SENSIBILIDADE MICROBIANA (DIFUSÃO COM DISCOS)

Os maiores índices de sensibilidade microbiana das 27 linhagens de *P. zopfii* foram observadas frente à nistatina (100,0%) e gentamicina (66,7%). Em contraste, a totalidade das estirpes revelou resistência para ampicilina, cefoperazona, cloxacilina, enrofloxacina, florfenicol, neomicina e tetraciclina. A estreptomicina mostrou reduzida eficiência com 7,4% de sensibilidade parcial (intermediária) e 92,6% de resistência.

Para as três cepas controle foram encontrados resultados similares às 27 linhagens estudadas, visto que nestas cepas de referência, a nistatina (100,0%) e gentamicina (66,7%) mostraram os maiores índices de eficiência. A estreptomicina (33,3%) e tetraciclina (33,3%) mostraram reduzida efetividade. A neomicina revelou sensibilidade parcial (33,3%), enquanto as demais (ampicilina, cefoperazona, cloxacilina, enrofloxacina e florfenicol) apresentaram ausência de efetividade (Tabela 1).

A multi-resistência das estirpes a três ou mais dos antimicrobianos utilizados foi observada em 100,0% dos isolados.

Tabela 1 – Sensibilidade microbiana “in vitro” em cepas controle do gênero *Prototheca* frente a diferentes antimicrobianos indicados para a terapia da mastite. Botucatu, 2007.

	<i>P. zopfii</i> genótipo 1	<i>P. zopfii</i> genótipo 2	<i>P. blaschkeae</i>	Total nº de linhagens (%)
Antimicrobiano				

				S	PS	R
Ampicilina	R	R	R	0 (-)	0 (-)	3 (100)
Cefoperazona	R	R	R	0 (-)	0 (-)	3 (100)
Cloxacilina	R	R	R	0 (-)	0 (-)	3 (100)
Enrofloxacina	R	R	R	0 (-)	0 (-)	3 (100)
Estreptomicina	R	R	S	1 (33,3)	0 (-)	2 (66,7)
Florfenicol	R	R	R	0 (-)	0 (-)	3 (100)
Gentamicina	S	PS	S	2 (66,7)	1 (33,3)	0 (-)
Neomicina	R	R	PS	0 (-)	1 (33,3)	2 (66,7)
Nistatina	S	S	S	3 (100)	0 (-)	0 (-)
Tetraciclina	R	R	S	1 (33,3)	0 (-)	2 (66,7)

* n^o: número

#: porcentagem

S: sensível

PS: parcialmente sensível

R: resistente

A nistatina e gentamicina foram estatisticamente significantes ($p < 0,05$) quando comparadas aos demais antimicrobianos frente às linhagens de *P. zoppii*. Houve também diferença estatística significativa ($p < 0,05$) da nistatina quando comparada com a gentamicina (Tabela 2).

Tabela 2 – Perfil de sensibilidade microbiana em 27 linhagens de *P. zoppii* isoladas de casos de mastite bovina clínica e subclínica e de tanque de expansão. Botucatu, 2007.

	Senibilidade		
	Sensível	Parcialmente sensível	Resistente
Antimicrobianos	N^o linhagens (%; IC95%)*		

Ampicilina	0 (0,00; 0,09-12,34)	0 (0,00; 0,09-12,34)	27 (100; 87,66-99,91)
Cefoperazona	0 (0,00; 0,09-12,34)	0 (0,00; 0,09-12,34)	27 (100; 87,66-99,91)
Cloxacilina	0 (0,00; 0,09-12,34)	0 (0,00; 0,09-12,34)	27 (100; 87,66-99,91)
Enrofloxacina	0 (0,00; 0,09-12,34)	0 (0,00; 0,09-12,34)	27 (100; 87,66-99,91)
Estreptomicina	0 (0,00; 0,09-12,34)	2 (7,40; 2,27-23,50)	25 (92,52; 76,50-97,73)
Florfenicol	0 (0,00; 0,09-12,34)	0 (0,00; 0,09-12,34)	27 (100; 87,66-99,91)
Gentamicina	18 (66,66; 47,65-81,36)	8 (29,62; 15,88-48,67)	1 (3,70; 0,88-18,35)
Neomicina	0 (0,00; 0,09-12,34)	0 (0,00; 0,09-12,34)	27 (100; 87,66-99,91)
Nistatina	27 (100; 87,66-99,91)	0 (0,00; 0,09-12,34)	0 (0,00; 0,09-12,34)
Tetraciclina	0 (0,00; 0,09-12,34)	0 (0,00; 0,09-12,34)	27 (100; 87,66-99,91)

*Intervalos de confiança que não se sobrepõem demonstram diferenças significativas entre as proporções.

IC95%=Intervalo de confiança de 95%.

5.2 “CONCENTRAÇÃO ALGICIDA MÍNIMA” (CAM) PARA O HIPOCLORITO DE SÓDIO E TINTURA DE IODO

Os testes realizados utilizando hipoclorito de sódio revelaram que a totalidade das estirpes estudadas apresentou CAM variando entre 0,03% a 0,15%.

Destas, 19 (70,4%) linhagens mostraram CAM a 0,07% frente ao anti-séptico, enquanto 07 (25,9%) e 01 (3,7%) estirpes apresentaram CAM, respectivamente, a 0,03% e 0,15%. *P. zopfii* genótipo 1, *P. zopfii* genótipo 2 e *P. blaschkeae* revelaram CAM a 0,03%, 0,15% e 0,07%, respectivamente, para o hipoclorito de sodio.

Para a tintura de iodo foi verificado que todas as estirpes utilizadas, apresentaram CAM entre 0,15% à 0,62%. Destas, 22 (81,5%) linhagens apresentaram CAM a 0,31%, enquanto 03 (11,1%) e 02 (7,4%) estirpes revelaram CAM, respectivamente, a 0,62% e 0,15% (Anexo D).

Todas as cepas controle (*P. zopfii* genótipo 1, *P. zopfii* genótipo 2 e *P. blasckeae*) mostraram CAM a 0,31% para a tintura de iodo.

Apesar da totalidade das linhagens de *P. zopfii* revelarem sensibilidade para tintura de iodo e hipoclorito de sódio nas concentrações “in vitro” utilizadas, o hipoclorito de sódio apresentou, comparativamente ao iodo, boa efetividade em menores concentrações (Gráfico 1).

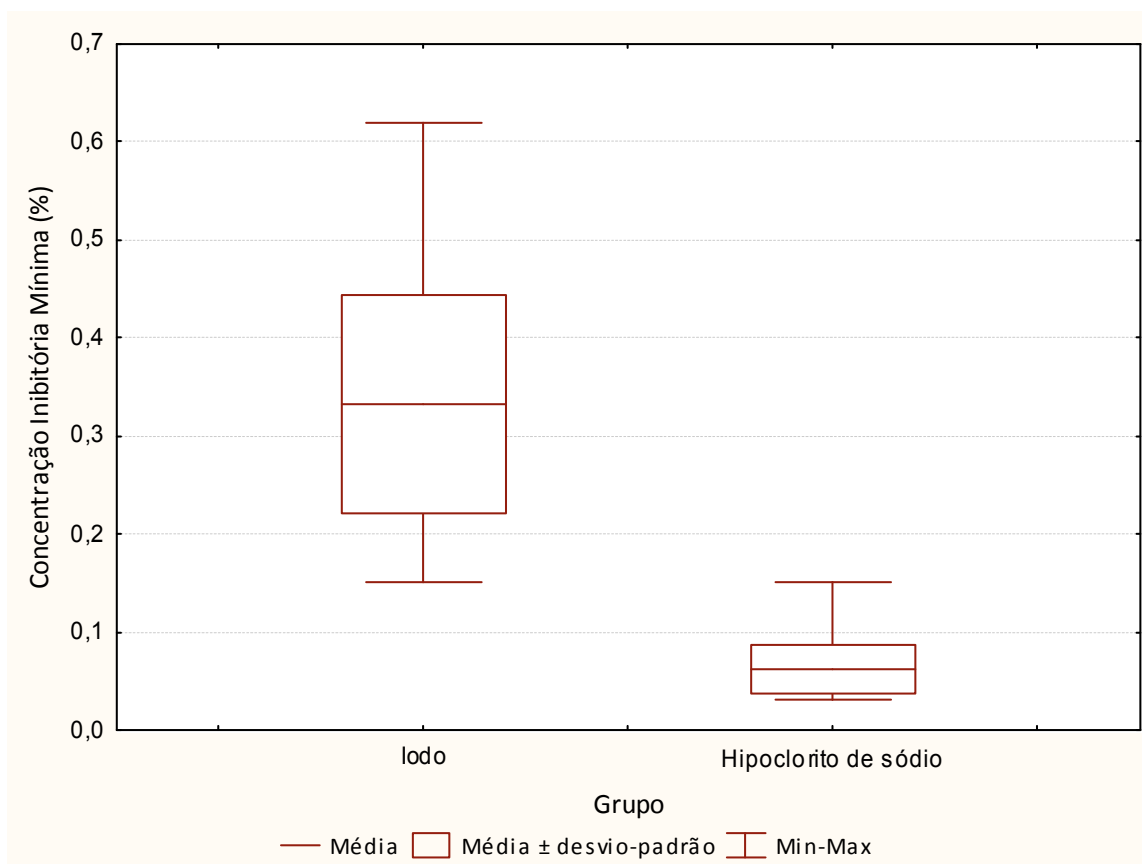


Gráfico 1 - Média \pm desvio-padrão e valores mínimo e máximo para a concentração inibitória mínima (CIM) do hipoclorito de sódio (%) e iodo (%) em estirpes de *Prototheca zopfii* isoladas de casos de mastite clínica (n=24), subclínica (n=2) e tanque de expansão (n=1) em quatro Estados brasileiros. Botucatu, 2007.

Foi observada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) do efeito algicida do hipoclorito de sódio frente aos isolados, quando comparado à tintura de iodo (Tabela 3).

Tabela 3 - Média, valores mínimos e máximos para a concentração algicida mínima (CAM) do hipoclorito de sódio (%) e iodo (%), em estirpes de *Prototheca zopfii* isoladas de casos de mastite clínica (n=24), subclínica (n=2) e tanque de expansão (n=1), em quatro Estados brasileiros. Botucatu, 2007.

Estatística*	CAM – Hipoclorito de sódio	CAM - Iodo
Média	0,07 ^a	0,31 ^b
Valor mínimo	0,03	0,15
Valor máximo	0,15	0,62

* Valores da média seguidos de letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas na CAM do hipoclorito de sódio e iodo ($p < 0,0001$), pelo teste de Mann-Whitney, com $\alpha = 0,05$.

5.3 GENOTIPAGEM DAS LINHAGENS DE *P. zopfii*

A totalidade das linhagens de *P. zopfii* estudadas, submetidas à caracterização genotípica pela técnica de PCR, revelaram amplificação de 165 pares de bases, similar a cepa controle de *P. zopfii* SAG 2021^T, caracterizando os 27 isolados como pertencentes ao genótipo 2.

Não houve associação estatística ($p > 0,05$) entre a caracterização genotípica das linhagens, o perfil de sensibilidade microbiana dos isolados e o efeito algicida dos anti-sépticos, hipoclorito de sódio e iodo.

6 DISCUSSÃO

A ocorrência de mastite bovina por *Prototheca* spp têm aumentado significativamente em diversos países (CHEVILLE et al., 1984; PORE et al., 1987; TANIYAMA et al., 1994). No Brasil, a prototecose bovina tem figurado nos últimos anos como uma das causas mais preocupantes de mastite de origem ambiental (LANGONI, 1992, RIBEIRO et al., 1998; COSTA et al., 2004). A distribuição ubíqua do microrganismo dificulta a preconização de medidas específicas de controle e profilaxia, ocasionando prejuízos ao produtor, decorrentes da queda abrupta na produção leiteira, perda da função da glândula mamária acometida ou descarte precoce de fêmeas (COSTA et al., 1996a). As dificuldades no controle da doença, o sub-diagnóstico e a refratariedade das algas do gênero *Prototheca* às medidas terapêuticas convencionais tendem a gerar graves processos inflamatórios na prototecose mamária em vacas (RIBEIRO et al., 1999; JÁNOSI et al., 2001).

Infecções mamárias por *Prototheca* spp manifestam-se predominantemente sob a forma clínica, podendo ser observado na grande maioria dos casos, redução abrupta na produção láctea, endurecimento e aumento da sensibilidade à palpação mamária e presença de grumos no leite (SPALTON, 1985; TANIYAMA et al., 1994; MELVILLE, 1995; LANGONI, 2003). Dentre os 27 isolados de *P. zopfii*, 24 (88,8%) foram obtidos de animais com mastite clínica. Este achado está em consonância com diversos autores (MELVILLE, 1995; GOMES et al., 1999; COSTA et al., 2000b) que também descreveram maior ocorrência de casos de mastite clínica por *P. zopfii* na espécie bovina. A predominância da manifestação clínica em vacas infectadas por microrganismos de origem ambiental, tem sido atribuída a pouca adaptabilidade deste grupo de agentes à mucosa e ao epitélio glandular. Diferentemente, os microrganismos causadores de mastite contagiosa são encontrados na microbiota de pele, mucosas e conjuntivas, considerados mais adaptados ao epitélio e mucosas estando, portanto, frequentemente associados à mastite subclínica. Em contraste, os ambientais - incluindo *P. zopfii* -, ao serem introduzidos na glândula mamária, comumente desencadeiam severos processos

inflamatórios, que geralmente se exteriorizam como manifestações clínicas de mastite, sejam alterando as características macroscópicas do leite, ou mesmo desencadeando manifestações na glândula mamária e/ou sistêmicas nos animais (MELVILLE 1995; RADOSTITIS, 2007).

Propriedades rurais de exploração leiteira com histórico de mastite bovina predominantemente clínica, recidivantes, com altas contagens de células somáticas, bem como apresentando problemas no manejo higiênico-sanitário na ordenha e entre-ordenhas, deficiências no procedimento de terapia intramamária, na remoção de dejetos e nos cuidados na introdução de novos animais no plantel, são achados clínico-epidemiológicos que sugerem a ocorrência de mastite ambiental, com fortes indícios para prototecose.

O diagnóstico microbiológico da mastite bovina pelo gênero *Prototheca* é considerado relativamente simples, tendo em vista que a alga é isolada em meios de cultura convencionais ou de rotina, como o ágar sangue bovino ou ovino e o ágar Sabouraud. Ademais, o microrganismo pode ser identificado à microscopia por vários métodos tintoriais como Gram, Giemsa, Shör, HE, panótico, mostrando estruturas globosas ou ovais, com cápsula densa, contendo estruturas internas (endosporos), sugestivos do gênero *Prototheca*. Entretanto, o diagnóstico definitivo deve ser firmado após submeter às linhagens aos testes bioquímicos e de assimilação de diferentes substratos como açúcares e álcoois. Releva-se notar também, que o primo-isolamento da alga do leite de vacas infectadas e a formação de colônias características ocorrem a partir de 48-72 horas. No entanto, a grande maioria dos agentes de mastite bovina são isolados em 24 horas, o que representa risco do descarte precoce de placas com 24 horas de incubação e o conseqüente não isolamento da alga, acarretando sub-diagnóstico notadamente em laboratórios pouco preparados para a recepção de material desta natureza. Assim, recomenda-se que o leite de vacas com mastite seja encaminhado para laboratórios veterinários de apoio diagnóstico, no intuito de maximizar o isolamento e identificação de patógenos de importância em animais, especialmente do gênero *Prototheca*.

A doença em cães e gatos é considerada rara ou esporádica (SIQUEIRA et al., 2007). Com exceção da prototecose mamária em bovinos, as infecções pelo gênero *Prototheca* parecem não apresentar importância epidemiológica para outros animais de produção como ovinos, caprinos, bubalinos e eqüinos e, apesar de isolada das fezes de suínos, não aparenta patogenicidade para esta espécie. Desta forma, a prototecose assume destaque no contexto econômico e de saúde animal principalmente para a espécie bovina, notadamente nas infecções mamárias.

Em bovinos, animais de companhia e nos seres humanos, a busca por protocolos terapêuticos efetivos na prototecose tem sido motivo de estudos em vários países. Neste contexto, diferentes estudos “in vitro” têm investigado o perfil de sensibilidade de linhagens de *Prototheca* spp isoladas de mastite bovina, com o intuito de identificarem antimicrobianos ou outras drogas que apresentem efetividade contra o microrganismo e possam ser aventadas para a terapia “in vivo”. No entanto, os resultados destes ensaios têm-se mostrado pouco efetivos ou, no mínimo, controversos. E por vezes, têm reforçado a ineficácia do gênero *Prototheca* a vários grupos de antibióticos, quimioterápicos, anti-fúngicos, algicidas, desinfetantes, entre outros grupamentos químicos. Ademais, na grande maioria dos antimicrobianos, anti-fúngicos e anti-sépticos que mostram certa eficácia “in vitro”, os resultados de ensaios experimentais “in vivo” são pouco efetivos, ou seja, não promovem a resolução do processo infeccioso ou, levam a cura clínica do processo sem determinar a cura microbiológica.

Frank et al. (1969) utilizando o método de difusão com discos, observaram que linhagens de *P. zopfii* isoladas de mastite bovina apresentaram sensibilidade à estreptomicina, neomicina e tetraciclina. Bodenhoff & Madsen (1978) verificaram moderada sensibilidade de linhagens da alga isoladas do leite de vacas frente à estreptomicina e gentamicina. Camargo (1978) e Casal & Gutierrez (1981) demonstraram sensibilidade “in vitro” de isolados do gênero *Prototheca* com o uso dos aminoglicosídeos neomicina e gentamicina quando ensaiados em ágar Sabouraud dextrose. McDonald et al. (1984b) ao realizarem testes “in vitro”

com estirpes de *P. zopfii* obtidas de mastite em vacas, verificaram que 37,5% dos isolados apresentavam sensibilidade à gentamicina.

No Brasil, Costa et al. (1997) ao avaliarem estirpes de *P. zopfii* isoladas de dois surtos de mastite observaram 100,0% de efetividade “in vitro” da gentamicina, enquanto Melville (2000) encontrou 100,0% de sensibilidade parcial em linhagens de *P. zopfii* isoladas de mastite, frente ao mesmo antimicrobiano. Estes achados são similares ao presente estudo que observou boa efetividade “in vitro” da gentamicina (66,7%) frente às 27 linhagens de *P. zopfii* isoladas do leite de vacas.

A gentamicina é um antimicrobiano extraído de culturas de fungos do gênero *Micromonospora* (*M. purpurea*) pertencente ao grupo dos aminoglicosídeos, com ação primária para bactérias Gram-negativas e certa efetividade para bactérias Gram-positivas. Seu mecanismo de ação fundamenta-se na interferência da síntese protéica dos microrganismos, promovendo alterações nas proteínas formadas pelas células, com conseqüente morte celular possuindo, portanto, efeito bactericida (TAVARES, 2002). A efetividade “in vitro” da gentamicina observada nos 27 isolados de *P. zopfii* no presente estudo, também relatada em ensaios similares com a alga (CAMARGO, 1978; CASAL & GUTIERREZ, 1981; COSTA et al., 1997), decorre provavelmente da ação da droga na síntese protéica destes microrganismos.

A dificuldade de opções de antimicrobianos efetivos para a infusão intramamária tem sido reconhecida como grave problema na condução da terapia na prototecose bovina. Atkinson et al. (1972) e Cheville et al. (1984) assinalaram que a resistência do gênero *Prototheca* à grande maioria dos antimicrobianos pode encontrar justificativa na rígida estrutura da parede celular da alga, somada a indução de reação do tipo piogranulomatosa, que limitam a atuação efetiva dos antibióticos e quimioterápicos convencionais nos focos de infecção. Neste contexto, diferentes autores têm alertado para a multi-resistência de linhagens de *P. zopfii* isoladas de mastite bovina em testes de sensibilidade microbiana.

McDonald et al. (1984b), nos Estados Unidos, avaliaram o perfil de sensibilidade de linhagens de *P. zopfii* e verificaram resistência múltipla do microrganismo para diversos antimicrobianos, incluindo cloxacilina, neomicina,

estreptomicina, ampicilina e tetraciclina. No Brasil, Langoni et al. (1992) também constataram multi-resistência de estirpes de *P. zopfii* isoladas de mastite bovina no Estado de São Paulo, especialmente frente à tetraciclina, gentamicina e neomicina. Ao investigarem a sensibilidade microbiana de linhagens de *P. zopfii* isoladas de rebanho leiteiro no Rio Grande do Sul, Gomes (1999) observou resistência múltipla das linhagens para a amicacina, ceftiofur, eritromicina, estreptomicina, florfenicol, neomicina, norfloxacin, novobiocina, tetraciclina e vancomicina. Melville (2000), no Estado de São Paulo, ao estudar o perfil de sensibilidade de estirpes de *P. zopfii* isoladas de mastite clínica, subclínica e de tanque de expansão, também verificou elevada multi-resistência dos isolados à maioria dos antimicrobianos utilizados na prática clínica de terapia intramamária.

A ocorrência de multi-resistência em linhagens de *P. zopfii* isoladas de mastite bovina constatada por vários autores (MCDONALD et al., 1984b; LANGONI et al., 1992; GOMES, 1999; MELVILLE, 2000), está em consonância com os achados do presente estudo, tendo em vista que dos 27 isolados de *P. zopfii*, 92,6% mostraram resistência múltipla à ampicilina, cefoperazona, cloxacilina, enrofloxacin, florfenicol, neomicina e tetraciclina. Interessantemente, estes antimicrobianos ineficazes frente às linhagens da alga compõem a grande maioria dos princípios ativos dos anti-mastíticos disponíveis comercialmente no Brasil para infusão intramamária em bovinos (RIBEIRO, 2007), impossibilitando a indicação destas drogas na terapia da prototecose mamária.

Determinadas drogas de ação anti-fúngica também tem sido testadas “in vitro” frente às algas do gênero *Prototheca*. A nistatina é a droga que têm mostrado melhor efetividade “in vitro” (FRANK et al., 1969; CASAL & AROCA, 1983; MCDONALD et al 1984b; MARQUES et al., 2006). Camargo (1978) verificou que a concentração algicida mínima “in vitro” da nistatina para estirpes de *P. zopfii* seria 50µg/mL. Malinowsky et al. (2002) encontrou somente 21,4% de sensibilidade em 28 estirpes de *P. zopfii* isoladas de mastite frente à nistatina. Diferentemente, nas 27 linhagens utilizadas, foi observada sensibilidade “in vitro” de todos os isolados à nistatina. Apesar da sensibilidade “in vitro”, o uso da nistatina “in vivo” tem mostrado resultados pouco satisfatórios. No Brasil, Costa et

al. (1996b) avaliaram o uso intramamário da nistatina em cinco quartos mamários de vacas infectadas por *Prototheca* spp, dos quais apenas um apresentou cura clínica e microbiológica.

A nistatina ou fungicidina é um antimicrobiano pertencente ao grupo dos poliênicos, extraída de culturas do *Streptomyces noursei*. Os poliênicos possuem elevada ação contra fungos, protozoários e algas, não demonstrando ação notória frente a bactérias. Possuem ação tóxica sobre as células de algas, fungos e protozoários, por ligarem-se às membranas citoplasmáticas destes microrganismos, alterando a permeabilidade seletiva da membrana provocando sua desorganização funcional, com deterioração metabólica e morte celular (TAVARES, 2002). A sensibilidade da nistatina frente aos 27 isolados do presente estudo pode ser creditada à ação da droga na parede celular da alga, alterando a permeabilidade da membrana, culminando com a morte celular.

A nistatina e a gentamicina foram as drogas que mostraram efetividade satisfatória frente às 27 linhagens de *P. zopfii* isoladas do leite de vacas. Estas drogas estão disponíveis comercialmente para a infusão intramamária, representando alternativas terapêuticas para animais de elevado valor zootécnico acometidos por prototecose mamária. No entanto, ensaios terapêuticos “in vivo” conduzidos por outros autores têm mostrado baixa resposta terapêutica na prototecose, mesmo infundindo antimicrobianos via intramamária respaldados por boa efetividade “in vitro”. Assume-se que a refratariedade do gênero *Prototheca* à terapia convencional com antimicrobianos pode ser justificada pela indução de reação piogranulomatosa, que restringe a capacidade do antimicrobiano em alcançar concentrações terapêuticas no foco de infecção. Os achados do presente trabalho sugerem que poderiam ser conduzidos estudos avaliando a associação sinérgica de antimicrobianos e/ou antifúngicos que apresentem efetividade “in vitro” contra linhagens de *P. zopfii*, ou mesmo a associação destas drogas efetivas com produtos permeantes de membranas biológicas, como o dimetilsulfóxido, ou imuno-estimulantes, como o *Propionibacterium acnes*, que favoreçam, respectivamente, a ação das drogas no foco infeccioso ou a resposta imune local.

Tendo em vista os insucessos terapêuticos utilizando antimicrobianos convencionais, diversos anti-sépticos têm sido empregados alternativamente “in vitro” ou “in vivo” com objetivo de tratamento da prototecose mamária (LANGONI et al. 1995; COSTA et al., 1996 b,c). Partindo deste pressuposto, objetivou-se investigar a “concentração algicida mínima” das linhagens de *P. zoppii* isoladas de mastite bovina frente a diferentes concentrações de iodo e hipoclorito de sódio, considerados produtos de boa ação microbicida e de baixo custo, com vistas a utilizar estes anti-sépticos na higienização dos tetos e utensílios de ordenha, no pré e pós-dipping e/ou na ablação química de quartos acometidos.

O hipoclorito de sódio pertence ao grupo dos halogênios. Têm excelente espectro de ação sobre diversos microrganismos, atuando em seu sistema enzimático provocando alterações estruturais na parede celular (HOFFMANN et al., 1995). No Brasil, devido ao baixo custo, fácil aquisição e elevado poder microbicida, o hipoclorito de sódio (1% a 15 % de cloro ativo) é amplamente utilizado em laticínios e propriedades rurais na desinfecção de pisos, paredes, utensílios e equipamentos, bem como para a higienização de água e anti-sepsia da glândula mamária bovina no pré e pós-dipping (DOMINGUES & LANGONI, 2001). Ribeiro (1999) assinala que este anti-séptico é recomendado no pré-dipping de vacas entre as concentrações 0,8% a 1,2% e, no pós-dipping, a 4%. Domingues et al. (1996) observaram redução de 74,1% do número de microrganismos após a higienização dos tetos de vacas com soluções de hipoclorito de sódio a 3%. Silva et al. (2002) observaram elevada cura clínica de glândulas mamárias bovinas afetadas por abscessos, quando lavadas no pós-operatório com soluções de hipoclorito de sódio a 1%.

Ribeiro (1996) não obteve êxito em testes “in vitro” empregando o hipoclorito de sódio a 0,5%, entre 30 segundos a 1 minuto de contato, frente a 11 estirpes de *P. zoppii* isoladas de mastite no Brasil. Pedrini & Margatho (2003) observaram bom desempenho “in vitro” do anti-séptico a 2% frente a diversos microrganismos causadores de mastite ambiental e contagiosa, embora não tenham observado efeito microbicida em concentrações iguais ou inferiores a 0,5%. Diferentemente dos achados de Ribeiro (1996) e Pedrini & Margatho (2003), no presente estudo

foi encontrado efeito algicida satisfatório para o hipoclorito de sódio, para os 27 isolados, em baixas concentrações (0,03% a 0,15%). A discrepância observada entre os diferentes autores quanto ao limite de efetividade da concentração do hipoclorito de sódio, pode ser creditada ao método “in vitro” utilizado e ao tempo de exposição do produto às linhagens, cuja efetividade tende a aumentar quando o período de contato da droga com os microrganismos é prolongado.

À semelhança do hipoclorito, o iodo também é reconhecido como um efetivo anti-séptico pertence ao grupo dos halogênios. Possui alto poder de penetração celular levando a desnaturação, precipitação de proteínas e oxidação de enzimas essenciais, interferindo nas reações metabólicas vitais do microrganismo (SPINOSA et al., 1999). Em propriedades leiteiras o iodo é indicado na rotina de ordenha para pré e pós-dipping com vistas à prevenção e controle de mastite em rebanhos. No pré-dipping usualmente é recomendado na concentração de 0,1% e no pós-dipping entre 0,5% a 1% (RIBEIRO, 1999). Boddie et al. (1993) afirmaram que a utilização de iodo a 1% no pós-dipping resultou em queda no número de novos casos de mastite em vacas por microrganismos de origem contagiosa. Pedrini & Margatho (2003) ao investigarem a efetividade “in vitro” de solução de iodo a 1% e 2% observaram ótima ação microbicida para vários patógenos de mastite.

No presente estudo, a tintura de iodo mostrou efeito algicida para as 27 linhagens de *P. zoppii* em concentrações que variaram de 0,15% a 0,62%. Em contraste, Ribeiro (1996) não obteve sucesso com a utilização de iodo a 0,5% em testes “in vitro”, frente às linhagens de *P. zoppii* isoladas de vacas com mastite.

A despeito da boa efetividade “in vitro” do hipoclorito de sódio e tintura de iodo nas 27 linhagens de *P. zoppii*, o hipoclorito apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao iodo. Este achado indica que o hipoclorito possui bom efeito algicida frente a *P. zoppii*, mesmo em baixas concentrações.

O pré-dipping é reconhecido como importante procedimento de profilaxia e controle da mastite bovina, notadamente para microrganismos ambientais, como *P. zoppii* e, comumente, é recomendado em menores concentrações

comparativamente ao pós-dipping, com intuito de evitar irritações no teto, desgaste ou corrosões do equipamento de ordenha. Os achados do presente estudo mostraram sensibilidade “in vitro” das linhagens de *P. zopffii* a partir de 0,03%, sugerindo que o hipoclorito de sódio poderia ser utilizado como alternativa de solução anti-séptica para o pré-dipping em rebanhos leiteiros acometidos por prototecose mamária. Entretanto, deve-se considerar que diferentes fatores podem concorrer para a diminuição da efetividade do produto no pré-dipping, incluindo a presença de matéria orgânica e baixo tempo de exposição do teto ao produto, necessitando, provavelmente, de estudos de eficácia “in vivo” ou de elevação na concentração para que mantenha a eficiência na rotina de ordenha. Adicionalmente, a sensibilidade “in vitro” das linhagens de *P. zopffii* estudadas ao hipoclorito de sódio sugere também que este produto poderia ser indicado na higienização de ambientes e utensílios de ordenha em propriedades com histórico de prototecose, ou mesmo em concentrações mais elevadas, na ablação química de tetos infectados por *P. zopffii*.

De maneira similar, o iodo revelou efeito algicida “in vitro” frente aos isolados de *P. zopffii*. Este anti-séptico tem sido preferencialmente utilizado no pós-dipping, com ótima ação profilática e de controle para microrganismos contagiosos de mastite bovina, indicado geralmente, em concentrações mais elevadas que no pré-dipping. Com base nos resultados do presente estudo, sugere-se que o iodo possa ser recomendado como anti-séptico no pós-dipping para rebanhos leiteiros infectados por *P. zopffii*, bem como na ablação química de quartos mamários infectados.

A dificuldade em estabelecer protocolos terapêuticos efetivos na prototecose mamária bovina, com custo acessível ao produtor, com reprodutibilidade de resultados, baixa agressão ao epitélio mamário e/ou com produto/droga que não propicie a presença de resíduos por período prolongado no leite, tem se constituído em um desafio para os pesquisadores ligados ao estudo de mastite e qualidade do leite. Com efeito, este entrave na conduta terapêutica dos casos e surtos tem calcado a profilaxia e o controle da prototecose em bovinos, em medidas específicas como descarte das fêmeas infectadas ou ablação química de

tetos acometidos. Adicionalmente, têm-se recomendado medidas gerais como o controle da saúde da glândula mamária em fêmeas recém-adquiridas, adoção de medidas rotineiras de diagnóstico de mastite (incluindo caneca telada, CMT, contagem de células somáticas), o envio de leite para laboratórios de apoio diagnóstico veterinário, higienização periódica de instalações na prática da ordenha e correta anti-sepsia em tratamentos intramamários.

A infecção pelo gênero *Prototheca* no homem é considerada incomum. A principal manifestação clínica da prototecose em seres humanos é a forma cutânea e, secundariamente representada por distúrbios entéricos, articulares e em formas generalizadas. Em indivíduos imuno-competentes o microrganismo possui baixa virulência, porém, assume importância em pacientes imunossuprimidos, notadamente acometidos pelo vírus da aids (RANJAN et al., 2006). Em que pese à predominância de manifestações clínicas na prototecose mamária, a alga também tem sido isolada de vacas com mastite subclínica (RIBEIRO et al., 1999; COSTA et al. 1999), de maneira similar aos achados do presente estudo. Melville et al. (1999) assinalaram experimentalmente no Brasil, a termo-resistência do gênero *Prototheca*, submetendo a alga às condições usuais de tempo e temperatura empregadas nos processos de pasteurização lenta e rápida. Costa et al. (1995) reportaram distúrbio entérico em homem voluntário que consumiu leite contaminado por *P. zopfii*. Considerando que grande parcela do leite nacional ainda é comercializado sem inspeção sanitária, o hábito do consumo do leite e derivados sem tratamento térmico, a possibilidade do encaminhamento para laticínios e o consumo de leite de vacas com mastite subclínica e a relativa termo-resistência da alga, deve-se alertar para os riscos em saúde pública representados pela manutenção nos rebanhos de vacas com prototecose mamária e conseqüente consumo de leite contaminado por *P. zopfii*.

Em 2001, um grupo de pesquisadores alemães da Universidade de Leipzig investigou pioneiramente as características moleculares de *P. zopfii* e as propriedades de assimilação de substratos, propondo a classificação da espécie em três biotipos denominados I, II e III (ROESLER et al., 2001). O detalhamento destes estudos, com base em biologia molecular, possibilitou subseqüentemente,

a re-classificação dos biotipos I e II em genótipos 1 e 2. Na oportunidade, o biotipo III foi sugerido como nova espécie denominada *P. blaschkeae*, em virtude de sua diversidade ou baixa homologia com os genótipos 1 e 2 (ROESLER et al., 2006). Investigações na Europa quanto ao perfil genotípico de linhagens de *P. zopfii* isoladas de vacas com mastite, tem caracterizado o genótipo 2. No presente estudo, as 27 linhagens de *P. zopfii* isoladas do leite de vacas também foram caracterizadas como pertencentes ao genótipo 2. Dentre a literatura consultada, não foi possível identificar estudos no Brasil, tampouco nas Américas, conduzidos na caracterização genotípica de linhagens de *P. zopfii* isoladas do leite de bovinos, que permitissem a comparação do perfil genotípico dos 27 isolados. Assim, os achados do presente estudo descrevem pela primeira vez no Brasil, a caracterização genotípica de 27 linhagens de *P. zopfii* isoladas de vacas com mastite clínica ou subclínica e uma estirpe oriunda de tanque de expansão.

Interessantemente, Farias et al. (2006) descreveram recentemente o primeiro caso de prototecose em animal de companhia no Brasil, em cão com sinais de enterocolite hemorrágica, que possuía acesso ao ambiente rural de criação de vacas de leite. Subseqüente, esta linhagem de *P. zopfii* isolada do cão foi submetida à caracterização genotípica, revelando pertencer também ao genótipo 2, aventando-se que o estreito contato com bovinos e seu ambiente de criação poderiam ter contribuído na veiculação da alga do ambiente para o cão, mediante a ingestão de água e/ou alimentos contaminados.

Estudos da epidemiologia molecular de enfermidades infecciosas têm permitido avanços significativos no entendimento da virulência e dos mecanismos de transmissão de patógenos. A caracterização genotípica de linhagens de *P. zopfii* isoladas de animais, certamente amplia as perspectivas para o esclarecimento da epidemiologia da prototecose que, conseqüentemente, possa subsidiar conhecimentos para ações de controle e profilaxia, que contribuam na redução do impacto econômico da doença e nos riscos em saúde pública.

7 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo permitiram inferir que:

- O perfil de sensibilidade microbiana “in vitro” revelou que a nistatina (100,0%) e a gentamicina (66,7%) foram os antimicrobianos mais efetivos frente aos isolados. No entanto, estudos “in vivo” devem ser conduzidos, com o intuito de avaliar a associação sinérgica de antimicrobianos que apresentem efeito algicida “in vitro”, ou mesmo a associação destas drogas com produtos permeantes de membranas biológicas, que favoreçam a ação da droga no foco infeccioso, tendo em vista a cura da prototecose mamária em bovinos.

- A alta frequência de resistência múltipla aos antimicrobianos foi observada na maioria dos isolados, especialmente para ampicilina, cefoperazona, cloxacilina, enrofloxacina, florfenicol, neomicina e tetraciclina, reforçando a característica de multi-resistência de linhagens de *P. zopfii* isoladas do leite de vacas, frente aos antimicrobianos convencionais disponíveis para terapia intramamária em bovinos, dificultando sobremaneira a adoção de protocolos terapêuticos na prototecose mamária;

- O hipoclorito de sódio e o iodo mostraram efeito algicida “in vitro” frente a todos os isolados, em baixas concentrações, possibilitando o uso destes anti-sépticos na higienização de ambiente e utensílios de ordenha, no pré e pós-dipping em propriedades com prototecose mamária, assim como na ablação química de quartos mamários acometidos por *P. zopfii*;

- Todas as linhagens de *P. zopfii* foram caracterizadas como pertencentes ao genótipo 2 – de maneira similar ao perfil genotípico de isolados da alga encontrados em mastite bovina na Europa –, indicando que este genótipo provavelmente é predominante em estirpes isoladas do leite de vacas infectadas, assumindo grande importância para os estudos da prototecose mamária no contexto de saúde animal e de saúde pública.

8 REFERÊNCIAS*

AALBAEK, B.; STENDERUP, J.; JENSEN, H.E.; VALBAK, J.; NYLIN, B.; HUDA, A. Mycotic and algal bovine mastitis in Denmark. **Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.**, v.102, p.451-456, 1994.

ABACARA, M.L.; RUANO, L.; TORRE, E.; CABANES, F.J. Subclinical bovine mastitis caused by *Prototheca zopfii* in Spain. **J. Mycol. Med.**, v.11, p.159-160, 2001.

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3.ed. Washington: Organización Panamericana de La Salud, 2001. 398p.

AGOSTINI, A.A. Prototecose do cotovelo: relato de um caso. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v.29, p.178-179, 1983.

AHBEL, D.; ALEXANDER, A.; KLEINE, M.; LICHTMAN, D. Protothecal olecranon bursitis. A case report and review of the literature. **J. Bone. Joint. Surg.**, v.62, p.835-836, 1980.

ALMERAYA, A.P. Aislamento de *Prototheca* em un brote de mastitis bovina. **Vet. Mex.**, v.25, p.65-67, 1994.

ANDERSON, K.L.; WALKER, R.L. Sources of *Prototheca* spp in a dairy herd environment. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.193, p.553-556, 1988.

ARNOLD, P.; AHEARN, D.G. The systematics of the genus *Prototheca* with a description of a new species *P. filamenta*. **Mycologia**, v.64, p.265-275, 1972.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 22p.
BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

ATKINSON, A.W.; CUNNING, B.E.S.; JOHN, P.C.L. Sporopollenin in the cell wall of *Chlorella* and other algae: ultrastructure, chemistry and incorporation of ¹⁴C-acetate, studied in synchronous cultures. **Planta**, v.107, p.1-32, 1972.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk methods. **Am. J. Clin. Pathol.**, v.45, p.493-496, 1966.

BENITES, N.R.; MELVILLE, P.A.; GUERRA, J.L.; SINHORINI, I.L.; COSTA, E.O. Estudo de microscopia eletrônica de *Prototheca zopfii* e avaliação histopatológica de glândulas mamárias por ela infectadas. **NAPGAMA**, v.2, p.22-26, 1999.

BERROCAL, A.; RODRÍGUEZ, J.; VALVERDE, A. Prototecosis sistêmica en un canino. Descripción patológica de un caso. **Arch. Med. Vet.**, v.29, p.1-9, 1997.

BEXIGA, R.; CAVACO, L.; VILELA, C.L. Isolamento de *Prototheca zopfii* a partir de leite bovino. **Rev. Port. Ciênc. Vet.**, v. 98, p. 33-37, 2003.

BICUDO, C.E.; MENEZES, M. **Gêneros de algas continentais do Brasil** (chave para identificação e descrições). 2.ed. São Carlos: Rima, 2006. 508p.

BIER, O. **Bacteriologia e imunologia**. 23.ed. São Paulo: Melhoramentos, 1984. 1234p.

BLOCK, S.S. **Desinfection, sterilization and preservation**. 4.ed. London: Lea & Febiger, 1991 p.18-24.

BODENHOFF, J.; MADSEN, P.S. Bovine protothecosis: a brief report of ten cases. **Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.**, v.86, p.51-52, 1978.

BODDIE, R.L.; NICKERSON, S.C.; ADKINSON, R.W. Evaluation of teat germicides of low iodine concentrations for prevention of bovine mastitis by *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*. **Prev. Vet. Med.**, v.16, p.11-117, 1993.

BOLD, H.C.; WYNNE, M.J. **Introduction to the algae**. 2.ed. Nova Jersey: Prentice-Hall, 1985.

BRITO, M.A.V.P.; VEIGA, V. M.O.; RIBEIRO, M.T.; BRITO, J.R.F. Mastite clínica causada por *Prototheca* sp. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE MEDICINA VETERINÁRIA EM LÍNGUA PORTUGUESA, 6., Salvador, 1994. **Anais...** Salvador, 1994 p.225.

BRITO, M.A.V.P.; VEIGA, V.M.O. Mastite bovina causada por *Prototheca zopfii* Relato de um caso. **Ciênc. Rural**, v.27, p.681-684, 1997.

BUTLER, E. Radiation-induced chlorophyll-less mutants of *Chlorella*. **Science**, v.120, p.274–275, 1954.

BUENO, V.F.F.; MESQUITA, A.J.; NEVES, R.B.S.; SOUZA, M.A.; RIBEIRO, A.R.; NICOLAU, E.S.; OLIVEIRA, A.N. Epidemiological and clinical aspects of the first outbreak of bovine mastitis caused by *Prototheca zopfii* in Goiás State, Brasil. **Mycopathologia**, v.161, p.141-145, 2006.

BUZZINI, P.; TURCHETTI, B.; FACCELI, R.; BAUDINO, R.; CAVARERO, F.; MATTALIA, L.; MOSSO, P.; MARTINI, A. First large-scale isolation of *Prototheca zopfii* from Milk produced by dairy herds in Italy. **Mycopathologia**, v.158, p.427-430, 2004.

CAMARGO, Z.P. **Algas do gênero *Prototheca*: características microbiológicas e imunológicas**. 1978. 82f. Tese (Doutorado) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.

CAMARGO, Z.P.; FISCHMAN, O. Use of morpho-physiological characteristics for differentiation of the species of *Prototheca*. **Sabouraudia**, v.17, p.275-278, 1979.

CASAL, M.; AROCA, J.G. Investigación de la sensibilidad de *Prototheca zopfii* a los antifúngicos, quimioterápicos y sulfamidas. **Rev. Latinoam. Microbiol.**, v.25, p.259-262, 1983.

CASAL, M.; GUTIERREZ, J. Investigación preliminary de la acción inhibitoria “in vitro” de los antibióticos frente a las algas del genero *Prototheca*. **Mycopathologia** v.75, p.45-49, 1981.

CASAL, M.; GUTIERREZ, J. A simple new test for rapid differentiation of *Prototheca wickerhamii* from *Prototheca zopfii*. **J. Clin. Microbiol.**, v.18, p.922-993, 1983.

CHAN, J.C.; JEFFERS, L.J.; GOULD, E.W.; HUTSON, D.; MARTINEZ, O.V.; REDDY, K.R; HASSAN, F.; SCHIFF, E.R. Visceral protothecosis mimicking sclerosing cholangitis in an immunocompetent host: successfull antifungal therapy. **Rev. Infect. Dis.**, v.12, p. 802-807, 1990.

CHAO, S.C.; HSU, M.M.L.; LEE, Y.Y. Cutaneous protothecosis: report of five cases. **Br. J. Dermatol.**, v.146, p.688-693, 2002.

CHEVILLE, N. F.; McDONALD, J.; RICHARD, J.L. Ultrastructure of *Prototheca zopfii* in bovine granulomatous mastitis. **Vet. Pathol.**, v.21, p.341-348, 1984.

CHODAT, R. Monographies d'algues en culture pure. **Mater. Flora Cryptog. Suisse**, v.4, p.234–241, 1913.

CHUANG, S.T.; SHYU, C.L.; CHAN, P.W.J.; FUNG, H.P. Isolation and identification of *Prototheca zopfii* from bovine mastitis in Taiwan. **Taiwan Vet. J.**, v.28, p.94-98, 2002.

CLSI/NCCLS - **Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão.** 8. ed. 2003. Disponível em: <http://sbmicrobiologia.org.br/clsi_OPASM2-A8.pdf>, Acesso em: 26 set. 2007.

CORBELLINI, L.G.; DRIEMEIER, D.; CRUZ, M.; DIAS, M.M.; FERREIRO, L. Bovine mastitis dueto *Prototheca zopfii*: clinical, epidemiological and pathological aspects in a brazilian dairy herd. **Trop. Anim. Health Prod.**, v.33, p.463-470, 2001.

COSTA, E.O.; CARCIOFI, A.C.; MELVILLE, P.A.; PRADA, M.S.; SCHALCH, U. *Prototheca spp.* outbreak of bovine mastitis. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 13, 1992, Santiago. **Anais...** Santiago, 1992. p.92.

COSTA, E.O.; CARCIOFI, A.C.; MELVILLE, P.A.; PRADA, M.A.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E. Epidemiological studies on bovine protothecosis. In: CONGRESSO MONDIALE DI BUIATRIA, 18, 1994, Bolonha. **Proceedings...** Bolonha, 1994. p.853-855.

COSTA, E.O.; MELVILLE, P.A.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T. Relato de um caso de consumo de queijo fresco contaminado com *Prototheca spp.* In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PESQUISA EM MEDICINA VETERINÁRIA, 1, 1995, São Paulo. **Anais...** São Paulo, 1995. p.55.

COSTA, E.O.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T.; PARDO, R.B.; SILVA, J.B., SANCHES, R.B. An increased incidence of mastitis caused by *Prototheca* species and *Nocardia* species on a farm in São Paulo. **Vet. Res. Commun.**, v.20, p.237241, 1996a.

COSTA, E.O.; CARCIOFI, A.C.; MELVILLE, P.A.; SCHALCH, U. *Prototheca* sp outbreak of bovine mastitis. **J. Vet. Med.**, v. 43, p.321-324, 1996b.

COSTA, E.O.; MELVILLE, P.A.; BENITES, N.R.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T.; SILVA, J.A.B; GARINO, J.R. *Prototheca zopfii*: sensibilidade "in vitro". In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 24, Goiânia, 1996. **Anais...** Goiânia, 1996c, p.124.

COSTA, E.O.; MELVILLE, P.A.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T.; PAROLARI, M.C.F.F. Epidemiologic study of environmental sources in a *Prototheca zopfii* outbreak of bovine mastitis. **Mycopathologia**, v.137, p. 33-36, 1997.

COSTA, E.O.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T.; MELVILLE, P.A. Infectious bovine mastitis caused by environmental organisms. **Zentralbl. Veterinarmed. B.**, v.45, p.65-71, 1998.

COSTA, E.O.; RIBEIRO, A. R.; WATANABE, E.T.; GARINO JR., F.; SILVA, J.A.B.; JUNQUEIRA, L. Controle de surto de mastite por *Prototheca zopfii* em uma propriedade leiteira. **NAPGAMA**, v. 2, p.12-16, 1999.

COSTA, E.O.; GARINO JR., F.; MELVILLE, P.A.; RIBEIRO, A.R.; SILVA, J.A.B.; WATANABE, E.T.; VALLE, C.R. Estudo da etiologia das mastites bovinas nas sete principais bacias leiteiras do estado de São Paulo. **NAPGAMA**, v.4, p.6-13, 2000a.

COSTA, E.O.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T.; GARINO JR, F.; SILVA, J.A.B. Pesquisa de *Prototheca* sp em fezes de bezerros em propriedades que utilizam o leite de animais com mastite no manejo alimentar dos mesmos em comparação com as que não utilizam. **NAPGAMA**, v.1, p.20-22, 2000b.

COSTA, E. O.; GARINO JR., F.; RIBEIRO, A. R.; WATANABE, E. T.; SILVA, J. B.; DINIZ, L. S. Participação de animais silvestres na cadeia epidemiológica da mastite bovina por *Prototheca zopfii*. **NAPGAMA**, v.4, p.6-9, 2001.

COSTA, E.O.; RIBEIRO, M.G; ROCHA, N.S.; NARDI, G.J. Diagnosis of clinical bovine mastitis by fine needle aspiration followed by staining and scanning electron microscopy in a *Prototheca zopfii* outbreak. **Mycopathologia**, v.158, p.81-85, 2004.

COSTA, G.M.; PEREIRA, U.P.; SILVA, M.A.; SILVA, N. *Prototheca zopfii* e *Candida* spp como agentes etiológicos da mastite em rebanhos leiteiros de Minas Gerais. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITE, 4., 2007, Botucatu. **Anais...** Botucatu, 2007. p. 93.

COX, G.; WILSON, J.; BROWN, P. Protothecosis: a case of disseminated algal infection. **Lancet**, v.2, p.379–382, 1974.

DAVIES, R.; SPENCER, H.; WAKELIN, P. A case of human protothecosis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.58, p.448–451, 1964.

DENTON, G.W. Chlorhexidine. In: BLOCK, S.S. **Desinfection, sterilization and preservation**, 4.ed. London: Lea & Febiger, 1991. p.274-287.

DILLBERGER, J.E.; HOMER, B.; DAUBERT, F.M.; ALTMAN, N.H. Protothecosis in two cats. **JAVMA**, v.192, p.1557-1559, 1988.

DION, W.M. Bovine mastitis due to *Prototheca zopfii*. **Can. Vet. J.**, v.20, p.221-222, 1979.

DOMINGUES, P.F.; LANGONI, H.; BALDINI, S.; CARRATORE, R.R.D. Dinâmica microbiológica externa do óstio do teto antes e após a higienização com hipoclorito de sódio à 3%. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 15., 1996, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande, 1996, p.252.

DOMINGUES, P.F.; ROCHA, N.S.; PADOVANI, C.R.; GONZALES, J.A.H.; BURINI, C.H. Citologia aspirativa por agulha fina (CAAF) em glândula mamária de vacas com mastite subclínica. **NAPGAMA**, v.4, p.17-19, 1999.

DOMINGUES, P.F.; LANGONI, H. **Manejo sanitário animal**. 1.ed. Rio de Janeiro: EPUB, 2001, 210p.

DRECHSLER, P.A.; WILDMAN, E.E.; PANKEY, J.W. Evaluation of a chlorous acid chlorine dioxide teat dip under experimental and natural exposure conditions. **J. Dairy Sci.**, v.73, p.2121-2128, 1990.

FARIAS, M.R.; RIBEIRO, M.G.; COSTA, F.A.; RODIGHIERI, S.M.; OSTRAWSKI, M.A.B. Colite crônica em cão, secundária a prototecose: primeiro relato no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA ANCLIVEPA, 27., 2006, Vitória. **Anais...** Vitória, 2006. p.60.

FILLIPSEN, L.F.; MOREIRA, F.B.; SAKASHITA, A.T.; BITTENCOURT, D.R. Prevalência da mastite bovina causada por *Prototheca zopfii* em rebanhos leiteiros, na região norte do Paraná. **Ciênc. Rural**, v.29, p.87-89, 1999.

FINNIE, J.W.; COLOE, P.J. Cutaneous protothecosis in a cat. **Aust. Vet. J.**, v.57, p.307-308, 1981.

FOX, L.K.; NAGY, J.A.; HILLERS, J.K.; CRONRATH, J.D.; RATKOWSKY, D.A. Effects of post milking teat treatment on the colonization of *Staphylococcus aureus* on chapped teat skin. **Am. J. Vet. Res.**, v.52, p.799-802, 1991.

FRANK, M.N.; FERGUSON, L.C.; CROSS, R.F.; REDMAN, D.R. *Prototheca*, a cause of bovine mastitis. **Am. J. Vet. Res.**, v.30, n.10, p.1785-1794, 1969.

FURUOKA, H.; ANRI, A.; ARITA, Y.; TUZUKI, N.; SATOH, H.; ITAKURA, C. Protothecal mastitis in cow. **Jpn. J. Vet Sci.**, v.51, p.197-199, 1989.

GAUNT, S.D.; McGRATH, R.K.; COX, H.U.; Disseminated protothecosis in a dog. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 85, p. 906-907, 1984.

GIBB, A.; AGGARWAL, R., SWAINSON, C. Successful treatment of *Prototheca* peritonitis complicating continuous ambulatory peritoneal dialysis. **J. Infect.**, v.22, p.183–185, 1991.

GINEI, P.J.; PÉREZ, J.; MOLLEDA, J.M.; LUCENA, R.; MOZOS, E. Cutaneous protothecosis in a dog. **Vet. Rec.**, v.140, p.651-653, 1997.

GOMES, M.J.P.; DRIEMEIER, D.; FERREIRO,L. Ocorrência de Casos de Mastite por *Prototheca zopfii* em Bovinos no Rio Grande do Sul. **NAPGAMA**, v.4, p. 4-8, 1999.

GONZÁLEZ, R.N.; BENNETT, G.J.; SICKLES, S.A.; HILAIRE, D.; NYDAM, D.V. *Prototheca* mastitis: effect on SCC and SPD. In: PANAMERICAN CONGRESS ON MASTITIS CONTROL AND MILK QUALITY, 1., 1998, Merida. **Proceedings...** Merida, 1998. p.232-235.

GOTARDI, W. Iodine and iodine compounds In: BLOCK, S.S. **Desinfection, sterilization and preservation**. 4.ed. London: Lea & Febiger, 1991. p.152-166.

GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3.ed. Canada: Saunders/Elsevier, 2006. 1387p.

HENEY, C.; GREEFF, M.; DAVIS, V. Hickman catheter-related protothecal algaemia in an immunocompromised child. **J. Infect. Dis.**, v.163, p.930-931, 1991.

HIGGINS, R; LAROUCHE, Y. Isolation and identification of *Prototheca*, an agent of bovine mastitis. **Med. Vet. Queb.**, v.19, p.140-141, 1989.

HODGES, R.T.; HOLLAND, J.T.S.; NEILSON, F.J.A.; WALLACE, N.M. *Prototheca zopfii* mastitis in a herd of dairy cows. **N. Z. Vet. J.**, v.33, p.108-111, 1985.

HOFFMANN F.L.; CRUZ C.H.C.; VINTURIM, T.M.; Determinação da atividade antibacteriana de desinfetantes. **Hig. Alimentar**, v.9, p.29-34, 1995.

HOLLINGSWORTH, S.R. Canine protothecosis. **Vet. Clin. North Am. Small. Anim. Pract.**, v.30, p.1091-1101, 2000.

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

IACOVIELLO, V.R.; GIROLAMI, P.C.; LUCARINI, J. SUTKER, K.; WANKE, C.A. Protothecosis complicating prolonged endotracheal intubation: case report and literature review. **Clin. Infect. Dis.**, v.15, p.959-967, 1992.

JÁNOSI, S.; RÁTZ, F.; LAUKÓ, T.; SZIGETI, G.; KERÉNYI, J.; TENK, M.; KATONA, F.; KULSCSÁR, M.; HUSZENICZ, G. *Prototheca zopfii* mastitis in cattle: first diagnosis in Hungary. **Magy. Allatorv. LAPJA**, v.122, p.7-14, 2000.

JÁNOSI, S.; RÁTZ, F.; SZIGETI, G.; KULCSÁR, M.; KERÉNYI, J.; LAUKÓ, T.; KATONA, F.; HUSZENICZA, G. Review of the microbiological, pathological and clinical aspects of bovine mastitis caused by the alga *Prototheca zopfii*. **Vet. Q.**, v.23, p.58-61, 2001.

JENSEN, H; AALBAEK, B.; BLOCH, B.; HUDA, A. Bovine mammary protothecosis due to *Prototheca zopfii*. **Med. Mycol.**, v.36, p.89–95, 1998.

JOSHI, K.; GAVIN, J.; WHEELER, E. The ultrastructure of *Prototheca wickerhamii*. **Mycopathologia**, v. 56, p.9–13, 1975.

KAMINSKY, Z.C.; KAOILAR, R.; SHARER, L.R.; KLOSER, P.; KAUFMAN, L. Meningitis due to *Prototheca wickerhamii* in a patient with AIDS. **Clin. Infect. Dis.**, v.5, p.704-706, 1992.

KAPLAN, W.; CHANDLER, F.W.; HOLZINGER, E.A.; PLUE, R.E.; DICKINSON, R.O. Protothecosis in a cat: first recorded cases. **Sabouraudia**, v.14, p.281-286, 1976.

KAPLAN, W. Protothecosis and infections caused by morphologically similar green algae. In: THE INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE MYCOSES, 4., 1977, Brasília. **Proceedings...**, Brasília, 1977. p.218-232. PAHO Scientific Publication, 356.

KATOCH, R.C.; NAGAL, K.B; SHARMA, M. Protothecal mastitis in a cow – a report. **Indian J. Anim. Sci.**, v.67, p.292-293, 1997.

KING, D.; JONG, S. *Sarcinosporon*: a new genus to accommodate *Trichosporon inkin* and *Prototheca filamentosa*. **Mycotaxon.**, v.3, p.84–94, 1975.

KINGWILL, R.G.; NEAVE, F.K.; DODD, F.H.; GRIFFIN, T.K.; WESTGARTH, D.R.; WILSON, C.D. The effect of a mastitis control system on levels of subclinical and clinical mastitis in two years. **Vet. Rec.**, p.94-100, 1970.

KRÜGER, W. Kurze Charakteristik einiger niedriger organismen im saftfluss der laubbaüme. **Hedwigia**, v.33, p.241–266, 1894.

KUNOVA, A.; KOLLAR, T.; SPANIK, S.; KRCME'RY JR., V. First report of *Prototheca wickerhamii* algaemia in an adult leukemic patient. **J. Chemother.**, v.8, p.166–167, 1996.

KUTTIN, E.S.; MULLER, J.; FELDMAN, M.; NERIYA, A.; UCHOVSKY, D.; SHAHAR, A. Protothecosis in Israel. **Israel J. Vet. Med.**, v.42, p.1-49, 1986.

LAGNEAU, P.E. First isolation of *Prototheca zopfii* in bovine mastitis in Belgium. **J. Mycol. Med.**, v.6, p.145-148, 1996.

LANGONI, H. *Prototheca zopfii* e mastite bovina: clínica e terapêutica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 22., 1992 Curitiba. **Anais...** Curitiba, 1992. p.125.

LANGONI, H.; DOMINGUES, P.F.; FUNARI, S.R.C.; DIAS, H.L.T. *Prototheca zopfii* como agente de mastite bovina: clínica e terapêutica. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 47, p.727-732, 1995.

LANGONI, H. Agentes emergentes na etiologia da mastite bovina. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v.19, p.238-240, 1997.

LANGONI, H. Complexidade etiológica da mastite bovina. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITE, 3., 1999, Botucatu. **Anais...** Botucatu, 1999. p.3-18.

LANGONI, H. Controle de afecções das glândulas mamárias: aspectos etio-epidemiológicos de diagnóstico, tratamento e profilaxia das mastites ovinas. In: ENCONTRO DE CAPRINOCULTORES DE CORTE NA BAHIA, 2003, Salvador. **Anais ...** Salvador, 2003. p.66-80.

LASS-FLÖRL, C.; MAYR, A. Human protothecosis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.20, p.230-242, 2007.

LERCHE, M. Eine durch algen (*Prototheca*) hervorgerufene mastitis der kuh. **Berl. Munch. Tierarstl. Wochenschr.**, v.65, p.64-69, 1952.

MALINOWSKY, E.; LASSA, H.; KLOSSOWSKA, A. Isolation of *Prototheca zopfii* from inflamed secretion of udders. **Bull. Vet. Inst. Pulawy.**, v.46, p.295-299, 2002.

MARCANO, C.; FEO, M. *Prototheca zopfii* residente de uña. **Mycopathologia**, v.75, p.89-92, 1981.

MARQUES, S.; SILVA, E.; CARVALHEIRA, J.; THOMPSON, G. Short communication: In vitro antimicrobial susceptibility of *Prototheca wickerhamii* and *Prototheca zopfii* isolated from bovine mastitis. **J. Dairy Sci.**, v.89, p.4202-4204, 2006.

McDONALD, J.S.; RICHARD, J.L.; CHEVILLE, N.F. Natural and experimental bovine intramammary infection with *Prototheca zopfii*. **Am. J. Vet. Res.**, v.45, p.592-595, 1984a.

McDONALD, J.S.; RICHARD, J.L.; ANDERSON, A.J. Antimicrobial Susceptibility of *Prototheca zopfii* Isolated from Bovine Intramammary Infections. **Am. J. Vet. Res.**, v.45, p.1079-1080, 1984b.

MELÓN, C.P.; CAMBA, M.; TINAJAS, A.; OTERO, A.; IGLESIAS, A.; ARMADA, E.; ESTEBAN, J. Peritonitis *Prototheca wickerhamii* in pacientes en diálisis peritoneal. **Nefrology**, v.27, n.1, p.81-82, 2007.

MELVILLE, P.A. **Estudos sobre algas do gênero *Prototheca* isoladas de leite e de infecções intramamárias em bovinos leiteiros.** 1995. 94f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

MELVILLE, P.A.; WATANABE, E.T.; BENITES, N.R.; RIBEIRO, A.R.; SILVA, J.A.G.; GARINO JR., F.; COSTA, E.O. Evaluation of the susceptibility of *Prototheca zopfii* to milk pasteurization. **Mycopathologia**, v.146, p.79-82, 1999.

MELVILLE, P.A. **Correlação de morfotipos de *Prototheca zopfii* com perfis de susceptibilidade “in vitro” aos antibióticos e quimioterápicos e estudo da ultraestrutura após exposição aos antimicrobianos.** 2000. 99f. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MELVILLE, P.A.; BENITES, N.R.; SINHORINI, I.L.; COSTA, E.O. Susceptibility and features of the ultrastructure of *Prototheca zopfii* following exposure to copper sulphate, silver nitrate and chlorexidine. **Mycopathologia**, v.156, p.1-7, 2002.

MENDES, M.J.S; LACAZ, C.S. Ação “in vitro” do ketoconazol sobre prototecas e *Fissuricella filamenta*. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v.22, p.306-309, 1980.

MERIANOS, J.J. Quaternary ammonium antimicrobial compounds In: BLOCK, S.S. **Desinfection, sterilization and preservation** 4.ed. London: Lea & Febiger, 1991. p.225-252.

MIGAKI, G.; GARDNER, F.M.; IMES, G.D. Bovine protothecosis: A report of three cases. **Pathol. Vet.**, v.6, p.444-453, 1969.

MIGAKI, G.; FONT, R.L.; SAUER, R.M.; KAPLAN, W. Canine protothecosis: review of the literature and report of an additional case. **JAVMA**, v.181, p.794-797, 1982.

MOHABEER, A. J.; KAPLAN, P. J., SOUTHERN JR., P. M.; GANDER, R. M. Algaemia due to *Prototheca wickerhamii* in a patient with myasthenia gravis. **J. Clin. Microbiol.**, v.35, p.3305–3307, 1997.

MÖLLER, A.; TRUYEN, U.; ROESLER, U. *Prototheca zopfii* genotype 2. The causative agent of bovine protothecal mastitis. **Vet. Microbiol.**, v.39, p.1-7, 2006.

NADAKAVUKAREN, M.J.; MCCRACKEN, D. *Prototheca*: an alga or fungus? **J. Phycol.**, v.9, p.113–116, 1973.

NARYSHKIN, S.; FRANK, I; NACHAMKIN, I. *Prototheca zopfii* isolated from a patient with olecranon bursitis. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.6, p.171–174, 1987.

NEAVE, F.K.; DODD, F.H.; KINGWILL, R.G.; WISTGARTH, D.R. Control of mastitis in the dairy herd by hygiene and management. **J. Dairy Sci.**, v.52, p.696-707, 1969.

NICKERSON, S.C.; WATTS, J.L.; BODDIE, R.L.; PANKEY, J.W. Evaluation of 0,5% and 1% iodophor teat dips on commercial dairies. **J. Dairy Sci.**, v.69, p.1693-1698, 1986.

NOSANCHUK, J.S.; GREENBERG, R.D. Protothecosis of the olecranon bursa caused by algae. **Am. J. Clin. Pathol.**, v.59, p.567-573, 1973.

OGNEAN, L.; SPINU, M.; TIMES, S.; COZMA, V.; ROMAN, M.; MERLESCU, L.; NEGREA, O. Investigations of aetiology and pathogenesis of different types of mastitis in cows of the Romanian pied breed. **Bul. Inst. Agron. Cluj-NAPOCA. Ser. ZooteH. Med. Vet.**, v.46, p.237-246, 1992.

PADHYE, A.; BAKER, J.; D'AMATO, F. Rapid identification of *Prototheca* species by the API 20C system. **J. Clin. Microbiol.**, v.10, p.579–582, 1979.

PANKEY, J.W.R.J.; EBERHART, A.L.; COMING, R.D.; DAGGETT, R.J.; FARNSWORTH, R.J.; MCDOFF, C.K. Update on postmilking teat antiseptics. **J. Dairy Sci.**, v.67, p.1336-1353, 1984.

PEDRINI, S.C.B.; MARGATHO, L.F.F. Sensibilidade de microrganismos patogênicos isolados de casos de mastite clínica em bovinos frente a diferentes tipos de desinfetantes. **Arq. Inst. Biol.**, v.70, p.391-395, 2003.

PHILPOT, W.N.; PANKEY, J.W. Hygiene in the prevention of udder infections. Efficacy of the teat dips under experimental exposure to mastitis pathogens. **J. Dairy Sci.**, v.61, p.956-963, 1978.

PIYOPHIRAPONG, S.; LINPIYAWAN, R.; MAHAISAVARIYA, P.; MUANPRASAT, C.; CHAIPRASERT, A.; SUTHIPINITTHARM, P. Cutaneous protothecosis in an AIDS patient. **Br. J. Dermatol.**, v.146, p.713–715, 2002.

POYTON, R.; BRANTON, D. Control of daughter-cell number variation in multiple fission: genetic versus environmental determinants in *Prototheca*. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.69, p.2346–2350, 1972.

PORE, R.S. Nutritional basis for relating *Prototheca* and *Chlorella*. **Can. J. Microbiol.**, v.18, p.1175–1177, 1972.

PORE, R.S.; D'AMATO, R.F.; AJELLO, L. *Fissuricella* gen. nov.: a new taxon for *Prototheca filamenta*. **Sabouraudia**, v.15, p.69–78, 1977.

PORE, R.S.; BARNETT, E.A.; BARNES Jr, W. C.; WALKER, J. D. *Prototheca* ecology. **Mycopathologia**, v. 81, p. 49-62, 1983.

PORE, R.S. *Prototheca* taxonomy. **Mycopathologia**, v. 90, p.129-139, 1985.

PORE, R.S.; SHAHAN, T.A.; PORE, M.D.; BLAUWIEKEL, R. Occurrence of *Prototheca zopfii*, a mastitis pathogen in milk. **Vet. Microbiol.**, v.15, p.315-323, 1987.

PORRAS, A.A. Aslamiento de *Prototheca* em um brote, de mastitis bovina. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 14. 1994, Acapulco, **Proceedings...** Acapulco, 1994, p.38.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. São Paulo: Artmed, 2005. 512p.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W. **Veterinary medicine: a textbook of the disease of cattle, horses, sheep, pigs and goats**. 10.ed. Philadelphia: Saunders, 2007. p. 673-762.

RANJAN, R.; SWARUP, D.; PATRA, R.C.; NANDI, D. Bovine protothecal mastitis: a review. **Perspect. Agric. Vet. Sci. Nutr. Nat. Res.**, v.1, p.1-7, 2006.

RAZ, R.; ROTTEM, M.; BISHARAT, N.; SAKRAN, W; NUSSINSON, E.; TROUGOUBOFF, P.; SOBEL, J. Intestinal protothecosis in a patient with chronic mucocutaneous candidiasis. **Clin. Infect. Dis.**, v.27, p.399–400, 1998.

RIBEIRO, A.R. **A influência da anti-sepsia pós-ordenha na ocorrência de mastite bovina**. 1996. 124f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

RIBEIRO, A.R. Desinfecção e desinfetantes no pré e pós-ordenha. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITE, 3., 1999, Botucatu. **Anais...** Botucatu, 1999. p.63-69.

RIBEIRO, A.R. **Estudo da mastite bovina causada por microrganismos ambientais**: influência do manejo e higiene, sazonalidade e qualidade microbiológica da água. 2001. 138f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

RIBEIRO, M.G. Princípios Terapêuticos na Mastite em Animais de Produção e de Companhia. In: Sílvia Franco Andrade. **Manual de Terapêutica Veterinária**. São Paulo: Roca, 2007 v.3, p. 01-05.

RIBEIRO, M. G.; LANGONI, H.; SILVEIRA, A. M.; RUFFINO, S. M. Mastite bovina por *Prototheca zopfii*. Relato de caso e revisão de literatura. **Biológico**, v.60, p.1-7, 1998.

RIBEIRO, M.G.; COSTA, E.O.; ROCHA, N.S.; DOMINGUES, P.F.; RIBEIRO, A. R.; NARDI JR., G. Citologia aspirativa com agulha fina microscopia eletrônica de varredura no diagnóstico de mastite clínica bovina por *Prototheca zopfii*. **NAPGAMA**, v. 2, p.15-20, 1999.

RIBEIRO, M.G.; ALMEIDA, C.A.S.; LISTONI, F.J.P.; SIQUEIRA, A.K.; SALERNO, T. In vitro effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) and fluconazole in minimal inhibitory concentration in *Prototheca zopfii* strains isolated from bovine mastitis in Brazil. **Rev. Ciênc. Vet.**, v.4, p.18, 2006.

RIPPON, J.W. **Medical mycology**: the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. 3.ed. Filadélfia: Saunders, 1988.

ROESLER, U.; SCHOLZ, H.; HENSEL, A. Immunodiagnostic identification of dairy cows infected with *Prototheca zopfii* at various clinical stages and discrimination between infected and uninfected cows. **J. Clin. Microbiol.**, v.39, p.539-543, 2001.

ROESLER, U.; HENSEL, A. Longitudinal analysis of *Prototheca zopfii* specific immune responses: correlation with disease, progression and carriage in dairy cows. **J. Clin. Microbiol.**, v.41, p.1181-186, 2003.

ROESLER, U.; SCHOLZ, H.; HENSEL, A. Emended phenotypic characterization of *Prototheca zopfii*: a proposal for three biotypes and standards for their identification. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.53, p.1195-1199, 2003.

ROESLER, U.; MÖLLER, A.; HENSEL, A.; BAUMANN, D.; TRUYEN, U. Diversity within the current algal species *Prototheca zopfii*: a proposal for two *Prototheca zopfii* genotypes and description of a novel species, *Prototheca blaschkeae* sp. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.56, p.1-7, 2006.

ROESLER, U. **Prototheca**. Disponível em <<http://www.prototheca.com>> Acesso em: 28 set 2007.

ROGERS, R.J. Protothecal lymphadenitis in an ox. **Aust. Vet. J.** v.30, p.281-282, 1974.

RUSSOF, L.L. Milk: it's nutritional value at a low cost for people of all ages. **J. Dairy Sci.**, v.53, p.1296-1302, 1970.

SANDS, M.; POPPEL, D.; BROWN, R. Peritonitis due to *Prototheca wickerhamii* in a patient undergoing chronic ambulatory peritoneal dialysis. **Rev. Infect. Dis.**, v.13, p.376–378, 1991.

SCHALM, O.W.; CARROL, E.; JAIN, N.C. **Bovine mastitis**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1971. 360p.

SHNAWA, I.M.S.; AL-SADI, H.I. A note on protothecal infection in farm animals. **Int. J. Anim. Sci.**, v.5, p.271, 1990.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1997. 295p.

SILVA, L.A.F.; COELHO, K.O.; BUENO, V.V.F.; MESQUITA, A.J.; FIORAVANTI, M.C.S.; NICOLAU, E.S.; CASTRO, G.R. Estudo etiológico de abscessos mamários em vacas leiteiras e utilização do hipoclorito de sódio a 1% no tratamento pós-operatório. **NAPGAMA**, v.5, p.7-11, 2002.

SIQUEIRA, A.K.; RIBEIRO, M.G.; SALERNO, T. Prototecose em animais de companhia e aspectos da doença no homem. **Ciênc. Rural**, v. 38, 2008 (no prelo).

SMITH, B.P. **Tratado de medicina interna de grandes animais**. 1.ed. São Paulo: Manole Ltda, 1994. v.2, p.1041-1060.

SPALTON, D.E. Bovine mastitis caused by *Prototheca zopfii*: a case study. **Vet. Rec.**, v.116, p.347-349, 1985.

SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, 656p.

SUDMAN, M.; KAPLAN, W. Identification of the *Prototheca* species by immunofluorescence. **Appl. Microbiol.**, v.25, p.981–990, 1973.

SUDMAN, M. Protothecosis: a critical review. **Am. J. Clin. Pathol.**, v.61, p.10–19, 1974.

TANIYAMA, H.; OKAMOTO, F.; KUROSAWA, T.; FURUOKA, H.; KAJI, Y.; OKADA, H.; MATSUKAWA, K. Disseminated protothecosis caused by *Prototheca zopfii* in a cow. **Vet. Pathol.**, v.31, p.123-125, 1994.

TARTE, M.; BECERRA, O.S.A.; VILLAREAL, A. Mastitits bovina clínica causada por algas del genero *Prototheca*. **Notas Vet.**, v.1, p.17-19, 1991.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2002. 1216p.

THIELE, D.; BERGMANN, A. Protothecosis in human medicine. **Int. J. Hyg. Environ. Health**, p. 297-302, 2002.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 718p.

TRIOLA, M.F. **Introdução à Estatística**. 7.ed. Rio de Janeiro: LTC, 1999.

TYLER, E.; LORENZ, M.D.; BLUE, J.L.; MUNNELL, J.F.; CHANDLER, F.W. Disseminated protothecosis with central nervous system involvement in a dog. **JAVMA**, v.176, p.987-993, 1980.

TYRING, S.K.; LEE, P.C.; WALSH, P.; GARNER, J.F.; LITTLE, W.P. Papular protothecosis of the chest. Immunologic evaluation and treatment with a

combination of oral tetracycline and topical amphotericin **Br. Arch. Dermatol.**, v.125, p.1249–1252, 1989.

UENO, R.; URANO, N.; WADA, S.; KIMURA, S. Optimization of heterotrophic culture conditions for n-alkane utilization and phylogenetic position based on the 18S rDNA sequence of a thermotolerant *Prototheca zopfii* strain. **J. Biosci. Bioeng.**, v.94, p.160-165, 2002.

VANDAMME, D.M. Use of miconazole in treatment of bovine mastitis. **Vet. Med. Small Anim. Clin.**, p.1427-1427, 1983.

VAN BEZOOIJEN, B.P.J.; NEWLING, D.W.W. Protothecosis of the urinary tract. **J. Urol.**, v.167, p.252, 2002.

VAN KRUININGEN, H.J. Protothecal enterocolitis in a dog. **JAVMA**, v.157, p.56-63, 1970.

VARGAS, A.C.; LAZZARI, A.; SANTURIO, J.M.; ALVES, S.H.; FERREIRA, G.; KREUTZ, L.C. Isolation of *Prototheca zopfii* from a case of bovine mastitis in Brazil. **Mycopathologia**, v.142, p.135-137, 1998.

VAZ, A.K.; CARNEIRO, D.M.V.F.; WOLFF, C.; DICK, W.; LUCIANO, A.M. Mastite bovina por *Prototheca* sp. em Santa Catarina: relato de caso. **Rev. Ciênc. Agrov.**, v.4, p.72-75, 2005.

WATTS, J.L. Etiological agents of bovine mastitis. **Vet. Microbiol.**, v.16, p.41-66, 1988.

WEBER, A.; ENDERS, F. The occurrence of *Prototheca* in fecal samples of domestic and wild swine. **Berl. Munch. Tieraerztl. Wochenschr.**, v.106, p.261-263, 1993.

WESEN, D.P.; SCHULTZ, I.h. Effectiveness of a post-milking teat dip in preventing new udder infections. **J. Dairy Sci.**, v.53, p.1391, 1970.

WIHELM, A.; BLASCHKE, H.R.; ZIERIS, H. Protothecal mastitis in cows. **Prakt. Tierarztl.**, v.73, p.556-560, 1992.

YAMAMURA, A.A.M.; MÜLLER, E.E.; GIORDANO, L.G.P.; 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 dos animais. **Ciênc. Agrár.**, v.28, p.105-114, 2007.

ZAITZ, C.; GODOY, A.M.; COLUCCI, F.M.; SOUSA, V.M.; RUIZ, L.R.B.; MASADA, A.S.; NOBRE, M.V.; MÜLLER, H.; MURAMATU, L.H.; ARRIGADA, G.L.H.; HEINS-VACCARI, E.M.; MARTINS, J.E.C. Cutaneous protothecosis: report a third brazilian case. **Int. J. Dermatol.**, v.45, p.124-126, 2006a.

ZAITZ, C.; GODOY, A.M.; SOUSA, V.M.; RUIZ, L.R.B.; MASADA, A.S.; NOBRE, M.V.; SANTOS, A.R.A.; MARQUES, A.C.; MURAMATU, L.H.; ARRIGADA, G.L.H.; HEINS-VACCARI, E.M.; MARTINS, J.E.C. Onychoprotechosis: report of the first case in Brazil. **Int. J. Dermatol.**, v.45, p.1071-1073, 2006b.

ZHANG, Q.Q.; ZHU, L.P.; WENG, X.H.; LI, L.; WANG, J.J. Meningitis due to *Prototheca wickerhamii*: rare case in China. **Med. Mycol.**, v.45, p.85-88, 2007.

ZHAO, J.; LIU, W.; LV, G.; SHEN, Y.; WU, S. Protothecosis successfully treated with amikacin combined with tetracyclines. **Mycoses**, v.47, p.156-158, 2004.

ANEXOS

ANEXO A

Quadro A - Linhagens de *P. zopfii* isoladas do leite de vacas de dez propriedades dos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Goiás.

Linhagens	Propriedade leiteira	Mastite/Tanque	Estado
1	A	Clínica	SP
2	A	Clínica	SP
3	A	Clínica	SP
4	A	Clínica	SP
5	A	Clínica	SP
6	A	Clínica	SP
7	A	Clínica	SP
8	A	Clínica	SP
9	A	Clínica	SP
10	A	Clínica	SP
11	A	Clínica	SP
12	A	Clínica	SP
13	B	Clínica	MG
14	B	Subclínica	MG
15	C	Clínica	SP
16	E	Clínica	SP
17	E	Clínica	SP
18	E	Clínica	SP
19	E	Clínica	SP
20	E	Clínica	SP
21	F	Clínica	PR
22	G	Clínica	PR
23	H	Subclínica	PR
24	I	Clínica	GO
25	I	Clínica	GO
26	J	Clínica	GO
27	L	Tanque expansão	GO

ANEXO B

Quadro B - Seqüência de oligonucleotídios específicos para a caracterização genotípica de linhagens de *P. zopfii* genótipos 1 e 2 e *P. blaschkeae*.

Linhagens de <i>Prototheca</i>	Seqüência de oligonucleotídios (5' – 3')
<i>P. zopfii</i> genótipo 1 (SAG 2063 ^T)	Proto 18-4f: GAC ATG GCG AGG ATT GAC AGA PZ GT 1/r: GCC AAG GCC CCC CGA AG
<i>P. zopfii</i> genótipo 2 (SAG 2021 ^T)	Proto 18-4f: GAC ATG GCG AGG ATT GAC AGA PZ GT 2/r: GTC GGC GGG GCA AAA GC
<i>P. blaschkeae</i> (SAG 2064 ^T)	PZGT 3-IK/f: CAG GGT TCG ATT CCG GAG AG PZ GT 3/r: GTT GGC CCG GCA TCG CT

Fonte: Möller et al. (2006).

ANEXO C

Quadro C - Valores das unidades formadoras de colônias – UFC em linhagens de *P. zopfii* isoladas do leite de vacas e das cepas-controle. Botucatu, 2007.

Linhagens de <i>P. zopfii</i> e Cepas-controle	UFC/mL*
1	5,7x10 ⁵
2	6,7 x10 ⁵
3	6,8 x10 ⁵
4	6,3 x10 ⁵
5	5,7 x10 ⁵
6	6,0 x10 ⁵
7	4,5 x10 ⁵
8	4,1 x10 ⁵
9	5,9 x10 ⁵
10	4,1 x10 ⁵
11	3,9 x10 ⁵
12	4,9 x10 ⁵
13	4,0 x10 ⁵
14	6,3 x10 ⁵
15	4,5 x10 ⁵
16	5,1 x10 ⁵
17	4,9 x10 ⁵
18	4,4 x10 ⁵
19	5,8 x10 ⁵
20	4,6 x10 ⁵
21	5,3 x10 ⁵
22	4,5 x10 ⁵
23	4,9 x10 ⁵
24	4,3 x10 ⁵
25	4,4 x10 ⁵
26	6,7 x10 ⁵
27	6,1 x10 ⁵
<i>P. zopfii</i> genótipo 1	6,2 x10 ⁵
<i>P. zopfii</i> genótipo 2	5,2 x10 ⁵
<i>P. blaschkeae</i>	5,2 x10 ⁵

*UFC/mL: Unidade formadora de colônia/mililitro.

ANEXO D

Quadro D - Valores da “concentração algicida mínima” (CAM) para hipoclorito de sódio (%) e iodo (%), em estirpes de *P. zopfii* isoladas do leite de vacas. Botucatu, 2007.

Linhagens	CAM Hipoclorito de Sódio(%)	CAM Iodo (%)
1	0,07	0,31
2	0,03	0,62
3	0,03	0,62
4	0,03	0,31
5	0,07	0,15
6	0,07	0,15
7	0,07	0,62
8	0,15	0,31
9	0,07	0,31
10	0,07	0,31
11	0,07	0,31
12	0,07	0,31
13	0,07	0,31
14	0,07	0,31
15	0,03	0,31
16	0,03	0,31
17	0,03	0,31
18	0,03	0,31
19	0,07	0,31
20	0,07	0,31
21	0,07	0,31
22	0,07	0,31
23	0,07	0,31
24	0,07	0,31
25	0,07	0,31
26	0,07	0,31
27	0,07	0,31

TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho a ser enviado para a Revista Mycopathologia

“In vitro” antimicrobial susceptibility and algicide effects of sodium hypochlorite and iodine anti-septics on *Prototheca zopfii* strains isolated from bovine milk

Tatiana Salerno¹, Márcio Garcia Ribeiro¹, Hélio Langoni¹, Amanda Keller Siqueira¹, Elizabeth Oliveira da Costa², Priscilla Anne Melville², Válter Ferreira Félix Bueno³, Aline Artioli Machado Yamamura⁴, Uwe Roesler⁵, Aristeu Vieira da Silva⁶

¹Department of Veterinary Hygiene and Public Health, College of Veterinary and Animal Science, São Paulo State University, Botucatu, São Paulo, Brazil; ²Research on Mammary Gland and Milk Production (NAPGAMA), Department of Preventive Veterinary, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ³Center of Research for Foods, Veterinary School, Goiás Federal University, Brazil; ⁴Department of Preventive Veterinary, Londrina State University, Paraná, Brazil; ⁵Institute for Animal Hygiene and Veterinary Public Health, University Leipzig, Germany; ⁶ Executive management of Administration the Research, Paranaense University, Umuarama, Paraná, Brazil.

Abstract

In the last years, *Prototheca zopfii* has been considered one of the most important causes of mastitis from environmental origin. It is refractory to conventional therapies and causes great damage on the mammary gland. The present study evaluated, "in vitro", the antimicrobial susceptibility of 27 strains of *P. zopfii* isolated from bovine milk raised in Brazil to different antimicrobials and to sodium hypochlorite and iodine anti-septics. Nystatin (100.0%) and gentamicin (66.7%) were the most effective drugs for all studied strains. Multiple drug resistance for three or more antimicrobials was observed in 100.0% of strains predominantly to ampicilin, cefoperazone, cloxacillin, enrofloxacin, florfenicol, neomycin and tetracycline. Sodium hypochlorite (0.03-0.15%)

and iodine (0.15-0.62%) revealed "in vitro" effectiveness for the isolated in low concentrations. These results allow to infer that nystatin and gentamicin have higher effectiveness against the isolates. However, the multiresistance observed to available conventional antimicrobials for bovine intramammary therapy makes difficult the adoption of therapeutic protocols in the mammary protothecosis. Sodium hypochlorite and iodine showed "*in vitro*" algicide effect to all strains, making possible the use of these anti-septic on hygiene procedures and also, for pre and post-dipping, specially in farms with mammary prototecosis, as well as in the cauterization of mammary glands infected by *P. zopfii*.

Keywords: anti-septic; antimicrobial susceptibility; bovine mastitis; milk; *Prototheca zopfii*; Protothecosis.

Introduction

In different countries it is outstanding the significant increase in the frequency of bovine mastitis caused by *Prototheca* genus algae, especially *Prototheca zopfii* (*P. zopfii*) [1, 2]. The organism was firstly described by Wilhelm Krüeger, in 1894, identified in the trees sap [3] and it was further classified as an algae in 1913 [4]. Lerche, in 1952 at Germany, was the first one to report bovine mastitis caused by *P. zopfii* [5].

Prototheca spp are unicellular microorganisms, achlorophyllous, ubiquitous, without photosynthetic capacity. Several authors postulate that *Prototheca* genus would be a green algae mutation of *Chlorella* genus [6, 7], once the species are morphologically similar [7, 8]. Actually, the *Prototheca* genus is classified as belonging to *Plantae* kingdom, *Chlorellaceae* family [9] containing five species: *P. zopfii*, *P. wickerhamii*, *P. blaschkeae*, *P. stagnora* and *P. ulmea* [10]. Among these species, only

P. zopfii and *P. wickerhamii* had been associated to humans and bovine infections [11]. The mammary prototecosis is recognized as the main clinical manifestation in bovine [12]. Except for the bovine, there is no description, until the moment, of mammary infections in other livestock species like ovine, caprine, equine, swine and bubaline.

In Brazil, the first report of mammary prototecosis happened in 1989, diagnosed in cows with mastitis in Mato Grosso do Sul State [13]. *Prototheca* spp in the last years is pointed, as one of the most concerning causal agents of environmental origin mastitis, described practically in all country States with importance in the bovine milk exploration, under sporadic cases form or outbreaks [14-18]. The bovine mammary infection by *P. zopfii* unchains clinical and subclinical mastitis, with evolution to pyogranulomatous processes of difficult tissue resolution [1], leaving to mammary glandular tissue alterations and partial or total destruction of glandular parenchyma [19].

Considering the current damages of the mammary prototecosis in bovine, the growing occurrence and spread of *P. zopfii* in dairy herd in Brazil and its resistance to several therapeutic protocols, the present study was carried out to evaluate the “in vitro” susceptibility of *P. zopfii* strains against different antimicrobials and to sodium hypochlorite and iodine anti-septics.

Material and methods

Obtaining, identification and strains maintenance

It was studied the “in vitro” susceptibility profile of 27 strains of *P. zopfii* isolated in Brazil from clinical or subclinical bovine mastitis and also, from bulk milk tank, to different antimicrobials and sodium hypochlorite and iodine tincture anti-septics.

As control group was used *P. zopfii* genotype 1 (SAG 2063T), *P. zopfii* genotype 2 (SAG 2021T) and *P. blaschkeae* (SAG 2064T), respectively deposited in the

Genebank under numbers AY973040, AY940456 and AY973041, given in for the study by Prof. Dr. Uwe Roesler, of the Institute for Animal Hygiene and Veterinary Public Health, University Leipzig, Germany.

The 27 strains were supplied by the Laboratory of Animal Infectious Diseases of the Animals – DHVSP, FMVZ-UNESP / Botucatu, SP; by the Research in Mammary Gland and Milk Production – NAPGAMA, FMVZ-USP / São Paulo, SP; by the Center for Food Research of Veterinary School, UFG / Goiás, GO and by the Department of Preventive Veterinary Medicine, UEL / Londrina, PR. All *P. zopfi* strains were classified based in morphology, staining and cultive characteristics, allied to the carbohydrate assimilation test using trehalose, glucose, sucrose and the n-propanol [20].

Microbial Susceptibility Test (disks diffusion)

The “in vitro” susceptibility evaluation of *P. zopfi* strains to antimicrobials was accomplished based in the classic method of disks diffusion, using intramamarian and/or systemic suitable antimicrobials to mastitis therapy, commercially available for veterinary routine use in Brazil, as ampicilin (10µg), cefoperazone (75µg), cloxacillin (1µg), enrofloxacin (5µg), estreptomycin (10µg), florfenicol (30µg), gentamicin (10µg), neomycin (30µg), nystatin (100 U.I.) and tetracycline (30µg). The reading of growth inhibition halos and the results interpretation was accomplished in agreement with the “Clinical and Laboratory Standards Institute” manual [21]. Strains with simultaneous resistance to three or more tested antimicrobials were considered multi-resistant.

Algicide effect of sodium hypochlorite and iodine tincture

The anti-septic algicide test was realized in tubes of minimal algicide concentration (MAC) which is based in the minimal bactericidal concentration technique (MBC) [22]. MAC was characterized as the smallest drug concentration capable to prevent the algae multiplication, after plating.

For inoculum preparation, all *P. zopfii* strains were cultivated in sheep blood agar (5%), incubated at 37°C, for 72 hours. Two to three colonies of each strain were picked to tubes containing 10 mL of brain-heart infusion broth (BHI) and incubated at the same conditions. The tubes turbidity was adjusted using the MacFarland scale with optical density equivalent to tube one [23].

Two anti-septic solutions, sodium hypochlorite and iodine tincture, both at 10%, were used to evaluate the MAC. For each *P. zopfii* strain were used 10 sterilized tubes. In the first tube was deposited 1mL of sodium hypochlorite at 10%. In the 9 subsequent tubes were distributed 0.5mL of sterilized Mili-Q water. Following, 0.5mL of sodium hypochlorite was transferred from the first to the second tube and were homogenized. This same process was accomplished successively in the other tubes discarding 0.5mL of tube 10. Therefore, it was added in each tube 0,5mL of *P. zopfii* inoculum obtaining the concentrations: 5%, 2.5%, 1.25%, 0.62%, 0.31%, 0.15%, 0.07%, 0.03%, 0.01% and 0.009%.

The tubes were incubated at 37°C, for approximately 12 hours. Following, 10µL of each tube was sowed in the sheep blood agar (5%) and incubated at 37°C, maintained by 7 days, with readings on every 24 hours, seeking the evaluation of the tested drug minimal algicide concentration (MAC). The same procedure was accomplished using the iodine tincture at 10%. All *P. zopfii* strains were submitted in duplicate to determine the MAC using the iodine and the sodium hypochlorite. As control-solution,

suspensions were prepared in previously sterilized tubes, containing 0.5 mL of sterilized Mili-Q water, added 0.5 mL of the innocuous, adjusted at MacFarland scale 1 turbidity.

Statistical analysis

The “in vitro” susceptibility profile to antimicrobials and anti-septic effects on the analysed strains was compared using the χ^2 test, contrasting the frequencies among the strains using a 95% trust interval. The minimal and maximum values to MAC of sodium hypochlorite and iodine were accomplished by the Mann-Whitney test. All calculations were processed by the EpiInfo 6 (Center for Disease Control, Atlanta) program, considering $\alpha= 0,05$ [24].

Results and Discussion

The occurrence of bovine mastitis caused by *Prototheca* spp has been increasing significantly at several countries [2]. In Brazil, the bovine prototecosis had been considered, in the last years, one of the most concerning causes of mastitis of environmental origin [14 - 16]. The ubiquitous distribution of this microorganism difficulties the realization of specific control and prevention measures, and causes great losses to farmers due to the abrupt decrease in milk production, loss of infected mammary gland function or precocious discard of females [25].

The control and prevention of mastitis caused by *P. zopfii* are sustained on measures like discarding cows or chemical cauterization of infected glands, besides general recommendations for mastitis control. So, the lack of specific measures, the drugs multi-resistance of *P. zopfii* strains allied to the difficulty on establishing effective therapeutic protocols with accessible costs to farmers, and with low mammary

epithelium damage, has constituted a great challenge for researchers of mastitis study and milk quality. In this context, different studies have been investigating the “*in vitro*” susceptibility profile of *Prototheca* spp strains isolated from bovine mastitis, all looking for finding antimicrobials or other drugs (anti-septic, algicides) that demonstrate effectiveness against this pathogen and their suitability for “*in vivo*” therapy.

Frank et al. [26] using the disks diffusion method observed that *P. zopfii* strains isolated of bovine mastitis presented sensibility to estreptomycin, neomycin and tetracycline. Bodennhoff and Madsen [27] verified moderate sensibility of strains isolated from bovine milk to estreptomycin and gentamicin. Camargo [28] and Casal and Gutierrez [29] demonstrated “*in vitro*” sensibility of this microorganism using neomycin and gentamicin when accomplished in Sabouraud dextrose agar. McDonald et al. [30] verified that 37.5% of 48 studied strains presented sensibility to gentamicin.

In Brazil, Costa et al. [31] evaluating *P. zopfii* strains isolated of two mastitis outbreaks observed 100.0% of effectiveness of gentamicin, while Melville [32] found 100.00% of partial sensibility to gentamicin in 105 *P. zopfii* strains isolated from mastitis, when assayed in Sabouraud dextrose media. These results are similar to the present study, because we observed good “*in vitro*” effectiveness of gentamicin (66.7%) to the 27 *P. zopfii* strains isolated from bovine milk. The “*in vitro*” effectiveness of gentamicin observed in *P. zopfii* isolated, also described in similar studies [28, 29, 31], probably elapses of the drug action in the proteic synthesis of these microorganisms promoting alterations in the proteins formed by the cells, culminating with cell death [33].

The few options to antimicrobials for intra-mammary infusion have been recognized as serious problem in the mammary prototecosis therapy. The resistance of *Prototheca* genus to antimicrobials majority can be attributed to its rigid cell wall

estructure, added to pyogranulomatous reaction induction that restricts the antimicrobials capacity on reaching therapeutic concentration in the infection focus [1, 2].

It was observed, in the present study, resistance to three or more antimicrobials (multi-resistance) in 100.0% of the strains. So, such results agree with the ones from different authors that have been marking the multi-resistance of *P. zopfii* strains in microbial sensibility tests [14, 30, 32, 34]. The strains totality revealed multi-resistance to ampicilin, cefoperazone, cloxacillin, enrofloxacin, florfenicol, neomycin and tetracycline. Interestingly, these antimicrobials compose the majority of active principles present in intramammary antimicrobials commercialized in Brazil, disabling these drugs indication in therapy of mammary prototecosis.

Some anti-fungic has been also tested "*in vitro*" to *Prototheca* genus algae. Nystatin is the drug that has been showing better effectiveness [26, 30, 35, 36]. Malinowski et al. [37] found only 21.4% of sensibility to nystatin in 28 *P. zopfii* strains isolated from bovine mastitis. Differently, in the 27 strains we had tested "*in vitro*", it was observed sensibility to nystatin. However, its "*in vivo*" use has been showing little satisfactory results. Costa et al. [25] evaluated the nystatin intramammary use in five mammary quarters of *Prototheca* spp infected cows, of which just one presented clinical and microbiological cure. The algae strains sensibility to nystatin can be credited to drug action in the microorganism cell wall, altering the membrane permeability, and determining cell death [33]. In the present study, nystatin and gentamicin efficiency was statistically significant ($p < 0,05$) when compared to other antimicrobials (Table 1).

Due to therapeutic failures using conventional antimicrobials, several anti-septic have been alternatively used "*in vitro*" or "*in vivo*" with the mammary prototecosis treatment objective [25, 35, 38, 39]. Starting from this presupposition, we aimed to investigate the minimal algicide concentration (MAC) of *P. zopfii* strains isolated from

bovine mastitis to different iodine concentrations and sodium hypochlorite, thinking about the possibility to use these anti-septics in teats hygiene and milk utensils, in pre and post-dipping and/or to infected quarters chemical cauterization.

The sodium hypochlorite, belonging to halogen group, have excellent action spectrum on several microorganisms, acting in the enzymatic system and causing alterations in the cell wall [40]. In Brazil, due the low cost, easy acquisition and high microbicide action, this anti-septic is widely used in dairy farms to disinfection of floors, walls, utensils and equipments, as well in water treatment and bovine mammary gland antiseptis on pre and post-dipping [41]. Ribeiro [42] marks that the sodium hypochlorite is recommended as anti-septic for pre-dipping between the concentrations 0.8 and 1.2% and, in the post-dipping, at 4%. Domingues et al. [43] observed reduction of 74.1% on the microorganisms' number after the cows' teats hygiene with sodium hypochlorite solutions at 3%. Silva et al. [44] observed high rates of clinical cure of bovine mammary glands affected with abscesses, when washed in the post-operative with sodium hypochlorite at 1%.

Ribeiro [43] didn't obtain success in "*in vitro*" tests using sodium hypochlorite at 0.5%, from 30 seconds to 1 minute of contact, to 11 *P. zopffi* strains isolated from mastitis in Brazil. Pedrini and Margatho [45] observed good "*in vitro*" carry out sodium hypochlorite at 2% front several microorganisms that cause environmental and contagious mastitis, although they haven't observed microbicide effect in concentrations equal or lower than 0.5%. Differently of Ribeiro [46] and Pedrini and Margatho [45] results, in this study it was found satisfactory sodium hypochlorite algicide effect, for the 27 strains, in low concentrations (0.03 to 0.15%). Of these, 19 (70.4%) strains showed MAC at 0.07% front the anti-septic, while 07 (25.9%) and 01 (3.7%) strains presented MAC at 0.03% and 0.15%, respectively. *P. zopffi* genotype 1, *P. zopffi*

genotype 2 and *P. blaschkeae* revealed MAC at 0.03%, 0.15% and 0.07%, respectively. The discrepancy observed among different authors for the effectiveness limit of sodium hypochlorite concentration, can be credited to the “*in vitro*” method used and the product exposition time to the strains, whose effectiveness tends to increase when the drug contact period with the microorganisms is prolonged.

Like hypochlorite, the iodine is also recognized as an efficient anti-septic belonging to halogens group. It has a high cell penetration power leading to proteins precipitation and essential enzymes oxidation, and so, interfering in the microorganism vital metabolic reactions [47]. In dairy farms this anti-septic is generally indicated to pre and post-dipping use for preventing and controlling mastitis. In pre-dipping it is usually recommended at 0.1% concentration and in post-dipping from 0.5 to 1% [42]. Pedrini and Margatho [45] while investigating the “*in vitro*” iodine solution effectiveness at 1% and 2% observed great microbicide action for several mastitis pathogens. In our study, the iodine tincture showed algicide effect for all studied 27 *P. zopfii* strains, in concentrations that varied from 0.15 to 0.62%. Of these, 22 (81.5%) strains presented MAC at 0.31%, while 03 (11.1%) and 02 (7.4%) strains presented MAC to 0.62% and 0.15%, respectively. All control group showed MAC at 0.31% to this anti-septic. In contrast, Ribeiro [46] didn't obtain success with the iodine use at 0.5% on “*in vitro*” tests, to *P. zopfii* strains isolated of cows with mastitis.

The sodium hypochlorite “*in vitro*” algicide effect to the 27 *P.zopfii* strains was significantly different ($p<0.05$) of the iodine, indicating that hypochlorite has a good *P. zopfii* algicide effect even in low concentration (Table 2).

The results of the present study showed that sodium hypochlorite could be used as an alternative pre-dipping anti-septic solution in cattle heard affected by mammary prototecosis. However, should be considered that different factors can affect the

effectiveness of the product, including organic matter presence and short time of teats exhibition to the product. Additionally, the “*in vitro*” sensibility of *P. zopffii* strains to sodium hypochlorite suggests that this anti-septic can be indicated to the milking routine and cleaning of equipments in farms with prototecosis report, or even in higher concentrations, to chemical cauterization of *P. zopffii* infected glands.

In similar way, the iodine revealed “*in vitro*” algicide effect to *P. zopffii* isolates. This anti-septic has been used mainly for post-dipping, with great profilatic and control action for contagious agents of bovine mastitis. On such situation, it’s usually indicated in higher concentrations than for pre-dipping. The present study results, suggests that iodine can be recommended as post-dipping anti-septic in milk heards infected by *P. zopffii*, as well in chemical cauterization of infected mammary quarters.

Conclusion

Our results revealed that nystatin and gentamicin presented good “*in vitro*” effectiveness front isolated and that sodium hypochlorite and iodine are suitable anti-septics to hygiene procedures and for pre and post-dipping, specially in farms with mammary prototecosis, as well as in the cauterization of infected mammary glands. Nevertheless, “*in vivo*” studies are necessary to verify their true effectiveness on the control and prevention of mammary prototecosis.

Table 1 - Microbial susceptibility in *P. zopfi* strains isolated from clinical, subclinical bovine mastitis and bulk milk tank. Botucatu, 2007.

Antimicrobials	Susceptibility		
	Sensitive	Partially sensitive	Resistant
	strains number (%; TI 95%)*		
Ampicilin	0 (0.00; 0.09-12.34)	0 (0.00; 0.09-12.34)	27 (100; 87.66-99.91)
Cefoperazone	0 (0.00; 0.09-12.34)	0 (0.00; 0.09-12.34)	27 (100; 87.66-99.91)
Cloxacillin	0 (0.00; 0.09-12.34)	0 (0.00; 0.09-12.34)	27 (100; 87.66-99.91)
Enrofloxacin	0 (0.00; 0.09-12.34)	0 (0.00; 0.09-12.34)	27 (100; 87.66-99.91)
Estreptomycin	0 (0.00; 0.09-12.34)	2 (7.40; 2.27-23.50)	25 (92.52; 76.50-97.73)
Florfenicol	0 (0.00; 0.09-12.34)	0 (0.00; 0.09-12.34)	27 (100; 87.66-99.91)
Gentamicin	18 (66.66; 47.65-81.36)	8 (29.62; 15.88-48.67)	1 (3.70; 0.88-18.35)
Neomycin	0 (0.00; 0.09-12.34)	0 (0.00; 0.09-12.34)	27 (100; 87.66-99.91)
Nystatin	27 (100; 87.66-99.91)	0 (0.00; 0.09-12.34)	0 (0.00; 0.09-12.34)
Tetracycline	0 (0.00; 0.09-12.34)	0 (0.00; 0.09-12.34)	27 (100; 87.66-99.91)

*Trust intervals that don't put upon demonstrate significant differences among the proportions.

TI 95% = Trust interval 95%.

Table 2 - Average, minimal and maximum values for sodium hypochlorite (%) and iodine (%) minimal algicide concentration (MAC), in *P.zopfi* strains isolated from clinical (n=24), subclinical (n=2) mastitis cases and bulk milk tank (n=1), in four Brazilian States. Botucatu, 2007.

Statistic*	MAC– Sodium hypochlorite	MAC - Iodine
Average	0.07 ^a	0.31 ^b
Minimum Value	0.03	0.15
Maximum Value	0.15	0.62

* Average values followed by different small letters indicate significant differences in sodium hypochlorite and iodine tincture MAC ($p < 0.0001$), for Mann-Whitney test with $\alpha=0.05$.

References

1. CHEVILLE NF, McDONALD J, RICHARD JL. Ultrastructure of *Prototheca zopfii* in bovine granulomatous mastitis. *Vet Pathol* 1984; 21: 341-348.
2. TANIYAMA H, OKAMOTO F, KUROSAWA T, FURUOKA H, KAJI Y, OKADA H, MATSUKAWA K. Disseminated protothecosis caused by *Prototheca zopfii* in a cow. *Vet Pathol* 1994; 31: 123-125.
3. KRÜGER W. Kurze Charakteristik einiger niedriger organismen im saftfluss der laubbaüme. *Hedwigia* 1894; 33: 241–266.
4. CHODAT R. Monographies d'algues en culture pure. *Mater Flora Cryptog Suisse* 1913; 4: 234–241.
5. LERCHE M Eine durch algen (*Prototheca*) hervorgerufene mastitis der kuh. *Berl Munch Tierarstl Wochenschr* 1952; 65: 64-69.
6. TYLER E, LORENZ MD, BLUE JL, MUNNELL JF, CHANDLER FW. Disseminated protothecosis with central nervous system involvement in a dog. *JAVMA*, 1980; 176: 987-993.
7. QUINN PJ. MARKEY BK, CARTER ME, DONNELLY WJ, LEONARD FC. *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas*. São Paulo: Artmed, 2005.
8. PORE RS. Nutritional basis for relating *Prototheca* and *Chlorella*. *Can J Microbiol* 1972; 18: 1175–1177.
9. ROESLER U. *Prototheca*. www.prototheca.com Accessed on September 8th, 2007.
10. ROESLER U, MÖLLER A, HENSEL A, BAUMANN D, TRUYEN U. Diversity within the current algal species *Prototheca zopfii*: a proposal for two *Prototheca zopfii* genotypes and description of a novel species, *Prototheca blaschkeae* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006; 56: 1-7.
11. PORE RS. *Prototheca* taxonomy. *Mycopathologia* 1985; 90: 129-139.

12. RADOSTITS OM, GAY CC, HINCHCLIFF KW Veterinary Medicine: a textbook of the disease of cattle, horses, sheep, pigs and goats. 10th edn. Philadelphia: Saunders, 2007; 673-762.
13. COSTA EO, RIBEIRO AR, WATANABE ET, GARINO JR F, SILVA JAB, JUNQUEIRA L. Controle de surto de mastite por *Prototheca zopfii* em uma propriedade leiteira. NAPGAMA 1999; 2: 12-16.
14. LANGONI H. *Prototheca zopfii* e mastite bovina: clínica e terapêutica. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 22. Curitiba, Brazil: Anais, 1992: 125.
15. RIBEIRO MG, LANGONI H, SILVEIRA AM, RUFFINO SM. Mastite bovina por *Prototheca zopfii*. Relato de caso e revisão de literatura. Arq Inst Biol 1998; 60: 1-7.
16. COSTA EO, RIBEIRO MG, ROCHA NS, NARDI GJ Diagnosis of clinical bovine mastitis by fine needle aspiration followed by staining and scanning electron microscopy in a *Prototheca zopfii* outbreak. Mycopathologia 2004; 158: 81-85.
17. BUENO VFF, MESQUITA AJ, NEVES RBS, SOUZA MA, RIBEIRO AR, NICOLAU ES, OLIVEIRA NA. Epidemiological and clinical aspects of the first outbreak of bovine mastitis caused by *Prototheca zopfii* in Goiás State, Brasil. Mycopathologia 2006; 161: 141-145.
18. YAMAMURA AAM, MÜLLER EE, GIORDANO LGP, COSENZA M, SILVA PFN, GODOY A. Isolamento de *Prototheca* spp. de vacas com mastite, de leite de tanques de expansão e do ambiente dos animais. Cienc Agrar 2007; 28: 105-114.
19. LANGONI H. Controle de afecções das glândulas mamárias: aspectos etio-epidemiológicos de diagnóstico, tratamento e profilaxia das mastites ovinas. In: Encontro de Caprinocultores de Corte na Bahia, Salvador, Brazil: Anais, 2003: 66-80.
20. CAMARGO ZP, FISCHMAN O. Use of morpho-physiological characteristics for differentiation of the species of *Prototheca*. Sabouraudia 1979; 17: 275-278.

21. CLSI/NCCLS - Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão. 8 edn., 2003. www.sbmicrobiologia.org.br/clsi_OPASM2-A8.pdf Accessed on September 26, 2007.
22. TRABULSI LR, ALTERTHUM F. Microbiologia. 4th edn. São Paulo: Atheneu, 2005.
23. BIER O. Bacteriologia e imunologia. 23th edn. São Paulo: Melhoramentos, 1984.
24. TRIOLA MF. Introdução à Estatística. 7th edn. Rio de Janeiro: LTC, 1999.
25. COSTA EO, CARCIOFI AC, MELVILLE PA, SCHALCH U. *Prototheca* sp outbreak of bovine mastitis. J Veterinarmed B 1996; 43: 321-324.
26. FRANK MN, FERGUSON LC, CROSS RF, REDMAN DR. *Prototheca*, a cause of bovine mastitis. Am J Vet Res 1969; 30: 1785-1794.
27. BODENHOFF J, MADSEN PS. Bovine protothecosis: a brief report of ten cases. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand 1978; 86: 51-52.
28. CAMARGO, ZP. Algas do gênero *Prototheca*: Características microbiológicas e imunológicas. [Thesis]. São Paulo, Brazil: Escola Paulista de Medicina (1978).
29. CASAL M, GUTIERREZ J. Investigación preliminary de la acción inhibitoria “in vitro” de los antibióticos frente a las algas del genero *Prototheca*. Mycopathologia 1981; 75: 45-49.
30. McDONALD JS, RICHARD JL, CHEVILLE NF. Natural and Experimental Bovine Intramammary Infection with *Prototheca zopfii*. Am J Vet Res 1984; 45: 592-595.
31. COSTA EO, MELVILLE PA, RIBEIRO AR, WATANABE ET, PAROLARI MCFF. Epidemiologic study of environmental sources in a *Prototheca zopfii* outbreak of bovine mastitis. Mycopathologia 1997; 137: 33-36.
32. MELVILLE PA. Correlação de morfotipos de *Prototheca zopfii* com perfis de susceptibilidade “in vitro” aos antibióticos e quimioterápicos e estudo da ultraestrutura

após exposição aos antimicrobianos. [Thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo (2000).

33. TAVARES W. Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfecciosos. 3th edn. São Paulo: Atheneu, 2002.

34. GOMES MJP, DRIEMEIER D, FERREIRO L. Ocorrência de Casos de Mastite por *Prototheca zopfii* em Bovinos, no Rio Grande do Sul. NAPGAMA 1999; 4: 4-8.

35. CASAL M, AROCA JG. Investigación de la sensibilidad de *Prototheca zopfii* a los antifúngicos, quimioterápicos y sulfamidas. Rev Latinoam Microbiol 1983; 25: 259-262.

36. MARQUES S, SILVA E, CARVALHEIRA J, THOMPSON G. Short communication: in vitro antimicrobial susceptibility of *Prototheca wickerhamii* and *Prototheca zopfii* isolated from bovine mastitis. J Dairy Sci 2006; 89: 4202-4204.

37. MALINOWSKY E, LASSA H, KLOSSOWSKA A. Isolation of *Prototheca zopfii* from Inflamed Secretion of Udders. Bull Vet Inst Pulawy 2002; 46: 295-299.

38. LANGONI H, DOMINGUES PF, FUNARI SRC, DIAS HLT. *Prototheca zopfii* como agente de mastite bovina: clínica e terapêutica. Arq Bras Med Vet Zootec 1995; 47: 727-732.

39. COSTA EO, MELVILLE PA, BENITES NR, RIBEIRO AR, WATANABE ET, SILVA JAB, GARINO JR. *Prototheca zopfii*: sensibilidade “in vitro”. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 24. Goiânia, Brazil: Anais, 1996: 124.

40. HOFFMANN FL, CRUZ CHC, VINTURIM TM, Determinação da atividade antibacteriana de desinfetantes. Higiene Alimentar 1995; 9: 29-34.

41. DOMINGUES PF, LANGONI H. Manejo sanitário animal. 1th edn. Rio de Janeiro: EPUB, 2001.

42. RIBEIRO AR. Desinfecção e desinfetantes no pré e pós ordenha. In: Encontro de

Pesquisadores em Mastite, 3. Botucatu, Brasil: Anais, 1999: 63-69.

43. DOMINGUES PF, LANGONI H, BALDINI S, CARRATORE RRD. Dinâmica microbiológica externa do óstio do teto antes e após a higienização com hipoclorito de sódio à 3%. In: Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias, 15. Campo Grande, Brazil: Anais, 1996: 252.

44. SILVA LAF, COELHO KO, BUENO VVF, MESQUITA AJ, FIORAVANTI MCS, NICOLAU ES, CASTRO GR. Estudo etiológico de abscessos mamários em vacas leiteiras e utilização do hipoclorito de sódio a 1% no tratamento pós-operatório. NAPGAMA 2002; 5: 7-11.

45. PEDRINI SCB, MARGATHO LFF. Sensibilidade de microrganismos patogênicos isolados de casos de mastite clínica em bovinos frente a diferentes tipos de desinfetantes. Arq. Inst. Biol 2003; 70: 391-395.

46. RIBEIRO AR. A influência da anti-sepsia pós-ordenha na ocorrência de mastite bovina. [Dissertation] São Paulo: Universidade de São Paulo (1996).

47. SPINOSA HS, GÓRNIAC SL, BERNARDI MM. Farmacologia aplicada à medicina veterinária. 2th edn. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

Address for correspondence: Tatiana Salerno, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública (DHVSP), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Distrito de Rubião Júnior s/n, CEP: 18.618-000, Botucatu, São Paulo, SP, Brazil

Phone: +55 14 3811-6270; Fax: +55 14 3811-6075

Email: tativet@ig.com.br

NORMAS DA REVISTA

Instructions to Authors

Mycopathologia is an international journal devoted to the study of the role of fungi in disease and biodeterioration. As such, the journal covers a diverse, interdisciplinary range of topics that is unique in breadth and depth, including original articles and reviews highlighting important developments in the fields of medical and veterinary mycology, plant mycology and crop protection, mycotoxicoses and mycotoxins, molecular mycology, environmental aeromycology, entomopathogenic fungi and applied industrial mycology. In addition to research papers and review articles, the journal publishes also brief reports, meeting reports and book reviews.

Original Research Papers:

These should describe new and carefully confirmed findings. Experimental procedures should be given in sufficient detail for others to verify the work. The length of a full paper should be the minimum required to describe and interpret the work clearly.

Brief Reports:

A Brief Report is suitable for recording the results of complete but small investigations or giving details of new methods, techniques or apparatus. Progress reports are not acceptable.

Review Papers:

These should be submitted only after consultation with the Editor-in-Chief.

Meeting Reports and Book Reviews

These are usually solicited by the editors of the journal.

Manuscript Presentation

Manuscripts not conforming to the instructions below will be returned for reformatting without review. You should refer to a previously published article in the journal which can be downloaded from the journal website at <http://www.springeronline.com>. The journal's language is English. British English or American English spelling and terminology may be used, but either one should be followed consistently throughout the article. If English is not your first language, please ensure that the language is corrected

by a fluent English speaker or via consulting www.manuscript-improvement.com before submission. Manuscripts submitted in poor English may be returned for revision without review. Text should be formatted to fit A4 or US Letter paper size, leaving adequate margins on all sides to allow reviewers' remarks. Please double-space all material, including notes and references. Quotations of more than 40 words should be set off clearly, either by indenting the left-hand margin or by using a smaller typeface. Use double quotation marks for direct quotations and single quotation marks for quotations within quotations and for words or phrases used in a special sense. Number the pages consecutively with the first page containing:

- title
- author(s)
- affiliation(s)
- full address for correspondence, including telephone and fax number and e-mail address

Abstract

Please provide a short abstract of 100 to 250 words. The summary should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Key Words

Please provide a maximum of 6 key words or short phrases in alphabetical order.

Abbreviations

List alphabetically only those abbreviations, which are not familiar and/or commonly used.

Main text

Presentation of the main text depends on the type of article. Section headings in your manuscript should be clearly distinguishable but not numbered.

Original Research papers should be presented under the following headers:

Introduction (including a consideration of the current literature and the objectives of the study), **Materials & Methods** (with sufficient detail to allow the work to be repeated), **Results** (focus the reader's attention on your key results) and **Discussion** (put

your key results into the context of current information and include concluding remarks at the end of the discussion; avoid unwarranted or unsupported speculations). Results and Discussion can be combined as appropriate.

The style of main sections of *Brief Reports* need not conform to that of fulllength papers. However, we encourage authors to present the main text under the following headers: Introduction, Materials & Methods, Results & Discussion and Conclusions.

Appendices

Supplementary material should be collected in an Appendix and placed before the Notes and Reference sections

Notes

Please use endnotes rather than footnotes. Notes should be indicated by consecutive superscript numbers in the text and listed at the end of the article before the references. A source reference note should be indicated by means of an asterisk after the title. This note should be placed at the bottom of the first page.

Acknowledgements

Acknowledgements (including funding agencies and help from other colleagues) should be placed in a separate section before the References.

References

Cross-referencing:

References should be listed at the end of the article in numbered order following the Vancouver style. In the text, references are identified by a number in square brackets e.g. [15]. If, in the text, a reference is identified by means of an author's name, it should be followed by the reference number in square brackets. When there are more than two authors, only the first authors name should be mentioned, followed by et al. In the event that an author cited has had two or more works published during the same year, the reference, both in the text and in the reference list, should be identified by a lower case letter like a and b after the date to distinguish the works.

Examples:

Winograd [1]

Bullen and Bennet [2a]

Bullen and Bennet [2b]

Reference list:

References to books, journal articles, articles in collections and conference or workshop proceedings, and technical reports should be listed at the end of the paper in numbered order following the Vancouver style (see examples below). Articles in preparation or articles submitted for publication, unpublished observations, personal communications, etc. should not be included in the reference list but should only be mentioned in the article text (e.g., T. Moore, personal communication).

References to books should include the author's name; year of publication; title; page numbers where appropriate; publisher; place of publication, in the order given in the example below.

Espinell-Ingroff AV. Medical Mycology and Training in the United States: A Historical Analysis (1894-1996). Dordrecht: Springer, 2003; 1-26.

Al-Doory Y, DiSalvo AF, eds. Blastomycosis. New York: Plenum Publishing Corp,

References to articles in an edited collection should include the author's name; year of publication; article title; editor's name; title of collection; first and last page numbers; publisher; place of publication; in the order given in the example below.

Yoshizawa T. Chromatographic Methods for Trichothecenes. In: Truckness MW, Pohland AE, eds. Methods in Molecular Biology, The Humana Press Inc., Totowa, 1999:118-129.

References to articles in conference proceedings should include the author's name; year of publication; article title; editor's name (if any); title of proceedings; first and last page numbers; place and date of conference; publisher and/or organization from which the proceedings can be obtained; place of publication; ISBN number, in the order given in the example below.

Nichita G, Curtui V, Miclea V, Trif A. Mycotic and mycotoxic pollution of feed—risk factor for animal health. Proceedings of the Scientific Communications Meeting of Aurel Vlaicu University, 3rd ed. Arad, 1996:65–68.

References to articles in periodicals should include the author's name; year of publication; article title; full title of periodical; volume number (issue number where appropriate); first and last page numbers, in the order given in the example below.

Walters D, Raynor L, Mitchell A, Walker R, Walker K. Antifungal activities of four fatty acids against plant pathogenic fungi. *Mycopathologia* 2004; 157: 87–90.

Van den Bosch M, Bree RT, Lowndes NF. The MRN complex: coordinating and mediating the response to broken chromosomes. *EMBO Rep.* 2003 4: 844-9.

References to technical reports or doctoral dissertations, which **must** be in the public domain, should include the author's name; year of publication; title of report or dissertation; institution; location of institution, in the order given in the example below.

Cairns RB. Infrared spectroscopic studies of solid oxygen [Dissertation]. Berkeley, California: University of California, 1965. 156 pp.

Figure Legends

Figure legends should follow the references on a separate page and precede the tables. Each figure should be mentioned in the text.

Tables

Each table should be numbered consecutively (1, 2, etc.). Please provide a short explanatory caption (without abbreviations) to each table, refer to the table in the text and note its approximate location in the margin. In tables, footnotes are preferable to long explanatory material in either the heading or body of the table. Such explanatory footnotes, identified by superscript letters, a, b, c etc., should be placed immediately below the table. Finally, please place the tables after the figure legends in the manuscript.

Figures

All photographs, graphs and diagrams should be referred to as a 'Figure' and they should be numbered consecutively (1, 2, etc.). Multipart figures ought to be labeled with lower case letters (a, b, etc.). Please insert keys and scale bars directly in the figures. Relatively small text and great variation in text sizes within figures should be avoided as figures are often reduced in size. Figures may be sized to fit approximately within the column(s) of the journal. Provide a detailed legend (without abbreviations) to each

figure, refer to the figure in the text and note its approximate location in the margin. Please place the legends in the manuscript after the references.

For vector graphics, EPS is the preferred format. For bitmapped graphics, TIFF is the preferred format. The following resolutions are optimal: line figures – 600 – 1200 dpi; photographs – 300 dpi; screen dumps – leave as is. Colour figures can be submitted in the RGB color system. Font-related problems can be avoided by using standard fonts such as Times Roman, Courier and Helvetica.

Policy on Color Figures:

Springer treats the inclusion of color figures on a per article basis and offers two options 1) Free Online Color, the color figures will only appear in color on the journals' website and b/w in the printed version of the journal 2) Online and Printed Color which comes at a charge of Euro 950/ USD 1150 per article. The color figures will appear in color on the website and in the printed version of the journal.

Symbols and Units

Only recommended SI units and abbreviations should be used, although some quantities may be expressed in common units, e.g. mmHg.

Nomenclature

Microorganisms must be correctly named using the current codes for fungi; (see Microbiology 1999, 145 (January), p. viii). Guidelines for genetic nomenclature are quoted in the same publication. Any deviations ought to be properly explained with literature citation.

Ethics

When reporting experiments on human subjects, indicate whether the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional or regional) or with the Helsinki Declaration (1964, amended in 1975 and 1983) of the World Medical Association. Do not use patients' names, initials, or hospital numbers, especially in any illustrative material! When reporting experiments on animals, indicate whether the institutions or the National Research Councils guide for, or any national law on, the care and use of

laboratory animals was followed according to all applicable institutional and/or national and international guidelines.

It is the responsibility of the author to obtain written permission for a quotation from unpublished material, or for all quotations in excess of 250 words in one extract or words in total from any work still in copyright, and for the reprinting of figures, tables or poems from unpublished or copyrighted material.

Manuscript Submission

Mycopathologia has a fully web-enabled manuscript submission and review system. This system offers authors the option of tracking in real time the review process of their manuscripts. The online manuscript and review system offers easy and straightforward login and submission procedures. This system supports a wide range of submission file formats:

For manuscripts - Word, WordPerfect, RTF, TXT and LaTeX

For figures - TIFF, EPS, PS, GIF, JPEG and PPT

PDF is NOT a recommended format.

Manuscripts should be submitted to: <http://myco.edmgr.com>

Authors are requested to download the Consent to Publish and Transfer of Copyright form from this system. Please send a completed and signed form either by mail or fax to the *Mycopathologia* Office.

Mycopathologia Springer, Journals Editorial Office Van Godewijkstraat 30

3311 GX Dordrecht The Netherlands

Fax: (+31) 78 6576254

NOTE: By using the online manuscript submission and review system, it is NOT necessary to submit the manuscript also as printout + disk. In case you encounter any difficulties while submitting your manuscript online, please get in touch with the responsible Editorial Assistant by clicking on "CONTACT US" from the toolbar. Please read the **checklist** (see below) before submitting your manuscript to *Mycopathologia*.

Submitted manuscripts should not be in consideration in whole or in part by another journal. Nor has it already appeared in print, in whole or in part, in any language, in any other journal.

Reviewing Procedure

During the submission process via Editorial Manager you will have to select two Editors from the Editorial Board to review your article based on their keyword preferences. Moreover, you should provide names and complete contact addresses (including E-mail addresses) of 4 additional reviewers that you consider experts in the subject of your study. The journal reserves the rights to obtain additional reviews as necessary.

Proofs

Proofs will be sent to the corresponding author by e-mail.

Your response, with or without corrections, should be sent within 72 hours!

Checklist for preparing Manuscripts for Submission

Please also read the Instructions to Authors above, which contains additional information. Failure to comply with these instructions may delay assessment of your paper.

- Authors whose first language is not English are strongly urged to have their manuscript thoroughly checked before submission.
- Avoid redundant words or phrases such as ‘a blue color’, ‘at a temperature of 30°C’, (Blue is a color and does not need stating!) Also phrases such as ‘It was observed that...’ are also redundant and may, without exception, be deleted.
- Nomenclature: Only ‘Systeme International’ units and abbreviations are used. Non-standard abbreviations are defined at first use.
- All text is double-spaced (**NOT 1,5 spacing**).
- All pages are numbered.
- The title should be informative and clear. Do not use phrases such as “The effect of...” or “Study of ...”.
- The abstract is clear and concise. Please avoid beginning with a phrase such as “This study shows...”, or “We show in this paper...”.
- Maximum of 6 key words in alphabetical order.
- Sub-headings in all sections are clearly indicated and **NOT** numbered.
- Introduction: includes consideration of the current literature and the objectives of the study.
- Materials & Methods; with sufficient detail to allow the work to be repeated.

- Discussion: your key results are discussed within the context of current information. Unwarranted or unsupported speculations are avoided.
- Tables and figures are self-explanatory with key details of procedures given in the legend of footnotes
- Micrographs have a clear scale bar on the photograph with the magnification given in the legend.
- References agree between text and list.
- **Two Editorial Board members are selected to review the manuscript + names of 4 independent reviewers.**
- The corresponding author has provided a valid e-mail address
- Proofs need to be returned within 72 hrs!!

Offprints

Fifty (50) offprints of each article will be provided free of charge. Additional offprints (both hard copies and PDF files) can be ordered by means of an offprint order form supplied with the proofs.

Page Charge

No page charges are levied on authors or their institutions.

Copyright

Authors will be asked, upon acceptance of an article, to transfer copyright of the article to the Publisher (see section Manuscript Submission). This will ensure the widest possible dissemination of information under copyright laws.

Article Plus

Contributors to *Mycopathologia* are encouraged to publish additional article-related materials on the journal website. These materials are items that compliment and reinforce information published in the print Journal that may be too lengthy or cost-prohibitive to print in their original/complete format. Examples of supplementary materials typically added to an online journal using ArticlePlus include:

- . • Extensive data sets contained in lengthy tables or spreadsheets
- . • Supplementary reference lists or acknowledgements
- . • Erratum notices and corrections

In the majority of instances, supplementary materials posted using ArticlePlus are called out within the article so that readers are aware that there is important information not printed (in its entirety or at all) is available for viewing online.

All materials posted to IPS websites using ArticlePlus are freely accessible to all site visitors.

These materials cannot be posted using ArticlePlus until the online article itself is posted on IPS. There cannot be any ArticlePlus material on the journal site without an article that refers to this material.

Material (such as graphics) embedded in or linked to from the ArticlePlus material must be included with the ArticlePlus material. For example, if the ArticlePlus material is an HTML file, all graphics linked to from within the HTML file must be submitted along with the HTML file.

Acceptable ArticlePlus file types

The types of materials that may be submitted include, short video or audio clips, color photographs, data graphs and charts, short audio files, web site URLs, word documents, and spreadsheets. An expanded list of acceptable file formats follows: File Type and Accepted File Extension(s) HTML = .html PDF = .pdf Image Files = .gif, .jpg, .jpeg Audio Files = .wav Video Files = .avi, .mov, .qt, .mpg, .mpeg Excel Spreadsheet = .xls Word Document = .doc, .txt Director Files = .dcr, dco Shockwave Files = .swf PDA Files = .pdb, prc PowerPoint = .ppt

ArticlePlus File Submission Instructions

Authors should clearly indicate any material to be considered for Article Plus. Since all materials submitted for Article Plus are posted exactly as presented, authors are advised to review their materials carefully. ArticlePlus data will be posted as submitted and will not be professionally copyedited or proofread. No additional work or file processing will be performed. The Publisher will not be responsible for errors or omissions.

If the submitted materials require processing, the author will be informed of any associated charge and will be responsible for these costs. For this reason, authors should carefully review their material.

The Article Plus repository for any given article may not exceed 5MB. The repository may consist of one file or any number of related files whose total combined size does not

exceed this size specification. Files larger than 5MB will be returned to the author, un-posted, for re-submission. This file size limitation is strictly enforced.

Web Address/URLs (web links)

Must contain the complete path for the destination web site.

Web Documents (.htm files)

Web documents must be submitted already in HTML format and have .htm as the file extension. If imbedded images files are present in the HTML file, please supply these separately. Please be sure that all HTML coding is accurate to assure cross-browser display. Again, these files will not be reviewed or edited prior to posting, so authors should review the HTML coding carefully.

Audio and Video Files

Short audio and video clips may be submitted for posting on the web site in one of the file formats specified above. Audio and video files must be compressed to the smallest possible size that still allows for high resolution and quality presentation. The size of each clip should not exceed 5MB. File size limitation is intended to insure that end-users are able to download and view files in a reasonable time frame. If files exceed the specified size limitation, they will not be posted to the web site and returned to the author for re-submission.

Text Files and Spreadsheets

Text documents and spreadsheets should be submitted completely formatted for easy viewing and printing. Please be sure that data chart and graph layouts are done correctly so that page run-over is not present and the information is easy to view and read on screen.

All submissions received in final format, as approved by the Editor/Reviewer(s) will not be returned to the submitter. Materials will be kept for future use if needed.

Copyright. As with all materials published in *Mycopathologia*, copyright on materials published on the web site using ArticlePlus will be held by the Publisher, Springer. These materials are legal property of the copyright holder and are subject to the copyright assignment/transfer agreement form submitted in association with the associated article.

Additional Information

Additional information can be obtained from:

Max Haring

Springer

P.O. Box 17

3300 AA Dordrecht

The Netherlands

E-mail: max.haring@springer.com

Internet: <http://www.springer.com/11274>

Fax: +31-78-6576388

<http://www.springer.com/journal/11046>