

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 26/02/2018.



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



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

TARSILA FRANCKIN

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

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

BOTUCATU – SP

2016



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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

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

TARSILA FRANCKIN

SANDRA DE MORAES GIMENES BOSCO

JOSÉ CARLOS DE FIGUEIREDO PANTOJA

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

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

BOTUCATU – SP

2016

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

Franckin, Tarsila.

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

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

Orientador: Sandra de Moraes Gimenes Bosco

Coorientador: José Carlos de Figueiredo Pantoja

Capes: 21200009

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

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

“Desistir...

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

Cora Coralina

Dedicatória

Aos meus avós!

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

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

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

Agradecimentos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SUMÁRIO

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

RESUMO

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

ABSTRACT

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

LISTA DE TABELAS

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

LISTA DE FIGURAS

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

1. INTRODUÇÃO

1.1. Mastite bovina

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

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

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

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

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

1.2. Mastite ambiental

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

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

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

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

1.3. Fungos como patógenos em mastite bovina

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.6. Perfil de sensibilidade aos antifúngicos

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

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

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

1.7. Saúde pública

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

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

5. CONCLUSÕES

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

6. REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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