



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ALINE ARTIOLI MACHADO YAMAMURA

**FATORES PREDISPOONENTES ASSOCIADOS À MASTITE
BOVINA CAUSADA POR *Prototheca zopfii***

Londrina
2006

ALINE ARTIOLI MACHADO YAMAMURA

**FATORES PREDISPOONENTES ASSOCIADOS À MASTITE
BOVINA CAUSADA POR *Prototheca zopfii***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal – Área de Concentração: Sanidade Animal

Orientador: Prof. Dr. Ernst Eckehardt Müller

Londrina
2006

ALINE ARTIOLI MACHADO YAMAMURA

**FATORES PREDISPOONENTES ASSOCIADOS À MASTITE
BOVINA CAUSADA POR *Prototheca zopfii***

BANCA EXAMINADORA

Ernst Eckehardt Müller [Orientador].

Jane Megid

Márcio Garcia Ribeiro

Londrina, 03 de agosto de 2006.

YAMAMURA, Aline Artioli Machado. **Fatores predisponentes associados à mastite bovina causada por *Prototheca zopfii***. 2006. 75f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2006.

RESUMO

A mastite bovina causada por *Prototheca zopfii* tem importância econômica, social e em saúde pública, por causar infecção persistente, refratária à terapêutica tradicional, reduzir significativamente a produção leiteira, além de ser considerada zoonose. Esta pesquisa teve por objetivo o isolamento de *Prototheca* spp. em leite de tanques de expansão, vacas com mastite e ambiente das vacas, assim como determinar os fatores predisponentes à mastite. *Prototheca* spp. foi isolada em 10/81 amostras compostas de tanque. Os fatores predisponentes foram à *Prototheca* spp. foram analisados em 13 propriedades leiteiras dos estados do Paraná e São Paulo. Foram examinadas 383 vacas da raça Holstein e mestiças, e coletadas amostras de água, solo, cama de confinamento, *swabs* dos insufladores, fezes de vacas, bezerros e de suínos. *Prototheca* spp. foi isolada em Meio de Enriquecimento para *Prototheca* spp. e agar Sabouraud. A identificação de *P. zopfii* baseou-se nos aspectos culturais, morfológicos e bioquímicos. Das 13 propriedades estudadas foram isoladas *Prototheca* spp. em 10. Em oito o agente foi isolado em amostras de leite dos tanques de expansão, mas somente em três foi confirmada em vacas e no ambiente. Do total de 383 vacas examinadas *Prototheca* spp. foi isolada em 20 (5,2%) vacas com mastite, sendo 18 caracterizadas como *P. zopfii*. Em quatro propriedades. *Prototheca* spp. foi isolada da água de bebedouro, abastecimento, servida e empoçada em estábulo e em sala de ordenha, de amostra de solo de piquete e pasto, em amostras de teteiras, e amostras de fezes de bezerros e suínos. *P. zopfii* foi identificada em amostras de solo de piquete, teteiras e fezes de bezerros e de suínos. Pela análise uni-variada os fatores predisponentes associados à mastite por *P. zopfii* foram: criação a pasto, alimentação com pasto e silagem, ordenha mecânica em estábulo, permanência das vacas após a ordenha em mangueira sem alimento, criação de suínos próxima às instalações dos bovinos, presença de cães, gatos e roedores, armazenamento do leite em tanque de expansão e sanificação do equipamento com água quente, utilização de detergente alcalino e ácido, falta de higienização dos tetos com água, pré-imersão dos tetos em copinho com refluxo do anti-séptico, diagnóstico laboratorial e antibiograma, utilização de vacina contra mastite de origem bacteriana, bezerros alimentados com leite de vacas com mastite e a raça Holstein.

Palavras-chave: Mastite bovina. Fatores predisponentes. *Prototheca zopfii*. *Prototheca* spp.

YAMAMURA, Aline Artioli Machado. **Predisposing factors associated with bovine mastitis caused by *Prototheca zopfii***. 2006. 75f. Thesis (Doctor Degree in Animal Science's) – State University of Londrina, Londrina, 2006.

ABSTRACT

The bovine mastitis due to *Prototheca zopfii* has economic, social and public health importance, because it causes persistent infection, refractive to traditional therapeutic procedures, reduces significantly the milk production, besides to be considered zoonosis. This research had as objective the isolation of *Prototheca* spp. in bulk tanks, milk cans, cows with mastitis and herd environment, and to determine mastitis predisposing factors as well. *Prototheca* spp. was isolated in 10/81 composed samples of bulk tanks. Predisposing factors to *Prototheca* spp. were analysed in 13 milk herds from Paraná and São Paulo States. In these herds, 383 cows were examined, both Hostein breed and hybrid, and samples were collected from water, soil, free stall bedding material, swabs of teat cup rubbers, cattle, calves and swine manure. *Prototheca* spp. was cultured in Sabouraud's agar and characterized according to cultural aspects and microscopic morphology. Out of the 13 herds studied, ten had *Prototheca* spp. isolated. In eight, the agent was isolated in milk samples of the bulk tanks, but only in three herds *Prototheca* spp. was isolated from cows and the environment. Out of the total of 383 cows examined, *Prototheca* spp. was isolated in 20 (5.2%) cows with mastitis, and 18 of them were characterized as *P. zopfii*. In four herds *Prototheca* spp. was isolated in the water of the drinking trough, supply, sewage and water puddled in the stable and milking parlor, from samples of samples of teat cup rubbers and manure from calves and swines. *P. zopfii* was identified in samples of cow pen soil, teat cup rubbers and manure of calves and swines. Through univaried analysis, predisposing factors associated with mastitis due to *P. zopfii* were: pasture system, pasture and silage feed, milking in stable, permanence of cows in the lounge without food after milking, raising of swines near bovine housing, presence of dogs, cats and rodents, milk storage in bulk tanks, equipment sanitation with hot water, use of alkaline detergent and acids, lack of hygienization of the teats with water, pre-immersion of the teats in small cups with antiseptic reflux, laboratorial diagnosis and antibiogram, utilization of vaccine against mastitis from bacterial origin, calves' feeding with clinical mastitis milk and the Hostein breed.

Keywords: Bovine mastitis. Predisposing factors. Bulk tank. *Prototheca zopfii*.

SUMÁRIO

REVISÃO DA LITERATURA MASTITE BOVINA CAUSADA POR <i>Prototheca zopfii</i>	8
1 MICROBIOLOGIA DE <i>Prototheca spp</i>	8
1.1 CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA	8
1.2 BIOLOGIA.....	9
1.3 IDENTIFICAÇÃO DAS ALGAS DO GÊNERO <i>PROTOTHECA</i>	9
1.3.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS, FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS	9
1.3.2 IMUNODIAGNÓSTICO.....	12
1.4 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE LEITE COMPOSTAS	12
2 PATOGENICIDADE DAS ALGAS DO GÊNERO <i>Prototheca</i> AO HOMEM E AOS ANIMAIS E IMPORTÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA	14
3 MASTITE BOVINA CAUSADA POR <i>Prototheca zopfii</i>	17
3.1 ASPECTOS CLÍNICOS.....	17
3.2 EPIDEMIOLOGIA.....	18
3.3 ASPECTOS PATOLÓGICOS	23
3.4 TRATAMENTO E CONTROLE.....	24
REFERÊNCIAS	26
OBJETIVOS	36
OBJETIVO GERAL.....	36
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
ARTIGO 1 – ISOLAMENTO DE <i>Prototheca spp.</i> EM AMOSTRAS DE LEITE COLHIDAS DE TANQUES DE EXPANSÃO	37
RESUMO	38
ABSTRACT	39

1 INTRODUÇÃO	40
2 MATERIAL E MÉTODOS	41
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4 CONCLUSÕES	45
5 AGRADECIMENTOS	46
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
ARTIGO 2 – FATORES PREDISPONETES ASSOCIADOS À MASTITE BOVINA CAUSADA POR <i>Prototheca zopfii</i>	49
RESUMO	50
ABSTRACT	51
1 INTRODUÇÃO	52
2 MATERIAL E MÉTODOS	53
2.1 AMOSTRAS	53
2.2 INQUÉRITO EPIDEMIOLÓGICO	54
2.3 EXAMES MICROBIOLÓGICOS	54
2.3.1 AMOSTRAS DE LEITE	54
2.3.2 AMOSTRAS DE ÁGUA	55
2.3.3 AMOSTRAS DE SOLO	55
2.3.4 FEZES E EQUIPAMENTO DE ORDENHA	55
2.4 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA	55
2.5 IDENTIFICAÇÃO DE <i>Prototheca</i> spp	55
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56

4 CONCLUSÕES	64
5 AGRADECIMENTOS	65
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
ANEXOS	69
ANEXO 1 – FORMULÁRIO DE INVESTIGAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA.....	70
ANEXO 2 – FICHA INDIVIDUAL DO ANIMAL.....	74

REVISÃO DA LITERATURA

1 MICROBIOLOGIA DE *Prototheca* spp.

As algas eucarióticas são conhecidas como os mais primitivos representantes do reino *Plantae*. As algas do gênero *Prototheca* descritas em 1894 pela primeira vez, morfológica e fisiologicamente, por Krüger (1894), são microrganismos unicelulares semelhantes às algas do gênero *Chlorella*. As duas espécies denominadas na ocasião como *Prototheca zopfii* e *P. moriformis*, embora fossem diferenciadas principalmente pela ausência de clorofila em sua composição, apresentavam semelhanças quanto à morfologia e forma de reprodução do gênero *Chlorella* (SUDMAN, 1974; PORE et al., 1983). As algas do gênero *Prototheca* perderam, durante a filogênese, o pigmento clorofila e a capacidade de realizar a fotossíntese, havendo mudança para uma nutrição heterotrófica (COSTA et al., 1992).

1.1 CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA

Estudos morfo-fisiológicos de 23 cepas de *Prototheca* reconheceram cinco espécies do gênero: *P. zopfii*, *P. wickerhamii*, *P. stagnora*, *P. filamenta* e *P. moriformis* (ARNOLD; AHEARN, 1972). Estudos posteriores confirmaram por meio da técnica de imunofluorescência, quatro espécies: *P. zopfii*, *P. wickerhamii*, *P. stagnora* e *P. filamenta*, considerando *P. moriformis* estreitamente relacionada à *P. zopfii* (SUDMAN; KAPLAN, 1973). *Prototheca filamenta*, foi incluída no gênero *Sarcinosporon* (KWON-CHUNG; BENNET, 1992), espécie *S. inkin*, pertencente ao reino *Fungi* (PORE, 1985).

O gênero *Prototheca* está incluído na classe *Hyphomycetes* (filo *Deuteromycotina*) do reino *Fungi*, porém, sua posição sistemática é ainda discutida (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992). Alguns autores acreditam, no entanto, que o gênero *Prototheca* ocupa posição taxonômica intermediária entre algas e fungos, pois apresenta características morfológicas e reprodutivas por divisão celular, das algas, além daquelas próprias dos fungos, como ausência de cloroplasto e nutrição heterotrófica (ARNOLD; AHEARN, 1972).

Atualmente, a maioria dos autores reconhece três espécies de *Prototheca*: *P. zopfii*, *P. wickerhamii*, *P. stagnora* (CAMARGO; FISCHMAN, 1979; KAPLAN, 1977; KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; TANYIAMA et al., 1994).

1.2 BIOLOGIA

A reprodução sexuada do gênero *Prototheca* ainda não é conhecida. Sua reprodução assexuada, por fissão múltipla, envolve a produção de células de tamanho e forma características. Durante a ontogenia, desenvolve-se uma célula grande (10 a 30µm) de parede espessa que corresponde à estrutura denominada esporângio, de forma oval ou arredondada com 2 a 16 endósporos, considerados esporangiósporos sem motilidade. O esporângio é semelhante a uma mórula e ao rompe-se libera os endósporos que aumentam de volume e repetem o ciclo reprodutivo. São formadas duas a três células em estágio de repouso com parede espessa - células *dauer*, em 1 a 3% dos esporângios com parede espessa (PORE, 1985). A parede celular se distingue por possuir camada tri-laminar de esporopolenina que não contém quitina nem celulose. Algumas espécies podem desenvolver cápsula de mucopolissacarídeo, que é comum em algas verdes ou em plantas superiores (ATKINSON et al., 1972).

1.3 IDENTIFICAÇÃO DAS ALGAS DO GÊNERO *PROTOTHECA*

1.3.1 Características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas

O microrganismo ao apresentar as células de endosporulação características visíveis será reconhecido facilmente como pertencente ao gênero *Prototheca*. Porém se as características de endosporulação não estiverem presentes, a alga pode ser confundida, no diagnóstico por meio de técnicas histopatológicas, com fungos das espécies: *Paracoccidioides brasiliensis*, *Lacazia loboi*, *Pneumocystis carinii*, *Histoplasma duboisii*, *Blastomyces*

dermatitidis, *Cryptococcus neoformans* e *Rinosporidium seeberi* (SUDMAN; KAPLAN, 1973).

Todas as espécies de *Prototheca* utilizam glicose como fonte de carbono, além de sais inorgânicos (sais de amônio) e proteínas como fonte de nitrogênio. Todas as espécies necessitam de oxigênio e tiamina para o crescimento (PORE, 1985). Os meios de cultura contendo glicose (ex. agar Sabouraud dextrose) são os mais apropriados para cultivar *P. zopfii* (PORE et al., 1983; COSTA et al., 1997). Bactérias e fungos contaminantes podem sobrepujar o crescimento de *Prototheca*. Para suprimir os contaminantes bacterianos, podem ser adicionados ao meio 100mg/ L de cloranfenicol (COSTA et al., 1997). O Meio de Isolamento de *Prototheca* (MIP) (PORE, 1973) e o Meio de Enriquecimento para *Prototheca* (MEP) (PORE et al., 1987) contêm substâncias inibitórias (5-fluorocitosina) e podem ser utilizados para o isolamento seletivo das algas *Prototheca* e *Chlorella*. O cultivo seletivo de *P. zopfii* é também possível em meio (pH 5.1) contendo acetato como única fonte de carbono. A observação em microscópio estereoscópico pode auxiliar na identificação das colônias após 24 horas de incubação (PORE et al., 1983).

As algas do gênero *Prototheca* devem ser diferenciadas das leveduras, devido à semelhança das características culturais. Quando cultivada em agar Sabouraud mantido a 37°C por 48 horas, em condições de aerobiose, *P. zopfii* forma colônias planas, sem coloração ou esbranquiçadas, com aproximadamente 2mm de diâmetro com margens irregulares, superfície irregular, e uma protuberância central compacta. Colônias amarelo-esbranquiçadas de consistência semelhante a cera, com 5 a 7mm de diâmetro podem ser vistas após longo tempo de incubação. O microrganismo forma colônias fracas, pequenas e cinzentas em agar sangue ou agar sangue-esculina. *P. wickerhamii* forma colônias hemisféricas regulares com superfície macia, enquanto *P. stagnora* forma colônias planas com margem inteira e superfície macia (PORE, 1985).

Os esporângios contendo endósporos podem ser visualizados em lâminas preparadas a partir das culturas (ou do sedimento de amostras de leite) com um procedimento simples de coloração e aumento de 400X. Os esporângios de *P. zopfii* são geralmente ovais, alongados ou esféricos, com 15 a 30µm de diâmetro. Os endósporos liberados, com um citoplasma granuloso, são ovais com 8 a 15µm de diâmetro. Todos os estágios celulares de *P. wickerhamii* são esféricos e o tamanho médio das células é aproximadamente a metade daquele relatado para *P. zopfii*. A produção de cápsula detectável pela coloração em tinta da Índia – corante rosa-de-bengala (a cápsula não se cora) ocorre em *P. stagnora* (PORE, 1985). A diferenciação das espécies de *Prototheca* é facilitada pelos testes de assimilação de

carboidratos assim como testes de sensibilidade com neomicina – *P. zopfii* é sensível (CASAL; AROCA, 1995), e clotrimazol - *P. zopfii* é resistente (AALBAEK et al., 1988). Algumas propriedades de diferenciação das três espécies de *Prototheca* são apresentadas na Tabela 1 (PORE, 1985).

Tabela 1 – Características diferenciais de *Prototheca* spp. (PORE, 1985; KWON-CHUNG, BENNET, 1992).

Propriedades	<i>P. zopfii.</i>	<i>P. wickerhamii</i>	<i>P. stagnora</i>
Tamanho da célula (mm)	7 – 30	4 – 10	7 – 14
Assimilação			
Glicose	+	+	+
Galactose	(+)	+	+
Sacarose	-	-	+**
Trealose	-	+***	-
n-propanol	+	-	-
Glicerol	+	+	+
Produção de cápsula	-	-	+
Crescimento a 37°C	+	+	-
Clotrimazol	+	-*	+*

* + e – resistência e sensibilidade ao clotrimazol a 37°C; ** + assimilação após 14 dias; *** + assimilação em 7 dias. A zona de inibição é produzida pelo disco de clotrimazol na *P. wickerhamii*, mas não na *P. zopfii*.

Testes de fermentação com 0,5% de concentração dos carboidratos, utilizados para a assimilação, em meio extrato de carne permitem a identificação de cepas de *P. zopfii* originárias de amostras de leite de glândulas mamárias afetadas, e alcançar um padrão uniforme juntamente com os testes de assimilação. Entretanto, no teste de fermentação algumas cepas podem permanecer negativas em glicerol (PORE, 1985; PORE et al., 1987, PIER et al., 2000). Todos os isolados assimilam acetato em Meio de Isolamento para *Prototheca* (MIP) ajustado para pH 7,0 assim como em pH 5,1, porém *P. wickerhamii* não é capaz de crescer em pH 5,1 (PORE, 1985). Todas as cepas têm reações idênticas no kit API 20 C Aux, somente positivo para glicose e glicerol (PADHYE; BAKER; D’AMATO, 1979). A administração de clotrimazol não afeta o crescimento destas algas. Um teste simples permite diferenciar *P. zopfii* de *P. wickerhamii* pela determinação da sensibilidade ao clotrimazol (CASAL; GUTIERREZ, 1983).

1.3.2 Imunodiagnóstico

Poucos estudos abordam a determinação de anticorpos em soro de vacas com mastite causada por *P. zopfii*. Ensaio eletroforéticos com células de *P. zopfii* tratadas com ultra-som demonstraram que 40-42% das vacas com mastite por *Prototheca* spp. tinham anticorpos precipitantes (PIER et al., 2000). Uma técnica de ensaio de ligação enzimática imunoabsorvente altamente sensível (ELISA) para a monitorização de anticorpos no soro de vacas detecta anticorpos, tanto em vacas doentes quanto saudáveis, com similaridade de resposta sorológica com outros agentes patogênicos de vacas tais como *Aspergillus fumigatus*. (PIER et al., 2000). Essa evidência pode ser explicada pelas inúmeras possibilidades de as vacas leiteiras encontrarem-se expostas às algas através dos contatos de curta duração. Esta suposição é confirmada pelo isolamento freqüente de *P. zopfii* do meio ambiente dos rebanhos leiteiros incluindo fezes bovinas (COSTA et al., 2000b). Embora possa estar presente uma forte resposta sorológica em vacas infectadas, o título obtido isoladamente em amostras de soro não parece ter validade para diagnóstico da mastite bovina causada por *P. zopfii* (PIER et al., 2000).

1.4 ANÁLISE DE AMOSTRAS COMPOSTAS DE LEITE

Em propriedades leiteiras *Prototheca* spp. pode ser isolada de amostras individuais de leite ou de amostras compostas. A análise de amostras de leite de tanques de expansão é um método utilizado com a finalidade de verificar a qualidade microbiológica do leite, além de poder ser empregada para a identificação de microrganismos patogênicos específicos responsáveis por infecções intramamárias nas vacas e com importância para a saúde pública. A análise de amostras compostas é um método de monitoramento eficaz diminuindo consideravelmente os custos com exames laboratoriais (BRITO et al., 1999).

Pore et al. (1987) citam que a análise de amostras de tanque permite a realização de estudos epidemiológicos nas propriedades devido à correlação existente entre o isolamento de *Prototheca* spp. nos tanques de expansão e nas amostras de leite de vacas com mastite. Os autores desenvolveram um meio de enriquecimento de *Prototheca* spp. para facilitar o isolamento a partir de amostras compostas. Em propriedades com isolamento de

Prototheca spp. em amostras de tanque recomendam um número de quatro repetições, com um intervalo de cinco dias, para o diagnóstico em vacas individualmente.

Melville (1995) utilizou o método de plaqueamento direto do leite de tanques de expansão em dez propriedades leiteiras e demonstrou ser eficaz, por confirmar a presença de *P. zopfii* em amostras de leite de vacas com mastite em quatro propriedades leiteiras com isolamento do agente nos tanques de expansão. Observou que mesmo em propriedades com uma única vaca com mastite por *Prototheca* spp. foi possível a identificação em a mostra de tanque.

2 PATOGENICIDADE DAS ALGAS DO GÊNERO *Prototheca* AO HOMEM E AOS ANIMAIS E IMPORTÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA

As algas do gênero *Prototheca*, *P. zopfii* e *P. wickerhamii* podem causar infecção oportunista pouco freqüente, sob as formas localizada ou sistêmica, denominada prototecose, no homem (DAVIES; SPENCER; WAKELIN, 1964; KLINTWORTH; FETTER; NIELSEN, 1968; KAMINSKI et al., 1992; TANG et al., 1995; MONOPOLI; ACCETURI; LOMBARDO, 1995), nos animais domésticos (VAN KRUININGEN, 1970; SUDMAN, 1973; SUDMAN, 1974; ROGERS, 1974; TANYIAMA et al., 1994) e silvestres (FRESE; GEDEK, 1968).

A maioria das infecções por *Prototheca* spp. em humanos parece resultar de inoculação direta do microrganismo no local infectado, geralmente por trauma, cujo período de incubação estende-se por várias semanas. A raridade destas infecções está relacionada provavelmente à baixa virulência do microrganismo e a um sistema de defesa efetivo do hospedeiro. Até o final da década de 80 os casos relatados em humanos ocorreram em hospedeiros hígidos que não apresentavam imunossupressão. Até meados do ano 2004 havia relatos de 107 casos de prototecose humana. A partir da década de 90 o número de casos de prototecose humana tem aumentado devido à associação com hospedeiros imunossuprimidos acometidos pela síndrome da imunodeficiência adquirida. As lesões clínicas são caracterizadas por nódulos cutâneos eritematosos, placas ou úlceras superficiais que se distribuem principalmente sobre as áreas expostas. As lesões cutâneas podem persistir por vários meses ou anos. Algumas vezes os nódulos ou placas podem curar-se espontaneamente, entretanto, poucos casos de infecção cutânea generalizada, subcutânea e visceral, foram descritos em hospedeiros imunocomprometidos (COX; WILSON; BROWN, 1974; TYRING et al., 1989; KAMINSKI et al., 1992; MONOPOLI; ACCETURI; LOMBARDO, 1995; CAREY et al., 1997).

No homem a prototecose manifesta-se sob as mais variadas formas: bursite do olécrano, infecção sistêmica, lesões cutâneas, meningite, gastroenterite (NOSANCHUK; GREENBERG, 1973; COX; WILSON; BROWN, 1974; DAVIES et al., 1964; KLINTWORTH; FETTER; NIELSEN, 1968; TYRING et al., 1989; CHAN et al., 1990; WALSH; JOHNSON; TAHAN, 1998; KAMINSKI et al., 1992; IACOVIELLO, 1992; KIM et al., 1996; GALÁN et al., 1997; MOHABEER et al., 1997; COSTA et al., 1998; LEIMANN et al., 2004).

A maioria dos relatos está relacionada às mais variadas causas: transplantes de órgãos, cirurgias ortopédicas, injeções de corticosteróides tópicas ou sistêmicas, alcoolismo, desequilíbrio endócrino (hiper e hipotireoidismo), neoplasias, *miasthenia gravis*, diabetes *mellitus*, doença degenerativa articular, leucemia linfocítica, doença pulmonar obstrutiva crônica, diálise peritoneal contínua, a síndrome da imunodeficiência adquirida e contato com água de lagos. As lesões relacionadas consistiam de tenosinovite, nódulos subcutâneos em extremidades e articulações, peritonite, onicoprotocose, protocose disseminada, meningite, gastroenterite e lesões cutâneas (LEIMANN et al. 2004).

A protocose nos animais foi descrita em várias espécies domésticas e silvestres: bovinos, cães, gatos, cervos e salmão. A infecção nos animais inferiores apresenta uma forma mais severa, com caráter sistêmico ou localizado. A doença foi relatada em felinos domésticos e em cães como infecção sistêmica sob várias formas de manifestação (enterocolite, envolvimento ocular, neurológico) e infecção cutânea (VAN KRUININGEN; GARNER; SCHIEFER, 1969; POVEY et al., 1969; VAN KRUININGEN, 1970; SUDMAN; MAJKA; KAPLAN, 1973; KAPLAN, 1976; IMES et al., 1977; TYLER et al., 1980; COLOE, 1982; MACARTNEY; RYCROFT; HAMMIL, 1988). Há relatos de protocose disseminada em bovinos na forma de linfadenite, ou atingindo órgãos da cavidade torácica e abdominal, através dos linfonodos regionais da glândula mamária (MIGAKI et al., 1969; ROGERS, 1974; TANYIAMA et al., 1994).

A mastite bovina causada por *P. zopfii* tem sido relatada em vários países em número crescente de relatos sob a forma de surtos ou isoladamente em casos esporádicos (FRANK et al., 1969; BODENHOFF; MADSEN, 1978; DION, 1979; DION, 1982; McDONALD; RICHARD; ANDERSON, 1984b; HODGES et al., 1985; SPALTON, 1985; COSTA et al., 1992; LANGONI et al., 1992; ALMERAYA, 1994; AALBAEK et al., 1994; COSTA et al., 1995; COSTA et al., 1996; COSTA et al., 1998; TENHAGEN et al., 1999; JÁNOSI et al., 2001a).

A mastite bovina causada por *P. zopfii* apresenta importância econômica, social e em saúde pública. Em saúde pública sua importância está relacionada com a transmissão de infecção gastroentérica, principalmente em indivíduos jovens, devido à ingestão de leite contaminado (ALMERAYA, 1994).

Melville (1995) relata a possibilidade de sobrevivência da *P. zopfii* aos processos de pasteurização. De 40 cepas de *P. zopfii* 34 foram resistentes aos processos de pasteurização empregados sob diferentes variações de temperatura e tempo. Evidencia-se dessa maneira a possibilidade da transmissão deste agente pelo leite e derivados ao homem, e

a importância da adoção de medidas profiláticas para o controle da mastite bovina causada por microrganismos patogênicos veiculados por leite contaminado.

Costa et al. (1998b) demonstraram que a ingestão voluntária por um indivíduo da espécie humana de queijo fresco contaminado com *Prototheca* spp., pode acarretar distúrbio gastrointestinal.

3 MASTITE BOVINA CAUSADA POR *PROTOTHECA ZOPFII*

3.1 ASPECTOS CLÍNICOS

A mastite é um processo inflamatório da glândula mamária que se manifesta sob as formas: aguda, subaguda ou crônica (BLOOD; RADOSTITS, 1989). Para uma melhor diferenciação da intensidade do processo inflamatório são utilizadas as denominações clínica e subclínica, internacionalmente em medicina veterinária.

A forma clínica é caracterizada por alteração visível da composição e aspecto físico do leite (presença de grumos de fibrina ou pus), podem ocorrer, concomitantemente, alterações de tamanho, consistência e temperatura da glândula mamária. O diagnóstico desta forma de mastite pode ser feito por meio de inspeção e palpação da glândula, prova de Tamis ou caneca telada (*strip cup*), prova esta que consiste na ordenha dos primeiros jatos de leite em recipientes apropriados que permitem verificação de presença de grumos ou pus no leite (BLOOD; RADOSTITS, 1989). Na mastite clínica bovina causada por *P. zopfii* a glândula mamária apresenta-se endurecida, o leite torna-se aquoso e com presença de grumos (FRANK et al., 1969; McDONALD; RICHARD; ANDERSON, 1984b; CORBELLINI et al., 2001). Estudos clínicos da mastite devido à *P. zopfii* revelam que não costumam ocorrer sinais clínicos sistêmicos e os animais acometidos apresentam temperatura e apetite normais. A forma denominada subclínica não apresenta alterações macroscópicas no leite e na glândula mamária. Considerado como um processo inaparente pode ser diagnosticado apenas por meio de exames indiretos, como *Califórnia Mastitis Test* (CMT) (SCHALM; NOORLANDER, 1957). Este teste consiste na reação do leite com detergente catiônico que promove a liberação do DNA das células somáticas, permitindo a quantificação aproximada principalmente dos leucócitos presentes em um processo inflamatório. Em consequência desta reação forma-se um composto, com consistência de gel, cuja intensidade corresponde à quantidade de células presentes (BLOOD; RADOSTITS, 1989).

As duas formas, clínica e subclínica, causam uma redução significativa da produção de leite na glândula mamária (FRANK et al., 1969; McDONALD; RICHARD; ANDERSON, 1984b; CORBELLINI et al., 2001). A ocorrência de infecção intramamária também pode ocorrer durante o período seco ou período entre as lactações, em que há suspensão da ordenha do animal para permitir a restauração do tecido mamário. Em

consequência deste fato a recuperação da glândula mamária fica comprometida para a próxima lactação e ocorre uma redução em até 35% na produção leiteira (BLOOD; RADOSTITS, 1989; COSTA et al., 1996b).

A mastite bovina clínica e subclínica causada por *Prototheca zopfii* tem demonstrado elevação do número de relatos há algumas décadas, desde a primeira descrição feita por LERCHE (1952) na Alemanha, sendo considerada, portanto, uma doença emergente.

3.2 EPIDEMIOLOGIA

Casos esporádicos de mastite causada por algas do gênero *Prototheca* foram registradas na Europa, Américas do Norte, Central e Sul, e Ásia (BODENHOFF; MADSEN, 1978; DION, 1979, 1982; ANDERSON; WALKER, 1988; SPALTON, 1985; AALBAEK et al., 1988; LAGNEAU, 1996; ALMERAYA, 1994; BRITO; VEIGA, 1994; COSTA et al. 1996b; TANYIAMA et al., 1994; VARGAS et al., 1998; FILLIPSEN et al., 1999; PARDO et al., 1999; YAMAMURA et al., 2001).

Há vários relatos de mastite bovina endêmica por *Prototheca* spp. com número elevado de vacas afetadas, em áreas geográficas na sua grande maioria com altas temperatura e umidade, onde as condições climáticas são propícias para uma rápida multiplicação deste agente patogênico no meio ambiente (HODGES et al., 1985; COSTA et al., 1992; LANGONI et al., 1992; COSTA et al., 1995; COSTA et al., 1996a; COSTA et al., 1996b; COSTA et al., 1998a).

Embora existam numerosos relatos na literatura internacional sobre a ocorrência de mastite bovina causada por *P. zopfii*, a real incidência desta doença é provavelmente muito maior, devido às falhas na identificação de *P. zopfii* que podem ser confundidas com leveduras ou à ausência de crescimento nos meios de cultura utilizados na rotina bacteriológica (SPALTON, 1985).

Os primeiros registros de surtos de mastite bovina causada por *Prototheca* spp. no Brasil datam de 1992 e referem-se a propriedades leiteiras situadas em Tambaú e Itapetininga, no estado de São Paulo (COSTA et al., 1992; LANGONI et al., 1992).

Em estudos posteriores em 28 propriedades leiteiras localizadas nos Estados de São Paulo e Minas Gerais foram identificados os microrganismos mais prevalentes em processos de mastite clínica bovina. Foram examinadas 3.574 vacas em diferentes estágios de

lactação e realizados 13.718 exames de tamis, destes 877 foram positivos. Verificou-se que nas amostras positivas analisadas (77,77%) os principais agentes de mastite clínica isolados foram: *Staphylococcus* spp. (34,09%), *Streptococcus* spp. (28,05%) e *Corynebacterium* spp. (21,77%). O elevado índice de ocorrência de mastite clínica bovina por algas do gênero *Prototheca* spp. (6,33%), foi considerado um fato preocupante devido à recomendação internacional de descarte dos animais afetados (COSTA et al., 1995).

Costa et al. (1996a) observaram alta prevalência de mastite clínica durante surto de mastite bovina, em que o índice de infecção por algas do gênero *Prototheca* foi de 8,06% e por *Nocardia* spp. 2,15 %. O manejo e as condições dos piquetes onde os animais eram mantidos sugeriam uma fonte de contaminação ambiental para a mastite, confirmada pelos resultados dos exames microbiológicos. Os procedimentos de manejo utilizados para aquele rebanho provavelmente contribuíram para a multiplicação dos microrganismos ambientais, como as espécies de *Prototheca* que habitam áreas úmidas, particularmente aquelas contaminadas com fezes. Deficiências de higiene de ordenha com limpeza insuficiente dos tetos, em que foram deixadas camadas de fezes e solo, teriam também contribuído para a infecção com microrganismos ambientais. O iodo utilizado no *pós-dipping* é um bom anti-séptico, mas torna-se ineficaz em presença de matéria orgânica representada por fezes, permitindo assim a contaminação do equipamento de ordenha por microrganismos ambientais. Outros fatores que podem ter contribuído para a elevação da ocorrência de novas infecções foram: limpeza deficiente do equipamento de ordenha e falta de oferta de alimentação aos animais após a ordenha. Isto pode ter levado as vacas a se deitarem em solo contaminado, com o esfíncter do teto ainda relaxado.

P. zopfii também é considerada importante agente de mastite subclínica, Costa et al. (1996b) constataram um índice elevado de mastite subclínica por *P. zopfii* em 14,95% vacas em fase de lactação e 8,06% em vacas secas em uma propriedade. Em outra propriedade os autores isolaram *P. zopfii* de amostras de leite de dez vacas em lactação (5,1%) com mastite subclínica. Em função de diversas dificuldades no diagnóstico, animais com infecções subclínicas por *Prototheca* spp. permanecem no rebanho como potencial fonte de infecção para outros animais.

A prevalência de mastite ambiental em 52 propriedades leiteiras, localizadas em 32 municípios dos estados de São Paulo e Minas Gerais foi descrita por Costa et al. (1998a) enfocando os principais agentes patogênicos ambientais em 736 casos de mastite bovina, além de avaliar a influência da estação do ano, condições de alojamento e manejo. Entre os diferentes microrganismos isolados a *Prototheca* spp. teve uma participação de

41,2% das infecções. Neste trabalho os autores chegaram à conclusão de que a ocorrência de mastite foi elevada em rebanhos que: não foram alimentados imediatamente após a ordenha, foram mantidos em sistema *free stall*, as vacas secas não eram submetidas à terapia e ao uso de *pós-dipping* durante a ordenha. A estação do ano exerceu influência sobre a ocorrência de novas infecções, principalmente nas estações de temperatura e umidade elevadas.

Nos poucos trabalhos realizados na região norte do estado do Paraná foi observada prevalência de casos de mastite bovina clínica e subclínica por algas do gênero *Prototheca* de 0,45% (FILLIPSEN et al., 1999), 14,11% (YAMAMURA; METTIFOGO; SHIMADA, 2000) e 15,38% (PARDO et al., 1999).

Costa et al. (2000a) analisaram as principais bacias leiteiras do estado de São Paulo entre: Bacia da Alta Paulista, Bacia da Alta Mogiana, Bacia de Campinas, Bacia do Vale do Ribeira, Bacia de Bragança Paulista, Bacia de São Carlos, Bacia de São José dos Campos. O estudo compreendeu análises microbiológicas de 31.625 amostras de leite, de 19 propriedades de leite Tipo A, 131 propriedades de leite Tipo B e de 33 propriedades de leite Tipo C, em diferentes estações do ano. Entre os microrganismos ambientais foram isolados fungos micelianos, leveduras, algas e diversos gêneros e espécies de bactérias. Entre os fungos predominaram as leveduras do gênero *Candida* e entre as algas *P. zopfii*. O número de casos de mastite por *Prototheca* spp. foi mais elevado nas propriedades leiteiras da Bacia da Alta Paulista, em número reduzido nas propriedades das bacias leiteiras restantes e ausente no Vale do Ribeira. Os fungos apresentaram menor ocorrência no inverno (0,13%), em relação ao verão (2,36%). As mastites por microrganismos ambientais representados por: fungos micelianos, leveduras e *P. zopfii* apresentaram ocorrência maior em propriedades produtoras leite tipo B em comparação ao leite tipo C e tipo A.

O primeiro estudo sobre a ecologia das algas do gênero *Prototheca*, no Brasil, foi realizado em 1978, nos municípios localizados nos Estados de São Paulo e Paraná. Neste estudo foram isoladas 43 cepas de *P. wickerhamii* e nove de *P. zopfii* em amostras colhidas de: rios, lagos naturais e artificiais, esgotos e charcos (CAMARGO; FISCHMAN, 1979).

PORE et al. (1983) isolaram algas do gênero *Prototheca* de amostras de diversas origens em várias cidades localizadas nos Estados Unidos, Haiti e Filipinas. As amostras consistiram: de fezes, seiva de plantas, água de lagos e lagoas, água corrente, água do mar, água de bebida, alimentos, gelo em bebidas, áreas alagadas, além de águas servidas e água tratada, tanto na zona rural quanto urbana. Em Manila, nas Filipinas, os estudos de sazonalidade indicaram uma tendência de presença de *Prototheca* spp. nas estações chuvosas.

Embora muitas fontes de água tenham consistido de córregos, havia a indicação de que a chuva carregava *Prototheca* spp..

HODGES et al. (1985) relataram um surto de mastite causada por *P. zopfii* ocorrido na Nova Zelândia, com 17 vacas afetadas por mastite clínica e subclínica. Além da avaliação das lesões dos úberes afetados isolaram o microrganismo de amostras do meio ambiente. Sugeriram a possibilidade de a infecção ser resultante de lesões nos tetos causadas pela ordenhadeira mecânica e pelo hábito de as vacas leiteiras deitarem no chão após a ordenha, em superfície muitas vezes alagada com água de chuva e contaminada por *Prototheca* spp..

Fontes ambientais de contaminação por *Prototheca* spp. foram analisadas em seis propriedades leiteiras, duas delas sem história de mastite por *Prototheca* spp., por Anderson e Walker (1988). A alga foi isolada na Carolina do Norte, Estados Unidos, de amostras de: água de bebida do gado, cocho de alimentação, lama, resíduos e fezes excretadas, vegetação, do piso da ante-sala e sala de ordenha no sistema *free stall*. *Prototheca* spp. foi isolada de 48 (25%) de um total de 190 amostras colhidas em vários locais. Em uma das propriedades leiteiras a alga foi isolada em 18 amostras (18/38). Os isolados consistiram de *P. zopfii* (45,94%) e *P. wickerhamii* (3,6%). Não houve diferença na frequência de isolamento de *Prototheca* spp. das amostras de propriedades leiteiras com ou sem uma história de mastite por esse agente. Nos locais mais úmidos e ricos em matéria orgânica a *Prototheca* spp. foi isolada com maior frequência.

Fezes contaminadas por *Prototheca* spp. de diferentes espécies animais podem ser responsáveis pela contaminação ambiental e conseqüente disseminação do agente na propriedade.

Pore e Shahan (1988) isolaram *Prototheca* spp. de fezes de suínos, ovinos e ratos. A *Prototheca* spp. possivelmente não se multiplica no trato digestivo dos animais, a sua multiplicação ocorre no meio ambiente rico em matéria orgânica e úmido. Alimentos úmidos e deteriorados podem se constituir em fonte de infecção para as vacas leiteiras e demais espécies animais.

A *Prototheca* spp. foi isolada de fezes de bovinos e suínos domésticos e silvestres (ENDERS; WEBER, 1993, WEBER; ENDERS, 1993). Os autores isolaram o agente em 146 (48,7%) amostras de fezes de bovinos, comprovando que essas espécies podem albergar e disseminar a alga no meio ambiente.

COSTA et al. (1997) obtiveram o isolamento de *P. zopfii* em surto de mastite bovina de amostras de fezes de bezerros e vacas em lactação, teteiras, amostras de

água de bebedouro, esgoto e solo de pastagem. A presença de *P. zopfii* nas teteiras indica que a higiene e manutenção deficientes do equipamento de ordenha podem ser responsáveis pela transmissão do microrganismo, mesmo após a imersão das teteiras em solução clorada.

A utilização de leite de vacas com mastite na alimentação de bezerros, embora não aconselhável, é uma prática comum no Brasil. Em bezerros que receberam experimentalmente administração oral de suspensão de *P. zopfii*, em solução fisiológica e leite, além de bezerros lactentes alimentados com leite de vacas com mastite por *P. zopfii*, foi isolado o agente a partir de swabs retais (COSTA et al., 1992; COSTA et al., 2000b). Os bezerros podem ser considerados importante elo na cadeia epidemiológica da prototecose bovina atuando como fonte de infecção e como via de transmissão. O manejo de ordenha adequado, com a adoção do descarte do leite contaminado, e segregação imediata das fêmeas bovinas com mastite por *Prototheca* spp., são medidas de controle e prevenção de novas infecções no rebanho. Animais silvestres de vida livre poderiam atuar como disseminadores da prototecose bovina, pela eliminação fecal, na propriedade leiteira, e nas circunvizinhas desta, uma vez que os bovinos leiteiros muitas vezes têm acesso a açudes comuns a várias propriedades. Peixes tilápias (*Tilapia niloticus*) podem tornar-se um importante elo na cadeia epidemiológica da mastite por *Prototheca* spp, devido à presença de *P. zopfii* em amostras de vísceras (trato gastrointestinal), verificado em surto de mastite bovina por *P. zopfii* em propriedade leiteira. Os demais animais silvestres avaliados por meio de amostras de fezes, consistiram de: capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*), anatídeos (pato corredor – *Neochen jubatus*); e vísceras de patos silvestres (*Cairina moschata*), não apresentando *P. zopfii* no trato gastrointestinal (COSTA et al., 2001).

Tenhagen et al. (1999) compararam, em um rebanho, as vacas com mastite por *P. zopfii* com as sadias, analisando fatores de risco como: número de partos, estágio da lactação, histórico de mastite anterior com uso de antibióticos, comparação de quartos afetados, produção e composição do leite. Os autores observaram que o risco de adquirir a infecção aumentou com a idade e número de partos do animal, histórico de mastite, especialmente com tratamentos antimicrobianos anteriores e animais com contagem elevada de células somáticas.

A forma endêmica da mastite bovina por *P. zopfii* costuma ocorrer em regiões de clima tropical que propicia condições de umidade e temperatura para o crescimento deste agente patogênico no meio ambiente. Entretanto, em zonas de clima temperado esta forma pode ocorrer em áreas geográficas com umidade relativamente alta. Este fato foi observado por János et al. (2001b) na Hungria. Os autores observaram pelo período de dois

anos 223 vacas com mastite por *P. zopfii* em trinta e dois rebanhos leiteiros com surtos e casos esporádicos da enfermidade. Todos os rebanhos com surtos apresentavam condições higiênicas ruins e falhas no manejo, porém não pode ser identificado nenhum fator predisponente específico.

3.3 PATOLOGIA

Cheville, McDonald e Richard (1984) estudaram em vacas com infecções intramamárias agudas e crônicas a degeneração das organelas citoplasmáticas da parede celular de *P. zopfii*, ação dos macrófagos e alterações sofridas pelos mesmos em tecido mamário bovino durante os estágios do ciclo reprodutivo da alga e as lesões da glândula mamária. Em lesões recentes as algas englobadas por macrófagos estavam localizadas no interior do lúmen alveolar e em lesões crônicas, o processo inflamatório acometeu principalmente o tecido intersticial com grande número de algas envolvendo os macrófagos seqüestrados entre as células epiteliais de ácinos mamários e tecido conjuntivo peri-acinar. Constataram que *P. zopfii* vive no interior dos macrófagos, mas não em células epiteliais de ácinos mamários bovinos. É provável que as algas não se repliquem intracelularmente, e sim que os macrófagos inicialmente realizem a fagocitose, porém falhem na tentativa de eliminar a população total de algas infectantes.

McDonald, Richard e Cheville (1984a) verificaram que ao exame *post mortem* os tecidos mamários afetados revelaram um aumento de volume e edema dos linfonodos supramamários, além de reduzido número de unidades formadoras de colônias de *P. zopfii*. As alterações patológicas macroscópicas das lesões de glândula mamária de vacas experimental e naturalmente infectadas foram semelhantes. O estudo histopatológico revelou a presença de inflamação piogranulomatosa no tecido alveolar com aumento gradativo da severidade. Os ductos, geralmente, permaneceram livres de inflamação e de algas. O tecido da glândula mamária, inoculada experimentalmente, apresentou severa inflamação granulomatosa difusa, com algas presentes no lúmen alveolar, com elevado número de algas sem organelas citoplasmáticas. O tecido mamário das vacas infectadas naturalmente apresentou inflamação granulomatosa difusa, com quase todas as algas localizadas no interstício dos alvéolos ou na camada epitelial. O encontro de *P. zopfii* intacta em macrófagos do tecido granulomatoso poderia indicar que um complexo mecanismo imunológico de defesa existe na prototecose.

Benites et al. (1999) observaram processo inflamatório caracterizado por infiltrado misto (células mono e polimorfonucleares, neutrófilos, eosinófilos) podendo ser verificado no parênquima glandular na maioria dos exames histopatológicos. A microscopia eletrônica permite, ainda, concluir que a parede celular da alga parece estar associada à resistência aos quimioterápicos, dificultando a resolução do processo inflamatório agudo.

3.4 TRATAMENTO E CONTROLE

Nas últimas décadas as tentativas de obtenção da cura de mastite bovina causada por *P. zopfii* não obtiveram êxito. Os estudos terapêuticos foram conduzidos durante surtos de mastite bovina ou em casos isolados da infecção intramamária, porém todas as tentativas resultaram em fracasso (STERN et al., 1984; SPALTON, 1985).

Embora os isolados de *P. zopfii* sejam sensíveis a inúmeros agentes terapêuticos *in vitro*, as diversas tentativas de tratamento intramamário com antimicrobianos nunca foram bem sucedidas, por isso muitos autores têm confirmado que o tratamento de vacas leiteiras acometidas com mastite não altera o curso da doença (LAGNEAU, 1996; COSTA et al., 1996b). Os antimicrobianos utilizados compreendem desde aqueles utilizados há décadas até os recentemente desenvolvidos pela indústria farmacêutica, tais como: estreptomicina, neomicina, clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina, cloranfenicol, penicilina, eritromicina, nitrofurazona, nitrofurantoina, bacitracina, oleandomicina, sulfatiazol, e aos antifúngicos polienicos, nistatina, anfotericina B e miconazol.

Quarenta e oito cepas de *P. zopfii* isoladas de mastite bovina foram analisadas quanto à sensibilidade *in vitro* a antimicrobianos. Todas as cepas foram sensíveis à polimixina e nistatina, as demais cepas foram sensíveis: 22 à anfotericina B, 21 à polimixina, 18 à gentamicina e uma à kanamicina (McDONALD; RICHARD; ANDERSON, 1984b).

Testes de sensibilidade *in vitro* com cepa de *P. zopfii* isolada de mastite bovina demonstraram resistência do microrganismo aos antimicrobianos: ampicilina, cefoperazona, danofloxacina, cloranfenicol, estreptomicina, gentamicina, lincomicina, neomicina, nitrofurantoina, oxacilina, penicilina, polimixina B, sulfazotrin, tiamulina, e tetraciclina (VARGAS et al., 1998).

Nos testes de sensibilidade *in vitro* os antifúngicos nistatina e anfotericina B produziram efeito inibitório no crescimento dos microrganismos e o miconazol apresentou

variação na sensibilidade. *In vivo* o número de algas eliminadas no leite das glândulas tratadas não foi afetado com nistatina e sulfato de estreptomicina (FRANK et al., 1969; SEGAL et al., 1976; SPALTON, 1985).

Devido ao insucesso da terapêutica com antibióticos, antifúngicos e sulfonamidas, foram feitas tentativas com o emprego de formulações à base de anti-helmínticos (levamisol, hidrocloreto de tetramisol), própolis, extrato de sementes de frutas cítricas, além de procedimentos com ordenhas sucessivas. As alternativas terapêuticas e os procedimentos relatados foram considerados eficazes em mastites bovinas recentes por *P. zopfii*, naturalmente ou experimentalmente adquiridas (BERGMANN, 1993; BRITO; VEIGA, 1997; LANGONI et al., 1995; YAMAMURA; METTIFOGO; SHIMADA, 2000).

Apesar de os tratamentos intramamários com antimicrobianos não promoverem a cura de vacas leiteiras acometidas pela mastite por *P. zopfii*, a terapia com antifúngicos têm se mostrado eficaz na prototecose humana cutânea e sistêmica. O emprego de antifúngicos com formulações para uso tópico ou oral tem se revelado eficiente em casos isolados da prototecose humana: hidrocloreto de tetraciclina e anfotericina B (tópico), fluconazol (oral) e cetoconazol (tópico) na prototecose cutânea e anfotericina B (intravenosa) e cetoconazol (oral) em prototecose sistêmica (COX; BROWN; WILSON, 1974; TYRING et al., 1989; CHAN et al., 1990; MONOPOLI; ACCETURI; LOMBARDO, 1995; TANG et al., 1995; GALÁN et al., 1997; KIM et al., 1999).

A impossibilidade de cura por meio da utilização dos recursos terapêuticos consagrados na atualidade resultou em recomendação internacional para que as vacas leiteiras com mastite por *Prototheca* spp. sejam segregadas e rapidamente removidas do rebanho com a finalidade de prevenir uma possível disseminação do agente infeccioso (KIRK, 1991).

Costa et al. (1999) obtiveram êxito no controle da mastite bovina em um rebanho com surto de mastite por *P. zopfii*. As medidas iniciais consistiram de descarte dos animais infectados por *P. zopfii* e da cauterização química com solução de nitrato de prata a 0,75% dos quartos afetados em animais de primeira e segunda lactação com apenas um quarto afetado. As demais medidas de controle se voltaram para as instalações, manejo e higiene de ordenha: foi construída uma nova sala de ordenha, os animais foram confinados em sistema de *free stall*, a água destinada à higiene de ordenha dos animais passou a ser proveniente de uma mina e a água de descarte passou a ser tratada antes de ser encaminhada para o córrego. Após a efetivação das medidas de prevenção e controle não ocorreram novos casos de mastite por esta alga no período de dois anos de avaliação.

REFERÊNCIAS

AALBAEK, B.; STENDERUP, J.; JENSEN, H.E.; VALBAK, J.; NYLIN, B.; HUDA, A. Mycotic and algal bovine mastitis in Denmark. **Acta of Pathology Microbiology and Immunology Scandinavian**, Denmark, v.102, p.451-456, 1994.

ALMERAYA, A.P. Aislamento de *Prototheca* em un brote de mastitis bovina. **Veterinaria México**, [S.I.], v.25, n.1, p.65-67, 1994.

ANDERSON, K.L.; WALKER, R.L. Sources of *Prototheca* spp. in a dairy herd environment. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.193, n.5, p.553-556, 1988.

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

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

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. **Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira**, São Paulo, ano II, n.1, p.22-26, 1999.

BERGMANN, A. Udder compatibility of tetramisole and levamisole hydrochloride and suggestion for the prescription of their intramammary use in cattle against *Prototheca zopfii*. **Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift**, Berlin, v.106, n.8, p.253-256, 1993.

BLOOD, D.C.; RADOSTITS, O.M. **Veterinary Medicine**. 7th ed., London: Ballière Tindall, 1989.

BODENHOFF, J. MADSEN, P.S. bovine protothecosis: a brief report of ten cases. **Acta of Pathology Microbiology and Immunology Scandinavian**, [S.I.], v.86, p.51-52, 1978.

BRITO, M.A.V.P.; VEIGA, V. M.O. Mastite bovina causada por *Prototheca zopfii* Relato de um caso. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.27, n.4, p.681-684, 1997.

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; RIBEIRO, M.T.; VEIGA, V.M.O. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.51, n.2, p.129-135, 1999.

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

CAMARGO, Z.P. de; FISCHMAN, O. Isolation of *Prototheca* from water samples from southern Brazil. **Rickia**, [S.I.], v.9, p.55-59, 1981.

CAREY, W.P.; KAYKOVA, Y.; BANDRES, J.C., SIDHU, G., BRÄU, N. Cutaneous protothecosis in a patient with AIDS and a severe functional, neutrophil defect: successful therapy with amphotericin B. **Clinical and Infectious Diseases**, Chicago, v.25, p.1265-1266, 1997.

CASAL, M.I.; GUTIERREZ, J. A simple new test for rapid differentiation of *Prototheca wickerhamii* from *Prototheca zopfii*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.18, p.922-993, 1983.

CASAL, M.; AROCA, J.G. Investigación de la sensibilidad de *Prototheca zopfii* a los antifúngicos, quimioterápicos y sulfamidas. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, [S.I.], v.25, p.259-262, 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: successful antifungal therapy. **Reviews of Infectious Diseases**, [S.I.], v.12, n.5, 1990.

CHEVILLE, N.F.; McDONALD, J.; RICHARD, J.L. Ultrastructure of *Prototheca zopfii* in bovine granulomatous mastitis. **Veterinary Pathology**, [S.I.], v.21, p.341-348, 1984.

COLOE, P.J. Protothecosis in a cat. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.180, p.78-79, 1982.

CORBELLINI, L.G.; DRIEMEIER, D; CRUZ, M.; DIAS, M.M.; FERREIRO, L. Bovine mastitis due to *Prototheca zopfii*: clinical, epidemiological and pathological aspects in a Brazilian dairy herd. **Tropical Animal Health and Production**, [S.I.], v.33, p.463-470, 2001.

COSTA, E.; SHARUK, D.A.; TAMASO, E.; CARCIOFI, A. MELVILLE, P.A; PÂNTANO, T.; PRADA, M.S. Contribuição para o estudo da etiologia da mastite infecciosa bovina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 22., 1992, Curitiba, **Anais...**, Curitiba, 1992, p.

COSTA, E. O; BENITES, N.R.; MELVILLE, P. A; PRADO, R.B.: RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T. Estudo etiológico da mastite clínica bovina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, São Paulo, v.17, n.4, p. 156-158, 1995.

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, Brazil. **Veterinary Research Communications**, Netherlands, v.20, p.237-241, 1996a.

COSTA, E.O.; CARCIOFI, A.C.; MELVILLE, P.A.; PRADA, M. A.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T. Bovine mastitis due to algae of the genus *Prototheca* sp. **Mycopathologia**, Netherlands, v.133, p.85-88, 1996b.

COSTA, E.O.; MELVILLE, P.A; RIBEIRO, R.; WATANABE, E.T.; PAROLARI, M.C..F.F. Epidemiologic study of environmental sources in a *Prototheca zopfii* outbreak of bovine mastitis. **Mycopathologia**, Netherlands, 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. **Journal of Veterinary Medicine**, Berlin, v.45, p.65-71, 1998a.

COSTA, E.O.; MELVILLE, P.A.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T. Relato de um caso de consumo de queijo fresco contaminado com *Prototheca* sp. **Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira**, São Paulo, ano I, n.1, p.9-10, 1998b.

COSTA, E.O.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T.; GARINO JR, F.; SILVIA, J.A.B.; JUNQUEIRA, L. Controle de surto de mastite por *Prototheca zopfii* em uma propriedade leiteira. **Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira**, São Paulo, ano II, n.6, 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. **Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira**, São Paulo, ano III, n.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. **Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira**, São Paulo, ano III, n.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*. **Revista do Núcleo de Apoio á Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira**, São Paulo, v.4, n.4, p.6-9, 2001.

COX, G.E.; WILSON, J.D.; BROWN, P.P. Protothecosis: a case of disseminated alga infection. **Lancet**, [S.I.], v.2, p.379-387, 1974.

DAVIES, R.R.; SPENCER, H.; WAKELIN, P.V. A case of human protothecosis. **Transactions Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.58, p.448-451, 1964.

DION, W.M. Bovine mastitis due to *Prototheca zopfii*. **Canadian Veterinary Journal**, Ontario, v.20, p.221-222, 1979.

DION, W.M. Bovine mastitis due to *Prototheca zopfii* II. **Canadian Veterinary Journal**, Ontario, v.23, p.272-275, 1982.

ENDERS, F.; WEBER, A. The occurrence of *Prototheca* in fecal samples of cattle. **Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift**, Berlin, v.105, n.5, p.165-169, 1993.

FRANK, N.; FERGUSON, L.C.; CROSS, R.F.; REDMAN, D.R. *Prototheca*, a cause of bovine mastitis. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.30, p.1785-1794, 1969.

FRESE, V.K.; GEDEK, B. Ein fall von protothecosis heim reh. **Berliner und Münchener Tieraerztliche Wochenschrift**, Berlin, v.81; p.171-178, 1968.

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. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.29, n.1, p.87-89, 1999.

GÁLAN, F.; GÁRCIA-MARTOS, P.; PALOMO, M.J.; BELTRÁN, M.; GIL, J.L.; MIRA, J. Onychoprotechosis due to *Prototheca wickerhamii*. **Mycopathologia**, Netherlands, v.137, p. 75-77, 1997.

HODGES, R.T.; HOLLAND, J.T.S.; NEILSON, F.J.A.; WALLACE, N.M. *Prototheca zopfii* mastitis in a herd of dairy cow. **New Zealand Veterinary Journal**, Palmerton North, v.33, p.108-111, 1985.

IACOVIELLO, V.R.; DeGIROLAMI, P.C.; LUCARINI, J.; SUTKER, K.; WILLIAMS, M.E.; WANKE, C.A. Protothecosis complicating prolonged endotracheal intubation: case report and literature review. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, n.15, p.959-967, 1992.

IMES, G.D.; LLOYD, J.C.; BRIGHTMAN, M.P. Disseminated protothecosis in a dog. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.44, p.1-6, 1977.

JÁNOSI, RÁTZ, F.; SZIGETI, G.; KULOSÁR, M.; KERÉNYI, J.; LAUKÓ, T.; KATONA, F. Review of the microbiological, pathological, and clinical aspects of bovine mastitis caused by the alga *Prototheca zopfii*. **The Veterinary Quarterly**, [S.I.], v.23, n.2., p.58-61, 2001a.

JÁNOSI, S.; SZIGETI, G.; RÁTZ, F.; LAUKÓ, T.; KERÉNYI, TENK, M.; KATONA, F.; HUSZENICZA, A.; KULCSÁR, M., HUSZENICZA, G. *Prototheca zopfii* mastitis in dairy herds under continental climatic conditions. **The Veterinary Quarterly**, [S.I.], v.23, n.2., p.80-83, 2001b.

JENSEN, H.E.; AALBEK, B.; BLOCH, B.; HUDA, A. Bovine mammary protothecosis due to *Prototheca zopfii*. **Medical Mycology**, Abingdon, v.36, p.89-95, 1998.

KAMINSKI, Z.K.; KAPILA, R.; SHARER, L.R.; KLOSER, P. Meningitis due to *Prototheca wickerhamii* in a patient with AIDS. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v.15; p.704-706, 1992.

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

KIM, S.T.; SUH, K.S., SHAE, Y.S.; KIM, Y.J. Successful treatment with fluconazole of protothecosis developing at the site of an intralesional corticosteroid injection. **British Journal of Dermatology**, [S.I.], v.135, p.803-806, 1996.

KIRK, J.H. Diagnosis and treatment of difficult mastitis cases. **Agri-Practice**, [S.I.], v.12, n.2, p.15-18, 1991.

KLINTWORTH, G.K.; FETTER, B.F.; NIELSEN, JR. Protothecosis, an algal infection; report of a case in man. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v.1, p.211-216, 1968.

KOEHLER, A.P.; CHU, K.; HOANG, E.T.S.; CHENG, A.F.B. Simple, reliable, and cost-effective yeast identification scheme for the clinical laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 2, p. 422-426, 1999.

KRÜGER, W. Beiträge zur kenntniss der organismen des saftflusses (sog. Schlemflusses) derlaubebäume. Zopf's beiträge. **Physiologie und Mycologie**, [S.I.], v.4, p.69-116, 1894.

KWON-CHUNG; K.J.; BENNETT, L.E. **Medical Mycology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992.

LAGNEAU, P.E. First isolation of *Prototheca zopfii* in bovine mastitis in Belgium. **Journale de Mycologie Médicale**, Paris, v.6, p.145-148, 1996.

LANGONI, H.; DOMINGUES, P.F.; FUNARI, S.R.; DIAS, H.L.T.; MORA, R.A.; ROCHA, N.S.; SFORCIN, A. *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. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.47, n5, p.727-732, 1995.

LEIMANN, B.C.Q.; MONTEIRO, P.C.F.; LAZÉRA, M.; CANDANOZA, E.R.U.; WANKE, B. Protothecosis. **Medical Mycology**, Abingdon, v.42, n.2, p.95-106, 2004.

LERCHE, M. Einen durch algen (*Prototheca*) hervorgerufene mastites der kuch. **Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift**, Berlin, v.65, p.64-69, 1952.

MACARTNEY, L.; RYCROFT, A.n.; HAMMIL, J. Cutaneous protothecosis in the dog: first confirmed case in Britain. **The Veterinary Record**, Washington, v.123, p.494-496, 1988.

McDONALD, J.S.; RICHARD, J.L.; CHEVILLE, N.F. Natural and experimental bovine intramammary infection with *Prototheca zopfii*. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, 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. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.45, n.6, p.1.060-1.079, 1984b.

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

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

MIGAKI, G.; GARDNER, F.M.; IMES, G.D. Bovine protothecosis. A report of three cases. **Pathology Veterinary**, [S.I.], v.6, p.444-453, 1969.

MOHABEER, A.J.; KAPLAN, P.J.; SOUTHERN JR., P.M.; GANDER, R.M. Algaemia due to *Prototheca wickerhamii* in a patient with myasthenia gravis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.35, n.2, p.3305-3307, 1997.

MONOPOLI, A. ACCETTURI, M.P; LOMBARDO, G. Cutaneous protothecosis, **International Journal of Dermatology**, [S.I.], v.34, n.11, p.766-767, 1995.

NOSANCHUK, J.S.; GREENBERG, R.D. Protothecosis of oleacranon bursa caused by achloric algae. **American Journal of Clinical Pathology**, [S.I.], v.59, p.567-573, 1973.

PADHYE, A.A.; BAKER, J.G.; D'AMATO, R.F. Rapid identification of *Prototheca* species by API 20C system. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.10, n.4, p.579-582, 1979.

PARDO, R.B.; CHAVES NETO, R.C.; FERNANDES, G.D., DUARTE, D.D.S.; FERNANDES, A.A.; YOKOSAWA, S.Y.; MENCK, R.G.; GODOY, C.A; FARINAZZO, A. M. Levantamento dos agentes etiológicos da mastite bovina na região de Arapongas, PR. – Resultados preliminares. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES, 3., 1999, Botucatu, **Anais...**, Botucatu, 1999, p.159.

PIER, A.C.; CABAÑES, F.J.; CHERMETTE, R.; FERREIRO, L. ; GUILLOT, J.; JENSEN, H.E. ; SANTURIO, J.M. Prominent animal mycoses from various regions of the world. **Medical Mycology**, Abingdon, v.38, supl.1, p.47-58, 2000.

- PORE, R.S. Selective medium for the isolation of *Prototheca*. **Applied Microbiology**, [S.I.], v.26, n.4, p.648-649, 1973.
- PORE, R.S.; BARNETT, E.A.; BARNES JR, W.C.; WALKER, J.D. *Prototheca* ecology. **Mycopathologia**, Netherlands, v.90, p.129-139, 1983.
- PORE, R.S. *Prototheca* taxonomy. **Mycopathologia**, Netherlands, 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. **Veterinary Microbiology**, Netherlands, v.15, p.315-323, 1987.
- PORE, R.S.; SHAHAN, T.A. *Prototheca zopfii*: natural, transient, occurrence in pigs and rats. **Mycopathologia**, Netherlands, v.101, p.85-88, 1988.
- POVEY, R.C.; AUSTWICK, P.K.C.; PEARSON, H.; SMITH, D.C. A case of protothecosis in a dog. **Pathology Veterinary**, [S.I.], v.6, p.396-402, 1969.
- ROGERS, R.J. Protothecal lymphadenitis in an ox. **Australian Veterinary Journal**, [S.I.], v.30, p.281-282, 1974.
- SCHALM, O.W.; NOORLANDER, D.O. Experimental observation leading to development of California Mastitis Test. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.139, p.199-204, 1957.
- SEGAL, E.; PADHYE, A.A.; AJELLO, L. Susceptibility of *Prototheca* species to antifungal agents. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, [S.I.], v.10, p.75-79, 1976.
- SPALTON, D.E. Bovine mastitis caused by *Prototheca zopfii*: a cause study. **The Veterinary Record**, Washington, v.116, p.347-349, 1985.
- STERN, E.S.; BARNES, F.D.; OLMSTED, S. WHITE, M. Isolation of mastitis pathogens from quarters of cows recently treated with antimicrobial agents. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.184, n.2, p.161-163, 1984.1984
- SUDMAN, M.S.; MAJKA, J.A.; KAPLAN, W. Primary Mucocutaneous protothecosis in a dog. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.163, n.12, p. 1372-1374, 1973.

SUDMAN, M.S. Protothecosis: a critic review. **American Journal of Clinical Pathology**, [S.I.], 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. **Veterinary Pathology**, [S.I.], v.31, p.123-125, 1994.

TANG, W.Y.M.; LO, K.K.; LAM, W.Y.; FUNG, K.S.C.; KOEHLER, A.; CHENG, A.F.B. Cutaneous protothecosis: report of a case in Hong Kong. **British Journal of Dermatology**, [S.I.], v.133, p.479-482, 1995.

TENHAGEN, B.A.; KALBE, P.; KLÜNDER, G.; HEUWIESER, W.; BAUNGÄRTNER, B. Individual risk factors for *Prototheca* mastitis in cattle. **Deutsch Tierärztliche Wochenschrift**, Berlin, v.106, n9, p.376-380, 1999.

TYLER, F.; LORENZ, M.D.; BLUE, J.L.; MUNNELL, J.F.; CHANDLER, F.W. Disseminated protothecosis with central nervous system involvement in a dog. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.176, p987-992, 1980.

TYRING, S.K.; LEE, P.C.; WASCH, P.; GARNER, J.F.; LITTLE, W.P. Papular protothecosis of the chest. **Archives of Dermatology**, [S.I.], v.125, p.1249-1252, 1989.

VAN KRUININGEN, H.J.; GARNER, F.M.; SCHIEFER, B. Protothecosis in a dog. **Pathology Veterinary**, [S.I.], v.6, p. 348-354, 1969.

VAN KRUININGEN, H.J. Protothecal enterocolitis in a dog. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.157, n.1, p.56-63, 1970.

VARGAS, A.C.de; 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**, Netherlands, v.142, p.135-137, 1998.

WALSH, M.B.; RICHARD, A.; JOHNSON, M.D.; STEVEN, R.; TAHAN, M.D. **American Journal of Dermatopathology**, [S.I.], v.20, n.4, p.179-382, 1998.

WEBER, A.; ENDERS, F. The occurrence of *Prototheca* in fecal samples of domestic and wild swine. **Berliner und Munchener Tierärztliche Wochenschrift**, Berlin, v.106, n.8, p.261-263, 1993.

YAMAMURA, A.A.M.; METTIFOGO, E.; SHIMADA, M.K. Utilização de ordenhas sucessivas como procedimento para eliminação de infecção por *Prototheca* spp de casos de mastite clínica bovina. (Relato de caso) **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.21, n.1, p.89-91, 2000.

YAMAMURA, A.A.M.; SHIMADA, M.K.; MÜLLER, E.E.; FREITAS, J.C.; GIORDANO-PRETO, L.G.; PEREIRA, E.C. Ocorrência da mastite bovina por algas do gênero *Prototheca*, na região de Londrina, estado do Paraná. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, 3., 2001, Águas de Lindóia, **Anais...**, Águas de Lindóia, 2001, p.123.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- Obter o isolamento de *Prototheca* spp. de tanques de expansão e latões de propriedades leiteiras.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar *Prototheca* spp. de tanques de expansão e latões de propriedades leiteiras para confirmação posterior da ocorrência de mastite nos rebanhos bovinos.

- Avaliar a ocorrência de mastite bovina *Prototheca* spp e no ambiente das vacas leiteiras.

ARTIGO 1

ISOLAMENTO DE *Prototheca* spp DE AMOSTRAS DE LEITE COLHIDAS EM TANQUES DE EXPANSÃO

Aline Artioli Machado Yamamura*¹, Mariana Cosenza¹, Ernest Eckhardt Müller¹

*¹Autor para correspondência: Aline Artioli Machado Yamamura, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, PR, Caixa Postal 6001, CEP 86051-990, E-mail: alineartioli@uel.br

¹Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, PR.

RESUMO

As infecções da glândula mamária de vacas leiteiras acarretam sérios prejuízos ao produtor pela diminuição da produção, tratamento e descarte de animais com infecções crônicas. Elevada incidência de mastite no rebanho também altera a composição e qualidade do leite. Agentes de mastite também podem causar infecções ou intoxicações no homem. Nos últimos anos tem-se dado ênfase às infecções intramamárias por algas do gênero *Prototheca*, agentes de infecções persistentes e refratárias à terapêutica tradicional além do caráter zoonótico. Este trabalho teve como objetivo o isolamento e identificação de *Prototheca* spp. de amostras de leite coletadas em tanques de resfriamento e latões, de vacas com mastite e do ambiente dos animais. Foram coletadas amostras de leite de tanques e latões, em seis linhas de coleta a granel de leite, totalizando 81 propriedades. Nas propriedades com isolamento do agente nas amostras compostas de leite foram coletadas amostras de leite das vacas com suspeita de mastite clínica ou subclínica, do meio ambiente e do equipamento de ordenha. Para o isolamento das espécies de *Prototheca* foi utilizado o Meio de Enriquecimento para *Prototheca* (MEP) e o agar Sabouraud. A identificação das espécies baseou-se nas características culturais, morfológicas e bioquímicas. Para o isolamento dos demais agentes de mastite foi utilizado o agar-sangue e MacConkey. *Prototheca zopfii* foi identificada em amostras compostas de 10/81 propriedades. Dessas propriedades foram estudadas oito quanto à ocorrência de *Prototheca* spp. no ambiente do rebanho e em casos de mastite, além da identificação dos principais agentes bacterianos causadores de mastite. Foram isoladas bactérias, algas e leveduras em 322 amostras de leite provenientes de 197 vacas. Em três propriedades foi isolada *P. zopfii* de amostras de leite de vacas com mastite clínica e subclínica. Nas três propriedades o agente foi isolado do meio ambiente das vacas, fezes de bezerros e teteiras. Os resultados deste trabalho mostram a importância do diagnóstico de rotina para *Prototheca* spp em amostras compostas de leite.

Palavras-chave: mastite bovina, *Prototheca zopfii*, *Prototheca* spp, tanques de expansão

Isolation of *Prototheca* spp from milk samples collected in bulk tanks

ABSTRACT

The dairy cattle mammary gland infections cause serious economic losses to dairy farmers due to the decrease in milk production, therapeutic procedures and culling of chronic infected animals. High incidence of mastitis in herds also alters both the composition and the quality of the milk. Mastitis pathogens can also cause infections and poisoning in humans. In the last years, emphasis has been given to intramammary infections caused by the genus *Prototheca* which, besides their zoonotic characteristics, are considered mastitis pathogens of persistent infection and are refractory to traditional therapeutic procedures. The objective of this work was the isolation and identification of *Prototheca* spp. from milk samples collected from bulk tanks and milk cans, cows presenting mastitis and the dairy herd environment. Milk samples were collected from bulk tanks and milk cans, totaling 81 dairy herds. The agent was isolated from composite milk samples obtained from cows suspected of clinical or sub clinical mastitis, the dairy herd equipment and the environment. *Prototheca* spp. was cultured in Sabouraud dextrose agar and *Prototheca Enrichment Medium* (PEM). The identification of *Prototheca* species was based on cultural, morphologic and biochemical characteristics. The other mastitis agents were isolated in blood agar and MacConkey agar. *Prototheca zopfii* was identified in composite milk samples in 10 out of 81 dairy herds. From these, eight dairy herds were studied regarding *Prototheca* spp. mastitis and environmental occurrence as well as the main mastitis bacterial agents. Bacteria, algae and yeasts were isolated from 322 milk samples from 197 cows. *P. zopfii* was isolated in three dairy herds from milk samples from cows with clinical and sub clinical mastitis. In the three dairy herds with positive isolation of *P. zopfii* the agent was isolated from the herd environment, excrements of the calves and rubber teat cups. The results of this work demonstrate the importance of appropriate routine diagnosis for *Prototheca* spp. in composite milk samples.

Key words: bovine mastitis, *Prototheca zopfii*, *Prototheca* spp, bulk tanks

1. INTRODUÇÃO

Conforme a Instrução Normativa nº51 de 18/09/2002 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2002) que regulamenta a produção, transporte e processamento do leite, em vigor desde 1/7/2005, e a perspectiva do incremento na exportação de produtos lácteos, é exigida por parte do produtor e da indústria brasileira a adoção imediata de medidas que visam à melhoria da qualidade do leite e derivados. As infecções da glândula mamária de vacas leiteiras representam severas perdas para o produtor e à indústria do leite e derivados. Dentre os diferentes fatores que interferem na qualidade do leite e derivados destacam-se as infecções intramamárias. As mastites acarretam prejuízos decorrentes, principalmente, do descarte de animais com infecções crônicas, pela queda na secreção de leite e pelas alterações na composição do leite (NONNECKE; HARP, 1989).

Os agentes causadores da mastite são bactérias, fungos, algas e vírus, sendo as bactérias os agentes isolados com maior frequência (COSTA, 1991). Com base na fonte de infecção e via de transmissão os agentes etiológicos da mastite podem ser subdivididos em contagiosos e ambientais (NICKERSON, 1998). Os agentes contagiosos de maior importância são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis* e *Mycoplasma* spp.. Os principais agentes ambientais são enterobactérias, estreptococos, actinomicetos, fungos e algas.

Nos últimos anos foram relatadas com frequência mastites de origem ambiental causadas por algas aclorofiladas do gênero *Prototheca*, principalmente a espécie *P. zopfii* (COSTA et al., 1996a; COSTA et al., 1997; COSTA et al., 1998; MELVILLE, 1995). A mastite por *Prototheca* spp. pode ocorrer de forma esporádica ou na forma de surto no rebanho. A doença geralmente é de apresentação crônica e as vacas não respondem à terapia antimicrobiana tradicional. A secagem dos quartos mamários infectados ou o descarte das vacas acometidas é a medida adotada rotineiramente pelos produtores.

A *Prototheca* spp. é ubiqüitária podendo ser encontrada no solo, na água, em fezes de diferentes espécies animais e equipamento de ordenha (MELVILLE, 1995). No homem a prototecose pode se manifestar sob várias formas, localizadas ou sistêmicas, sendo considerada uma zoonose (IACOVIELLO et al., 1992). Costa et al. (1998) relataram um caso de enterite no homem após ingestão de queijo fresco contaminado com *P. zopfii*.

Considerando o caráter zoonótico e a importante participação da *P. zopfii* na etiologia das mastites bovinas este trabalho teve por objetivo o isolamento de *Prototheca* spp. em amostras de leite obtidas de tanques de expansão e latões.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Nesta pesquisa foram estudadas amostras de leite obtidas em seis linhas de coleta de leite abrangendo oito municípios da região norte do Paraná. As propriedades leiteiras eram de médio e pequeno porte, alguns plantéis compostos por vacas da raça Holstein e a grande maioria por vacas mestiças. Nas propriedades pesquisadas eram praticadas a ordenha mecânica ou manual e diferentes métodos de manejo e higiene da ordenha. As amostras de leite foram obtidas em 81 propriedades, diretamente dos tanques de expansão ou latões, por ocasião da coleta pelos caminhões com tanque isotérmico. Após homogeneização do leite no tanque ou latão foram colhidos aproximadamente 25mL de leite em frascos de vidro esterilizados e colocados em caixa isotérmica com gelo reciclável. Das 10 propriedades com isolamento de *Prototheca* spp. nos tanques ou latões, oito foram visitadas novamente com a finalidade de isolar o agente em amostras de leite obtidas das vacas individualmente. Em duas leiterias os proprietários não permitiram a colheita de amostras individuais. As amostras foram colhidas das vacas com mastite clínica ou teste de Tamis positivo e em vacas reagentes no CMT - *Califórnia Mastitis Test* (SCHALM; NOORLANDER, 1957). A colheita foi realizada assepticamente em tubos de vidro, com tampa de rosca, esterilizados e transportados em caixa isotérmica com gelo reciclável. Amostras de fezes de bezerros e vacas e de insufladores foram colhidas com *swabs* e as amostras de solo e água em frascos estéreis.

No laboratório as amostras de leite colhidas de tanques ou latões foram semeadas em meio de enriquecimento para *Prototheca* spp. – MEP, contendo 5-fluorocitosina, indicado por Pore et al. (1987). Para o enriquecimento foi adicionado 1mL de MEP para cada 5mL de leite e os frascos incubados a uma temperatura de 32°C por aproximadamente 96 horas em estufa-incubadora com plataforma de agitação. Do meio de enriquecimento e das amostras de leite obtidas de vacas individualmente amostra de solo, água, fezes e teteiras foram semeadas por esgotamento em agar Sabouraud dextrose contendo 100mg/mL de cloranfenicol e 0,1g/L de hidrócloro de tiamina. As placas foram incubadas por 48 horas a 35°C. Para a caracterização de gênero e espécie as colônias foram identificadas conforme morfologia macro e microscópica, pela coloração com lactofenol-azul-algodão e rosa-de-bengala, e pela assimilação de carboidratos (sacarose, glicose e trealose) e de n-propanol em meio YNB - *Yeast Nitrogen Base* (CAMARGO; FISCHMAN, 1979; PORE et al., 1983; PORE, 1985).

Para o isolamento e identificação das principais bactérias causadoras de mastite, as amostras de leite foram semeadas e incubadas em agar-sangue ovino 5% e agar McConkey, em aerofilia por

até 120 horas e 48 horas, respectivamente e identificadas pelas características culturais, morfológicas, tintoriais e bioquímicas (KRIEG; HOLT, 1984; HARMON et al., 1990).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 81 propriedades estudadas, foi isolada *Prototheca* spp. em 10 (12,3%) amostras compostas de leite em sete propriedades com tanque de expansão e em três propriedades que utilizavam latões. Nas oito propriedades estudadas mais detalhadamente, duas eram pequenas propriedades de subsistência, três propriedades com manejo a pasto, duas com sistema semi-intensivo e uma com sistema *tie stall*. Quatro propriedades produziam leite tipo B e quatro do tipo C (Tabela 1). Todas as propriedades apresentavam problemas no manejo, na higiene de ordenha e na manutenção do equipamento de ordenha. Duas propriedades realizavam ordenha manual em estábulo sem água corrente e com bezerro ao pé da vaca.

As amostras de *Prototheca* spp. foram caracterizadas como *P. zopfii* e apresentaram as seguintes características morfológicas, culturais e bioquímicas: colônias em agar Sabouraud brancas, sulcadas, rugosas, de aspecto vítreo, ao exame microscópico os esporângios esféricos mediam 14-25µm ou ovais, com 11-20 x 14-23µm de diâmetro, clivagem da massa núcleo-citoplasmática com 2 a 20 endosporos, as células *dauer* coraram-se seletivamente pelo rosa-de-bengala, todas as cepas utilizaram glicose e n-propanol como fonte de carbono não cresceram em presença de trealose e sacarose.

Existem poucas pesquisas sobre isolamento de *Prototheca* spp. em amostras de leite de tanques de expansão ou imersão. MELVILLE (1995), no Brasil analisou tanques de expansão de 10 propriedades leiteiras por meio de plaqueamento direto das amostras e encontrou *P. zopfii* em quatro.

Um trabalho bastante abrangente foi realizado por Pore et al. (1987) nos EUA que pesquisaram 787 amostras de leite compostas de vacas e de carros-tanque, sendo 430 amostras colhidas em duplicata em dias diferentes e 357 amostras simples. Os autores desenvolveram e testaram um meio de enriquecimento que permitiu a obtenção de isolamento mais satisfatório de *Prototheca* spp. devido à possibilidade de ocorrência em número reduzido deste microrganismo em leite composto e de caminhões-tanque. Vinte e oito amostras de leite (28/787) individuais das propriedades leiteiras, colhidas em caminhões-tanque, continham *Prototheca* spp. (22 *P. zopfii*, seis *P. moriformis*). Nas 430 amostras colhidas em duplicata e nas 357 amostras simples, foi isolada *Prototheca* spp. em 19 e 10, respectivamente. Das 19 amostras positivas nas 215 propriedades testadas duas vezes em dias diferentes apenas quatro foram positivas nas duas amostragens. Os

autores concluíram que o leite de vacas com mastite por *P. zopfii* pode ser considerado fonte de contaminação para amostras compostas de leite e o isolamento nessas amostras não é uniforme.

Tabela 1. Relação do número de vacas positivas ao exame microbiológico e número de amostras analisadas em associação ao sistema de manejo de oito propriedades leiteiras da região norte do estado do Paraná com isolamento positivo de *P. zopfii* em amostras de leite de tanques de expansão.

Propriedade	Tipo de leite / sistema de manejo	Nº de vacas positivas ao exame microbiológico/ nº. de vacas examinadas		Nº de amostras positivas ao exame microbiológico/nº de amostras analisadas		Isolamento de <i>Prototheca</i> spp (nº de vacas acometidas/ nº de tetos acometidos)
		N	%	N	%	
1	B /tie stall	23/ 30	76,66	35/53	66,04	Positivo (1/ 2)
2	C / pasto	17/ 17	100	37/49	75,51	Negativo
3	C / pasto	52/ 57	91,22	93/116	80,17	Negativo
4	C/ subsistência	8/ 10	80,00	13/21	61,90	Negativo
5	C/ subsistência	9/ 19	47,36	13/29	44,83	Negativo
6	B/ semi-intensivo	33/ 52	63,46	45/114	39,47	Positivo (1/ 2)
7	B/ semi-intensivo	16/ 17	94,11	17/26	65,38	Negativo
8	B/ semi-intensivo	39/ 61	63,93	71/148	47,97	Positivo (3/ 7)
Total		197/262		324/556		5/11

Nas oito propriedades com isolamento de *P. zopfii* das amostras compostas de leite foram colhidas amostras de leite das vacas com mastite clínica e subclínica. Do total de 419 vacas em lactação, 263 apresentaram suspeita de mastite tendo sido colhidas 567 amostras de leite. Em 328 dessas amostras, obtidas de 197 vacas foram isoladas bactérias, algas e leveduras (Tabela 2). Em duas propriedades foi isolada *P. zopfii* do leite de vacas com mastite subclínica, e em uma de animais apresentando a forma subclínica e clínica. Os primeiros relatos de mastite por *Prototheca* spp., frequentemente estavam associados a casos clínicos, porém nos últimos anos os trabalhos têm mostrado uma ocorrência cada vez mais elevada de casos subclínicos (FRANK et al., 1969; COSTA et al., 1995; COSTA et al., 1996b). As duas formas de apresentação da doença causam redução significativa na secreção de leite (CORBELLINI et al., 2001). A infecção pode persistir no período seco ou ocorrerem novas infecções que não permitem a regeneração adequada da glândula mamária comprometendo a próxima lactação com redução na produção de leite do animal.

Tabela 2. Microrganismos causadores de 197 casos de mastite ambiental e contagiosa nas 8 propriedades leiteiras estudadas após a análise de tanques de expansão e latões.

Microrganismos	Quartos afetados	
	N	%
<i>Corynebacterium bovis</i>	106	32,72
<i>Staphylococcus</i> coagulase (+)	93	28,70
<i>Streptococcus</i> spp.	39	12,03
<i>Staphylococcus</i> coagulase (-)	32	9,88
<i>Staphylococcus</i> coagulase (-) + <i>Corynebacterium bovis</i>	13	4,01
<i>Candida</i> spp.	11	3,39
<i>Prototheca zopfii</i>	8	2,47
<i>Staphylococcus</i> coagulase (-) + <i>Streptococcus</i> spp	6	1,85
<i>Streptococcus</i> spp (-) + <i>Corynebacterium bovis</i>	5	1,54
<i>Staphylococcus</i> spp.+ <i>Streptococcus</i> spp. + <i>Corynebacterium bovis</i>	2	0,62
<i>Prototheca zopfii</i> + <i>Cândida</i> spp.	2	0,62
<i>Streptococcus</i> spp.+ <i>Corynebacterium bovis</i> + <i>Candida</i> spp.	1	0,31
<i>Staphylococcus</i> coagulase (+) + <i>Candida</i> spp.	1	0,31
<i>Staphylococcus</i> coagulase (-) + <i>Candida</i> spp.	1	0,31
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	0,31
<i>Staphylococcus</i> coagulase (-) + <i>Staphylococcus</i> coagulase (+)	1	0,31
<i>Staphylococcus</i> spp.+ <i>Corynebacterium bovis</i> + <i>Candida</i> spp.	1	0,31
<i>Prototheca zopfii</i> + <i>Staphylococcus</i> coagulase (-)	1	0,31
Total de quartos examinados	324	100,00

Em duas propriedades, compostas por rebanhos de 80 e 100 animais, a *P. zopfii* foi encontrada apenas em uma vaca. Na terceira leiteria *P. zopfii* foi isolada em três vacas de um total de 80 em lactação. A literatura registra casos esporádicos de mastite por *Prototheca* spp. com certa freqüência em vários países, inclusive Brasil (DION, 1979; BRITO et al, 1994; LAGNEAU, 1996). Melville (1995) pesquisando amostra de tanque e de vacas individualmente também encontrou uma baixa porcentagem de vacas acometidas por *P. zopfii* nos rebanhos estudados. Relatos de surtos com elevado número de animais acometidos por *Prototheca* spp. também ocorrem com certa freqüência. Hodges et al. (1985) descreveram um surto na Nova Zelândia com 17 vacas infectadas, de um total de 120. Costa et al., (1996b) observaram em uma propriedade índices de mastite por *Prototheca* spp de 14,95% nas vacas em lactação e 8,06% nas vacas secas.

Neste estudo, nas propriedades que apresentaram vacas com mastite por *P. zopfii*, o agente foi isolado em locais de alta umidade e ricos em matéria orgânica como solo de piquetes, solo próximo à sala de ordenha, da água de abastecimento, esgoto, fezes e das teteiras entre a ordenha de uma vaca e outra. Em todas as amostras foi isolada *P. zopfii*. Vários trabalhos relatam o isolamento de *Prototheca* spp. do meio ambiente das vacas leiteiras, úmido e rico em matéria orgânica, sendo os locais mais citados: piquetes, água e cama dos animais (HODGES et al., 1985; ANDERSON; WALKER, 1988; COSTA et al., 1997). Em uma propriedade foi isolada *P. zopfii*

das fezes de bezerros considerados possíveis fontes de infecção para as vacas e o ambiente das mesmas. Anderson e Walker (1988) isolaram *Prototheca* spp. em 18 (47%) das amostras de meio ambiente e em fezes dos animais em uma propriedade com 263 vacas em lactação, com isolamento de *Prototheca* spp. de uma amostra de leite do tanque de expansão e quatro vacas com mastite que não responderam à terapia convencional.

Na Tabela 2 são apresentados os resultados dos exames microbiológicos do leite das vacas com suspeita de mastite nas oito propriedades pesquisadas. Observa-se uma predominância de agentes contagiosos (*C. bovis* e estafilococos coagulase negativa). A elevada ocorrência desses agentes mostra as deficiências de manejo e higiene de ordenha e manutenção inadequada dos equipamentos de ordenha. Por outro lado, a porcentagem de agentes ambientais isolados (estreptococos spp., leveduras e *P. zopfii*) demonstra a existência de problemas relativos ao ambiente das vacas. As deficiências de manejo de ordenha e condições ambientais impróprias podem ser comprovadas pela elevada porcentagem (47%) de animais com mastite clínica ou subclínica nestes rebanhos. Estes fatos podem justificar o isolamento de *Prototheca* spp. no leite de amostras compostas e individuais já que altos índices de mastite, tratamentos intramamários prévios e condições ambientais inadequadas podem favorecer novas infecções por este agente.

Este trabalho mostra que *Prototheca* spp. pode ser isolada de amostras de leite individuais e compostas de propriedades leiteiras com ou sem histórico de mastite por esta alga. Pore et al. (1987) e BAUMGÄRTNER (1997) confirmam estes resultados. O isolamento de *P. zopfii* de amostras de leite de tanque, mesmo em propriedades sem casos aparentes de mastite por este agente indica a possibilidade de contaminação do leite e derivados e conseqüente possibilidade de infecções humanas. Melville et al (1999) avaliaram a suscetibilidade de diferentes culturas de *P. zopfii* e concluíram que muitas permaneceram viáveis após exposição a elevadas temperaturas e afirmam que leite e derivados representam fonte potencial de transmissão desta zoonose. Costa et al. (1998) relataram um caso de distúrbio gastrointestinal em um homem que ingeriu voluntariamente queijo fresco contaminado por *Prototheca* spp.. Pessoas com deficiências imunológicas ou desnutridas são mais suscetíveis à infecção (KLINTWORTH; FETTER; NIELSEN, JR., 1968; CAREY et al., 1997; MOHABEER et al., 1997).

4. CONCLUSÕES

O isolamento de *P. zopfii* de tanques de expansão e latões permitiu confirmar a existência de casos de mastite clínica e subclínica assim como a sua presença no ambiente em três propriedades leiteiras dentre oito analisadas.

A obtenção de *P. zopfii* de amostras de leite individuais e compostas de propriedades leiteiras com ou sem histórico de mastite por esta alga pode indicar uma contaminação do equipamento de ordenha e dos recipientes de armazenamento do leite, associados à manutenção inadequada do equipamento de ordenha e às deficiências de manejo e higiene.

Estes fatos demonstram que devido à importância de *P. zopfii* em saúde pública, a triagem efetuada rotineiramente em tanques de expansão e latões em propriedades leiteiras, poderia ser utilizada como medida de prevenção de rotina.

5. AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Newton Kimura, Médico Veterinário e Presidente da Cooperativa COLARI, por permitir a colheita de amostras de leite de tanques de expansão nas propriedades leiteiras atendidas pela cooperativa. Aos Senhores Ilson e Erich, funcionários da COLARI, pela colaboração na colheita do material dos tanques das propriedades das regiões de Maringá e Rolândia.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, K.L.; WALKER, R.L. Sources of *Prototheca* spp in a dairy herd environment. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.193, n.5, p.553-556, 1988.
- BAUMGÄRTNER, B. Vorkommen und Bekämpfung der Prototheken-mastitis des Rindes im Einzugsgebiet des Staatlichen Veterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamtes Potsdam. **Der praktische Tierärztl**, [S.I.], n.78, p.406-414, 1997.
- BRASIL. Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal: instrução normativa nº51, de 18-9-2002, art. 1º. Aprovar os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, em conformidade com os Anexos a esta Instrução Normativa. Brasília, D.F. Ministério da Agricultura.
- BRITO, M.A.V.P.; VEIGA, V.M.O. Mastite bovina causada por *Prototheca zopfii*. Relato de um caso. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.27, n.4, p.681-684, 1997.
- CAREY, W.P; KAYKOVA, Y; BANDRES, J.C.; SIDHU, G.S; BRÄU, N. Cutaneous protothecosis in a patient with AIDS and a severe functional neutrophil defect: successful therapy with amphotericin B. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, n.25, p.1265-1266, 1997.
- CAMARGO, Z.P.; FISCHMAN, O. Use of morpho-physiological characteristics for differentiation of the species of *Prototheca*. **Sabouraudia**, England, v.17, p.275-278, 1979.

- CORBELLINI, L.G.; ORLEMEIER, D.; CRUZ, C.; DIAS, M.M.; FERREIRO, L. Bovine mastitis due to *Prototheca zopfii*: Clinical, epidemiological and pathological aspects in a Brazilian dairy herd. **Tropical Animal Health and Production**, Netherlands, n.33, v.6, p.463-473, 2001.
- COSTA, E.O. Importância econômica da mastite infecciosa bovina. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v.1, p.21-26, 1991.
- COSTA, E.O.; BENITES, N.R.; MELVILLE, P.A.; PARDO, R.B.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T. Estudo etiológico da mastite clínica bovina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v.17, n.4, p.156-158, 1995.
- 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, Brazil. **Veterinary Research Communications**, Netherlands, v.20, p.237-241, 1996a.
- COSTA, E.O.; RIBEIRO, A.R.; MELVILLE, P.A.; PRADA, M.S. CARCIOFI, A.C.; WATANABE, E.T. Bovine mastitis due to algae of the genus *Prototheca*. **Mycopathologia**, Netherlands, v.133, p.85-88, 1996b.
- 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**, Netherlands, v.137, p.33-36, 1997.
- 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.. **Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira**, São Paulo, v.1, n.1, p.9-19, 1998.
- DION, W.M. Bovine mastitis due to *Prototheca zopfii* II. **Canadian Veterinary Journal**, Ontario, v.23, p.272-275, 1982.
- FRANK, N.; FERGUSON, L.C.; CROSS, R.F.; REDMAN, D.R. *Prototheca*, a cause of bovine mastitis. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.30, n.10, p.1785-1794, 1969.
- HARMON, R.J.; EBERHART, R.J.; JASPER, D.E.; LANGLOIS, B.E.; WISLON, R.A. **Microbiological procedures for diagnosis of bovine udder infection**. National Mastitis Council, Inc. Arlington, V.A. 1990.
- HODGES, R.T.; HOLLAND, J.T.S.; NEILSON, F.J.A.; WALLACE, N.M. *Prototheca zopfii* mastitis in a herd of dairy cows. **New Zealand Veterinary Journal**, Palmerton North, v.33, n.7, p.108-111, 1985.
- KLINTWORTH, G.K.; FETTER, B.F.; NIELSEN, H.S. Protothecosis, an algal infection: report of a case in man. **The Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v.1, p.211-215, 1968.
- KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. 1268p.

IACOVIELLO, V.R.; DeGIROLAMI, P.C.; LUCARINI, J.; SUTKER, K.; WILLIAMS, M.E.; WANKE, C.A. Protothecosis complicating prolonged endotracheal intubation: case report and literature review. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v.15, p.959-967, 1992.

LAGNEAU, P.E. First isolation of *Prototheca zopfii* in bovine mastitis in Belgium. **Journale de Mycologie Médicale**, Paris, v.6, p.145-148, 1996.

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

MOHABEER, A.J.; KAPLAN, P.J.; SOUTHERN, JR., P. GANDER, R.M. Algemia due to *Prototheca wickerhamii* in a patient with myasthenia gravis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.35, n.12, p.3305-3307, 1997.

NICKERSON, S.C. Estratégias para controlar a mastite bovina. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, 1., 1998, Curitiba. **Anais...**, Curitiba, 1998, p.20-27.

NONNECKE, B.J.; HARP, J.A. Function and regulation of lymphocyte – mediated immune responses: relevance to bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.72, p.1313-1317, 1989.

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

PORE, R.S. *Prototheca* taxonomy. **Mycopathologia**, Netherlands, v.90, p.29-139, 1985.

PORE, R.S.; SHAHAN, T.A.; PORE, M.D. Occurrence of *Prototheca zopfii*, a mastitis pathogen in milk. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.15, p.315-324, 1987.

SCHALM, O.W.; NOORLANDER, D.O. Experimental and observation leading to development of California Mastitis Test. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, n.139, p.199-204, 1957.

ARTIGO 2**FATORES PREDISPOONENTES ASSOCIADOS À MASTITE BOVINA CAUSADA
POR *Prototheca zopfii***

Aline Artioli Machado Yamamura^{*1}, Roberta Lemos Freire¹, Roberta de Toledo¹, Luciene Garcia Pretto-Giordano¹, Agda Godoy², Ernst Eckhardt Müller¹

*Autor para correspondência: A.A.M. Yamamura, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Caixa Postal 6001, CEP 86051-990, Londrina, PR. E-mail: alineartioli@uel.br

1 Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

2 Cooperativa Central Agro-industrial Ltda.: CONFEPAR, Cambe, PR

RESUMO

Os fatores predisponentes à mastite bovina por *Prototheca zopfii* foram analisados em 13 propriedades leiteiras dos Estados do Paraná e São Paulo. As propriedades foram selecionadas pelos seguintes critérios: confirmação prévia de casos de mastite por *Prototheca* spp., triagem através da pesquisa de *Prototheca* spp. em tanques de expansão e latões e propriedades com contagem de células somáticas de rebanho altas. Nessas propriedades foram examinadas 383 vacas da raça Holstein e mestiças. Foram coletadas amostras de água de bebedouro, abastecimento, servida e empoçada das instalações, solo de pastagem e piquete próximo à sala de ordenha ou estábulo, cama de confinamento, *swabs* dos insufladores, fezes de vacas, bezerros e de suínos. *Prototheca* spp. foi cultivada em agar Sabouraud e caracterizada conforme aspectos culturais e de morfologia microscópica. A espécie *P. zopfii* foi identificada com base nos testes de assimilação de carboidratos e álcoois. Das 13 propriedades estudadas foram isoladas *Prototheca* spp. em 10. Em oito o agente foi isolado em amostras de leite dos tanques de expansão, mas somente em três, foi isolada *Prototheca* spp de vacas e do ambiente. Nas três leiterias com contagem de células somáticas elevadas não foi isolada *Prototheca* spp. Do total de 383 vacas examinadas *Prototheca* spp. foi isolada em 20 (5,2%) vacas com mastite sendo 18 caracterizadas como *P. zopfii*. Em quatro propriedades *Prototheca* spp. foi isolada da água de bebedouro, abastecimento, servida e empoçada em estábulo e em sala de ordenha, de amostras de solo de piquete e pasto, teteiras, fezes de bezerros e suínos. *P. zopfii* foi identificada em amostras de solo de piquete, teteiras, fezes de bezerros e suínos. Pela análise uni-variada os fatores predisponentes associados à mastite por *P. zopfii* foram: criação a pasto, alimentação com pasto e silagem, ordenha mecânica em estábulo, permanência das vacas após a ordenha em mangueira sem alimento, criação de suínos próximos às instalações dos bovinos, presença de cães, gatos e roedores, armazenamento do leite em tanque de expansão e sanificação do equipamento com água quente, utilização de detergente alcalino e ácido, falta de higienização dos tetos com água, pré-imersão dos tetos em copinho com refluxo do anti-séptico, diagnóstico laboratorial e antibiograma, utilização de vacina contra mastite de origem bacteriana, alimentação de bezerros com leite de casos mastite clínica e a raça Holstein.

Palavras-chave: mastite bovina, fatores predisponentes, *Prototheca zopfii*, *Prototheca* spp.

Predisposing factors associated with bovine mastitis caused by *Prototheca zopfii*

ABSTRACT

Predisposing factors to bovine mastitis by *Prototheca zopfii* were analyzed in 13 dairy herds in the States of Paraná and São Paulo. The herds were selected according to the following criteria: previous confirmation of cases of mastitis by *Prototheca* spp., selection by means of research of *Prototheca* spp. in bulk tanks, milk cans and herds with high somatic cells count in the herd. In these herds, 383 cows were examined, both Holstein breed and hybrid. The samples collected consisted of: water from drinking trough, supply, sewage and puddled water in the housings, pasture and cow pen soil near the milking parlor or the stable, free stall bedding material, *swabs* of teat cup rubbers, cattle, calves and swine manure. The samples were plated on Sabouraud's agar. *Prototheca* spp. was characterized according to cultural aspects and microscopic morphology. *P. zopfii* was identified from the assimilation tests of carbohydrates and alcohols. Out of the 13 herds studied, 10 had *Prototheca* spp. isolated in eight, the agent was isolated in milk samples of the bulk tanks, but only in three herds *Prototheca* spp. was isolated from cows and the environment. In the three herds with high somatic cells count *Prototheca* spp. was not isolated. Out of the total of 383 cows examined, *Prototheca* spp. was isolated in 20 (5.2%) cows with mastitis, and 18 of them were characterized as *P. zopfii*. In four herds *Prototheca* spp. was isolated in the water of the drinking trough, supply, sewage and water puddled in the stable and milk parlor, from samples of cow pen and pasture soil, teat cup rubbers, manure from calves and swines. *P. zopfii* was identified in samples of cow pen soil, teat cup rubbers and manure of calves and swines. Through univariate analysis the predisposing factors associated with mastitis by *P. zopfii* were: pasture system, pasture and silage feed, milking in stable, permanence of cows in the lounge without food after milking, raising of swines near bovine housing, presence of dogs, cats and rodents, milk storage in bulk tanks, equipment sanitation with hot water, use of alkaline detergent and acids, lack of hygienization of the teats with water, pre-immersion of the teats in small cups with anti-septic reflux, laboratorial diagnosis and antibiogram, utilization of vaccine against mastitis from bacterial origin, calves' feeding with milk of clinical mastitis cases and the Holstein breed.

Key words: bovine mastitis, predisposing factors, *Prototheca zopfii*, *Prototheca* spp.

1. INTRODUÇÃO

Mastite é um processo inflamatório da glândula mamária que causa severas perdas na qualidade e produção do leite, e em consequência prejuízos econômicos e sociais (ALMERAYA, 1994). Além do aspecto econômico deve ser dada ênfase à saúde pública, porque muitos microrganismos causadores de mastite podem provocar doença em humanos (COSTA et al., 1998b; MELVILLE, 1999).

Além das bactérias, reconhecidas por décadas como agentes etiológicos de mastite em vacas leiteiras, vários outros gêneros e espécies de microrganismos, inclusive algas unicelulares do gênero *Prototheca*, podem causar alterações inflamatórias no úbere (CHEVILLE; McDONALDS; RICHARDS, 1984; BENITES et al., 1999). A mastite bovina causada por *Prototheca* spp. foi descrita pela primeira vez na Alemanha (LERCHE, 1952). No Brasil os primeiros casos de mastite por *Prototheca* spp. foram relatados em propriedades leiteiras do estado de São Paulo (COSTA et al., 1992; LANGONI et al., 1992). A doença é considerada emergente, tendo aumentado consideravelmente a sua ocorrência na última década (COSTA et al., 1996a).

As infecções esporádicas da glândula mamária por *Prototheca* spp. foram diagnosticadas em vários países (JÁNOSI et al., 2001a). Estudos realizados no Brasil mostram que a mastite por *Prototheca* spp. em rebanhos também pode se manifestar sob forma de surtos (COSTA et al., 1995; COSTA et al., 1996a; COSTA et al., 1996b; COSTA et al., 1998a).

A mastite por *Prototheca* spp. é considerada de caráter ambiental ocorrendo sob forma endêmica principalmente em países de clima quente e úmido (ANDERSON; WALKER, 1988).

Em países como Estados Unidos, Nova Zelândia e Filipinas, vários pesquisadores obtiveram sucesso no isolamento de algas do gênero *Prototheca* a partir de amostras de solo, fezes de suínos e bovinos, água e alimentos dos animais e equipamento de ordenha (PORE et al., 1983; HODGES et al., 1985; ANDERSON; WALKER, 1988; PORE; SHAHAN, 1988).

No Brasil, nos estados de São Paulo e Paraná, os primeiros estudos epidemiológicos indicaram a presença de *P. zopfii* e *P. wickerhamii* em água de rios, lagos, esgoto e charcos (CAMARGO; FISCHMAN, 1981). *P. zopfii* foi isolada em propriedades leiteiras, com surtos de mastite, no ambiente, amostras de fezes, teteiras, água e solo de pastagem (COSTA et al., 1997).

Tenhagen et al. (1999), na Alemanha, em uma propriedade leiteira com surto de mastite por *P. zopfii* observaram que os principais fatores de risco foram a idade dos animais associada ao número de lactações, infecções intramamárias e antibioticoterapias anteriores.

Um aspecto importante relacionado às mastites por *P. zopfii* é a inexistência de tratamento antimicrobiano eficaz sendo recomendado internacionalmente o descarte dos animais acometidos (KIRK, 1991).

No Brasil, país de clima propício às infecções intramamárias por *P. zopfii*, trabalhos voltados ao estudo dos fatores predisponentes se fazem necessários visando a recomendação de medidas preventivas e de controle mais eficazes. Este trabalho teve como objetivo pesquisar os fatores predisponentes associados à mastite bovina por *Prototheca* spp. em rebanhos leiteiros.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

Para a realização desta pesquisa foram selecionadas 13 propriedades produtoras de leite, localizadas em cinco municípios, doze localizadas no Estado do Paraná, e uma no Estado de São Paulo. As propriedades foram selecionadas pelos seguintes critérios: confirmação prévia de casos de mastite por *Prototheca* spp. (duas propriedades), triagem através da pesquisa de *Prototheca* spp. em tanques de expansão e latões (oito propriedades) e propriedades com contagem de células somáticas de rebanho altas (três). Nessas propriedades foram examinadas 383 vacas, primíparas e pluríparas, holandesas e mestiças em diferentes estágios de lactação.

Dos tanques de expansão e latões foram coletados 25 mL de leite após homogeneização. Das vacas com mastite clínica (sinais clínicos ou prova de Tamis positiva) e de vacas com mastite subclínica diagnosticada pelo CMT (*Califórnia Mastitis Test*) (SCHALM; NOORLANDER, 1957), as amostras de leite foram coletadas em tubos com tampa de rosca estéreis após assepsia dos tetos. As amostras de leite foram acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo reciclável para transporte até o laboratório.

Nas propriedades foram coletadas amostras de água de bebedouro, água de abastecimento, água servida da sala de ordenha, água empoçada da sala de ordenha ou estábulo, solo da pastagem, solo do piquete próximo à sala de ordenha ou estábulo, cama em caso de confinamento, *swabs* dos insufladores antes e após a ordenha das vacas com mastite

por *Prototheca* spp., fezes coletadas por meio de *swabs* retais de vacas (com mastite) e bezerros e amostras de fezes de instalações de suínos próximos às instalações do gado de leite.

As amostras de aproximadamente 300mL de água foram acondicionadas em frascos de 500mL e as amostras de aproximadamente 30g de solo em placas. Todo material de coleta foi previamente esterilizado. As amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo reciclável para transporte até o laboratório.

2.2 Inquérito epidemiológico

Para o estudo dos fatores predisponentes à mastite por *Prototheca* spp. foi elaborado um formulário de investigação epidemiológica (Anexo 1) As questões formuladas levaram em consideração tipos de instalações, manejo dos animais, manejo e higiene de ordenha, tratamento de vacas em lactação e secas e manejo dos bezerros. Foram consideradas ainda características do solo dos piquetes e mangueiras, criação próxima de outras espécies animais, fonte e localização da água de abastecimento e de bebedouros e destino dos dejetos.

Para a avaliação individual das vacas com mastite por *Prototheca* spp. foi elaborado formulário conforme anexo 2. Neste formulário foram considerados aspectos como: idade da vaca, conformação do úbere, histórico de mastite e tratamentos anteriores, número de lactações, estágio da lactação, identificação dos quartos infectados.

2.3 Exames Microbiológicos

2.3.1 Amostras de leite

As amostras de leite colhidas de tanques ou latões foram semeadas em meio de enriquecimento para algas do gênero *Prototheca* (MEP) indicado por Pore et al. (1987). Após esterilização em autoclave foi adicionado a 190mL de meio de cultura 500mg de 5-fluorocitosina. Para o enriquecimento foi adicionado 1mL de MEP para cada 5mL de leite e os frascos incubados a uma temperatura de 32°C por aproximadamente 96 horas em estufa-incubadora com plataforma de agitação. Do meio de enriquecimento e das amostras de leite obtidas de vacas individualmente foram semeadas por esgotamento em agar Sabouraud dextrose com 100mg/mL de cloranfenicol e 0,1g/L de hidrocloreto de tiamina (ASD). As placas foram incubadas por 48 horas a 35°C (PORE, 1985).

2.3.2 Amostras de água

Para a análise das amostras de água turva, alíquotas de 50mL das amostras foram centrifugadas a 480X g por 10 minutos e volumes de 20µL do sedimento ou água do fundo dos tubos foram semeadas em duplicata no ASD e incubadas a 35°C e temperatura ambiente por até 96 horas (PORE et al., 1983).

As amostras de água límpida foram filtradas em filtros Millipore de 0,45µm. Para a semeadura os filtros foram pressionados sobre o ASD em duplicata e o resíduo semeado por esgotamento com alça de platina. As placas foram incubadas a 35°C e em temperatura ambiente por até 96 horas (PORE et al., 1983).

2.3.3 Amostras de solo

As amostras de solo foram diluídas e salina estéril, semeadas em ASD e incubadas por 48 horas a 35°C (PORE et al., 1983; COSTA et al., 1997).

2.3.4 Amostras de fezes e equipamento de ordenha

As amostras de fezes e os *swabs* de fezes e de insufladores foram semeadas em ASD e incubadas por até 96 horas a 35°C (PORE et al., 1983; COSTA et al., 1997).

2.4 Identificação bacteriana

Para o isolamento e identificação das principais bactérias causadoras de mastite, as amostras de leite foram semeadas e incubadas em ágar-sangue ovino 5% e ágar MacConkey, em aerofilia por até 120 horas e 48 horas, respectivamente e identificadas pelas características culturais, morfológicas, tintoriais e bioquímicas (KRIEG; HOLT, 1984; HARMON et al., 1990).

2.5 Identificação de *Prototheca* spp.

Para a caracterização do gênero as colônias foram identificadas pela morfologia das colônias no ASD e microscopicamente pela coloração com lactofenol-azul-algodão. Foi observado a forma e tamanho dos esporângios e presença de endósporos. As espécies por assimilação de carboidratos (sacarose, glicose e trealose) e de n-propanol em meio YNB -

Yeast Nitrogen Base (CAMARGO; FISCHMAN, 1979; PORE et al., 1983; PORE, 1985).

2.6 Análise estatística

Para o estudo dos fatores predisponentes foi utilizada análise uni-variada pelo teste de Qui-quadrado. Os cálculos foram executados no programa Epi Info 6,0 (DEAN et al., 1994).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As algas do gênero *Prototheca* isoladas neste trabalho apresentaram em ASD colônias com forma plana, coloração esbranquiçada e superfície irregular e na microscopia células grandes (10-30 μm), parede espessa, forma oval ou arredondada contendo endósporos. *P. zopfii* foi caracterizada pela positividade na assimilação de glicose e n-propanol.

Das 13 propriedades estudadas foram isoladas *Prototheca* spp. em 10. Dessas, em oito, o agente foi isolado em amostras de leite dos tanques de expansão, mas somente em três, foi isolada *Prototheca* spp. de vacas e do ambiente. Nas duas propriedades com diagnóstico prévio de mastite por *Prototheca* spp. a mesma foi isolada nas vacas em uma e nas vacas e ambiente, em outra. Nas três leiterias com contagem de células somáticas elevadas não foi isolada *Prototheca* spp..

Do total de 383 vacas examinadas *Prototheca* spp. foi isolada em 20 (5,2%) vacas com mastite sendo 18 caracterizadas como *P. zopfii*. Sete vacas com 13 quartos mamários afetados apresentaram mastite subclínica e, 13 vacas com 15 quartos, mastite clínica. Em nove quartos *Prototheca* spp. estava associada a *Staphylococcus* spp., *C. bovis* e *Candida* spp.

Aabaek et al. (1994) na Dinamarca, ao analisarem 40 rebanhos leiteiros observaram uma prevalência de 11,1% e 42 vacas com mastite por *P. zopfii*. Em estudo realizado na Hungria por János et al. (2001b) em um período de dois anos foram identificadas 223 vacas com mastite por *Prototheca* spp. em 32 propriedades e a prevalência de animais foi de 1,6%.

Costa et al. (1995) ao estudarem 28 propriedades leiteiras nos estados de São Paulo e Minas Gerais, constataram um índice de 6,33% de mastite bovina por algas do gênero *Prototheca*. Em um surto de mastite bovina Costa et al. (1996a) verificaram um índice de 8,06% em vacas com mastite clínica por *Prototheca* spp.. Em estudo subsequente, Costa et al. (1996b) observaram índices de 14,95% em vacas com mastite subclínica e de 8,06% em vacas secas.

Na região norte do estado do Paraná a ocorrência de mastite bovina por algas do gênero *Prototheca* relatada por diferentes autores foi de 0,48% (FILLIPSEN et al., 1999), 14,11% (YAMAMURA et al., 2000) e 15,38% (PARDO et al., 1999).

Das vacas com mastite causada por *Prototheca* spp. 17 foram analisadas individualmente considerando as características individuais de manejo: idade, número de lactações, estágio da lactação, tratamento de mastite bacteriana, conformação do úbere, posição e tipo de tetos, identificação dos quartos afetados e ocorrência de mastites anteriores (Tabela 1).

A maioria das vacas (onze) com infecção intramamária por *Prototheca* spp. apresentou o menor número de lactações (uma a três). A faixa etária das vacas variou entre: dois e quatro anos (seis) e entre quatro e seis anos (cinco), apresentando equilíbrio no número de animais afetados por mastite.

O estágio da lactação correspondente aos três primeiros meses apresentou uma quantidade menor de vacas (quatro) com mastite por *Prototheca* spp., quando comparado àqueles a partir do quarto mês: 4-6 meses (sete vacas), maior que 6 meses (seis vacas).

A colocação da base dos tetos junto ao ligamento Central teve um número maior de vacas (oito) acometidas em relação à colocação dos tetos na periferia (cinco) e colocação dos tetos no centro dos quartos (seis). O esfíncter do teto apresentou-se normal em 15 vacas, enquanto tetos com protusão foram observados em duas.

As demais características individuais relacionadas à conformação do úbere quanto ao ligamento Central, comprimento dos tetos, quartos afetados, comprimento dos tetos apresentaram número aproximado de vacas acometidas.

Tabela 1. Características individuais observadas em 17 em vacas com mastite causada por *Prototheca* spp.

Características individuais	Nº de vacas
Faixa etária	
2-4 anos	6
4-6 anos	8
6-8 anos	3
Nº de lactações	
1-3	11
4-5	6
Estágio da lactação em meses	
1-3	4
4-6	7
>6	6
Tratamento de mastites anteriores	
17	
Identificação dos quartos afetados	
AE	7
AD	6
PE	7
PD	9
Conformação do úbere quanto ao ligamento Central	
Forte	7
Intermediário	7
Fraco	3
Comprimento dos tetos	
Longos	5
Intermediários	6
Curtos	6
Colocação dos tetos	
Base dos tetos no centro dos quartos	4
Base dos tetos na periferia dos quartos	5
Base dos tetos junto ao ligamento Central	8
Conformação do esfíncter	
Normal	15
Com protusão	2

Nas quatro propriedades com isolamento de algas no ambiente das vacas *Prototheca* spp. foi isolada da água de bebedouro, abastecimento, servida e empoçada em estábulo e em sala de ordenha, de amostra de solo de piquete e pasto, amostras de fezes de bezerros, fezes de suínos e em amostras de teteiras. *P. zopfii* foi identificada em amostras de solo de piquete, de fezes de bezerros e de suínos e de teteiras. Em algumas amostras, apesar da utilização de meio seletivo, não foi possível identificar a espécie do gênero *Prototheca* devido contaminação por fungos filamentosos.

Nas 13 propriedades estudadas foram examinados 820 quartos mamários de 383 vacas em lactação. Os microrganismos foram isolados de 513 (62,56%) quartos de um total de 319 vacas com suspeita de mastite. Os microrganismos isolados com maior frequência foram *Corynebacterium bovis* (31,77%), *Staphylococcus* spp. coagulase (-) (22,22%), *Staphylococcus* spp. coagulase (+) (10,72%) e *Streptococcus* spp. (14,04%) (Tabela 2).

Costa et al. (2000a), referem-se aos microrganismos predominantes na etiologia das mastites bovinas de propriedades das diferentes bacias leiteiras do estado de São Paulo como pertencentes às espécies dos gêneros *Corynebacterium*, *Staphylococcus* e *Streptococcus*, variando de um mínimo de 62,2%, na bacia leiteira de Alta Paulista, a um máximo de 91% na bacia leiteira do Vale do Ribeira.

Tabela 2. Microrganismos isolados de 319 vacas, 513 quartos mamários, de 13 propriedades leiteiras dos Estados do Paraná e São Paulo.

Microrganismos	Quartos afetados	
	Nº	%
<i>Corynebacterium bovis</i>	163	31,77
<i>Staphylococcus coagulase (-)</i>	114	22,22
<i>Streptococcus spp.</i>	72	14,04
<i>Staphylococcus coagulase (+)</i>	55	10,72
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	3,90
<i>Staphylococcus spp. + Corynebacterium bovis</i>	13	2,53
<i>Staphylococcus coagulase (-) + Streptococcus spp.</i>	8	1,60
<i>C. bovis + Streptococcus spp</i>	5	0,97
<i>Staphylococcus aureus + Corynebacterium bovis</i>	4	0,78
<i>Staphylococcus coag. (-) + Candida spp.</i>	3	0,59
<i>Staphylococcus aureus + Prototheca spp.</i>	3	0,59
<i>Staphylococcus aureus + Streptococcus spp.</i>	2	0,39
<i>Staphylococcus spp.+Streptococcus spp.+Corynebacterium bovis</i>	2	0,39
<i>Staphylococcus spp. + Prototheca zopfii</i>	2	0,39
<i>Staphylococcus spp.+ Corynebacterium bovis+Candida spp.</i>	1	0,19
<i>Streptococcus spp. + Corynebacterium bovis+Candida spp.</i>	1	0,19
<i>Corynebacterium bovis + Prototheca zopfii</i>	1	0,19
<i>Bacillus spp.</i>	2	0,39
<i>Alcaligenes spp.</i>	1	0,19
<i>Corynebacterium bovis + Alcaligenes spp.</i>	1	0,19
<i>Acinetobacter spp.</i>	1	0,19
<i>Micrococcus spp.</i>	1	0,19
<i>Nocardia spp.</i>	1	0,19
<i>Geotrichum candidum</i>	1	0,19
<i>Prototheca zopfii</i>	22	4,29
<i>Prototheca zopfii + Candida spp.</i>	3	0,59
<i>Candida spp.</i>	11	2,14
Total quartos mamários positivos	513	100,00

Na Tabela 3 consta a análise uni-variada das variáveis ambientais e de manejo relacionadas à presença de *Prototheca spp.*. Verifica-se que os fatores predisponentes significativos associados à mastite por *P. zopfii* nos rebanhos estudados foram: criação a pasto, alimentação com pasto e silagem, ordenha mecânica em estábulo, permanência das vacas após a ordenha em mangueira sem alimento, criação de suínos próximos às instalações dos bovinos, presença de cães, gatos e roedores, armazenamento do leite em tanque de expansão e sanificação do equipamento com água quente, utilização de detergente alcalino e ácido, falta de higienização dos tetos com água, pré-imersão dos tetos em copinho com

refluxo do anti-séptico, diagnóstico laboratorial e antibiograma, utilização de vacina contra mastite, bezerros alimentados com leite de vacas com mastite e a raça Holstein.

Tabela 3 – Resultados da análise uni-variada de variáveis ambientais e de manejo relacionadas à presença de *Prototheca* spp. em amostras de leite e ambiente de 13 propriedades produtoras de leite do Estado do Paraná e de São Paulo, no período de novembro de 2002 a novembro de 2004.

Variáveis	<i>Prototheca</i>		Qui- quadrado (χ^2)	Valor de P	OR (IC 95%)
	Positivos/Total de animais (%)				
Tipo de criação:					
Subsistência	0/40 (0)	10,36	0,0157	-	
Intensiva	1/57 (1,75)				
Semi-intensivo	6/157 (3,82)				
Pasto	13/129 (10,07)				
Presença de outros animais na propriedade:					
Sim	5/125 (4,00)	0,77	0,3796	0,55 (0,17 – 1,72)	
Não	14/200 (7,00)				
Presença de aves aquáticas no sistema de piquetes					
Sim	3/62 (4,83)	1,27	0,2604	0,42 (0,09 – 1,62)	
Não	16/147 (10,88)				
Criação de outros animais próxima aos bovinos					
Suínos	15/53 (28,30)	19,42	0,0002	-	
Aves	0/11 (0)				
Outras	1/30 (3,33)				
Suínos e Aves	0/29 (0)				
Acesso dos bovinos aos dejetos de outras criações					
Sim	16/98 (16,32)	2,95	0,0858	4,20 (0,85 – 28,12)	
Não	2/45 (4,44)				
Presença de cães, gatos e roedores					
Cão	3/113 (2,65)	14,06	0,0028	-	
Gato	1/51 (1,96)				
Cão, gato, roedores	16/156 (10,25)				
Cão, gato	0/63 (0)				
Sistema de Ordenha					
Mecânica	20/353 (5,66)	-	0,3868*	-	
Com bezerro e manual	0/30 (0)				
Local da ordenha mecânica					
Sala de Ordenha	5/215 (2,32)	7,95	0,0048	0,23 (0,07 – 0,69)	
Estábulo	15/157 (9,55)				
Armazenamento do leite					
Latão	2/130 (1,53)	4,33	0,0375	0,20 (0,03 – 0,94)	
Tanque de expansão	18/253 (7,11)				
Local de permanência das vacas pós-ordenha					
Canzil	1/102 (0,98)	6,76	0,0339	-	
Mangueira sem alimento	19/252 (7,53)				
Pasto	0/12 (0)				
Sanificação do equipamento					
Detergente alcalino clorado	1/189 (0,52)	32,91	0,0001	-	
Detergente ácido	1/51 (1,96)				
Detergente alcalino e ácido	18/113 (15,92)				

Tabela 3. (continuação)	Variáveis	Prototheca Positivos/Total de animais (%)	Qui- quadrado (χ^2)	Valor de P	OR (IC 95%)
Reposição do sanificante					
	Sim	0/61 (0)	-	0,0098*	-
	Não	20/224 (8,92)			
Higienização dos tetos com água					
	Não realiza	16/82 (16,32)	23,92	0,0001	11,37 (3,43-41,53)
	realiza	4/233 (7,41)			
Emprego de pré-dipping					
	Emprega	17/160 (9,60)	9,72	0,0018	6,52 (1,74-28,83)
	Não emprega	3/184 (1,60)			
Tipo de equipamento para pré e pós-dipping					
	Copinho	5/214 (2,34)	-	0,0001*	0,04 (0,01–0,15)
	Com refluxo	13/37 (35,13)			
Forma de secagem dos tetos					
	Papel toalha	20/324 (0,62)	-	0,1466 *	-
	Pano	0/40 (0)			
Número de ordenhas					
	Uma	2/46 (4,35)	-	1,0 *	0,81 (0,12–3,84)
	Duas	18/337 (5,34)			
Diagnóstico laboratorial e antibiograma					
	Sim	17/147 (11,6)	16,34	0,0001	9,68 (2,58– 42,85)
	Não	3/225(01,33)			
Utiliza vacina					
	Sim	16/81 (16,49)	21,42	0,0001	12,64 (3,31 – 56,87)
	Não	3/195 (1,54)			
CCS					
	0 – 250.000	3/81 (3,70)	7,46	0,0584	-
	250.000 – 500.000	15/243 (6,17)			
	500.000 – 1.000.000	0/72 (0,00)			
	Acima de 1.000.000	2/16 (12,5)			
Alimentação dos bezerros					
	Recebia leite mastítico	17/193 (8,80)	8,70	0,0031	6,02 (1,63 – 26,30)
	Não recebia leite mastítico	3/190 (1,57)			
Raça					
	Holstein	13/110 (11,1)	15,26	0,0092	-
	Mestiça	0/56 (0)			
	Girolanda	3/109 (2,75)			
	Holstein+Pardo+Girolanda	1/30 (3,33)			
	Mestiça + Girolanda	0/17 (0)			
	Holstein + Girolanda	3/61 (4,91)			
Alimentação					
	Pasto	0/36 (0)	29,71	0,0001	-
	Silagem	1/124 (0,80)			
	FORAGEM	0/23 (0)			
	Pasto + Silagem	19/125 (15,0)			
	Pasto + Silagem + Feno	0/56 (0)			
Sanificação com água quente					
	Sim	15/164 (9,14)	5,78	0,0162	3,70 (1,21-12,08)
	Não	5/189 (2,64)			
Tratamento de Mastite Subclínica					
	Durante lactação	3/93 (3,22)	0,87	0,3515	0,47 (0,11-1,79)
	Final da Lactação	17/259(6,56)			
Tratamento em vacas secas					
	Somente vacas com problema	8/33 (24,24)	0,09	0,7670	1,08 (0,00-5,25)
	Todas	18/319(5,64)			

*Teste exato de Fischer

Nas pastagens a multiplicação e a permanência das algas do gênero *Prototheca* é favorecida pela presença de matéria orgânica e umidade. Estudo amplo realizado por Pore et al. (1983) que abrangeu diversas propriedades localizadas nos EUA, Filipinas e Haiti, mostrou a distribuição ubiqüitária das algas no meio ambiente. Os autores isolaram *P. zopfii* e *P. wickerhamii* de amostras solo de pasto, água de lagos, rios, córregos e esgoto. Relatos subseqüentes de isolamento de *P. zopfii* na pastagem, água e dejetos próximos à sala de ordenha evidenciaram o caráter ambiental desta infecção (HODGES et al., 1985; ANDERSON; WALKER, 1988; COSTA et al., 1997).

A criação de suínos próxima à propriedade leiteira pode favorecer a disseminação de *P. zopfii* através da adubação das pastagens com esterco suíno. A presença de cães, gatos e roedores, na propriedade, foram considerados fator predisponente. Esses animais podem disseminar a *P. zopfii* pelas fezes contaminadas, já que as mesmas passam livremente através do trato digestivo (KIRK, 1991; COSTA et al., 1992; COSTA et al., 2000; YAMAMURA et al., 2003). Pore e Shahan (1988) observaram que a utilização de esterco como adubo, no pasto e lavoura, pode contaminar o solo onde permanecem as vacas em lactação. Anderson e Walker (1988) verificaram uma ocorrência de mastite por *P. zopfii* mais elevada em rebanhos mantidos em sistema de confinamento total e em piquetes, sem acesso ao pasto, mas com presença de lama e fezes. Pore et al. (1983) e Costa et al. (1997) verificaram que as principais fontes de disseminação para *P. zopfii* nas propriedades leiteiras são os bezerros, suínos, roedores, cães, gatos e vacas em lactação.

Neste trabalho a ordenha em estábulo favoreceu a disseminação da prototecose. No estábulo normalmente o manejo e higiene da ordenha é dificultado pela contaminação do piso e equipamento com fezes das vacas. Costa et al. (1997) observaram que em propriedades com casos de mastite por *P. zopfii* a alga é isolada com freqüência no equipamento de ordenha e no ambiente das instalações.

A permanência das vacas, após a ordenha, na mangueira ou piquete sem fornecimento de alimento favorece a infecção por *P. zopfii*. O fechamento completo do esfíncter não ocorre imediatamente após a ordenha o que favorece o ingresso de microrganismos no úbere. Costa et al. (1996a; 1998a) observaram uma elevada ocorrência de mastite por *P. zopfii* em rebanhos que não foram alimentados imediatamente após a ordenha. Segundo os autores, a oferta de alimentos no cocho após a ordenha desestimula as vacas a se deitarem em pisos contaminados, com o esfíncter do teto ainda relaxado.

Neste trabalho a utilização de água morna, sanificante alcalino e ácido para a limpeza do equipamento e a utilização de pré-dipping foram fatores predisponentes à mastite por

Prototheca spp.. Estas práticas normalmente são realizadas em propriedades mais tecnificadas e com animais mais produtivos e por isso mais suscetíveis às infecções intramamárias. Este fato ficou evidente, nesta pesquisa, em que propriedades com animais da raça Holstein foram mais predispostos à infecção. A limpeza correta do equipamento, quando não acompanhada de um manejo e higiene adequado de ordenha, não diminui os índices de novas infecções.

Smith, Todhunter e Schounberger (1985), Schukken et al. (1990) e Lescourret, Coulon e Faye (1995) observaram que as práticas de manejo, entre elas a higiene de ordenha são consideradas fatores de risco na ocorrência da mastite ambiental, quando aplicadas inadequadamente.

O uso de anti-sépticos antes e após a ordenha quando não associado às outras práticas de ordenha não é suficiente para prevenir novas infecções. A eficácia do pré e pós-dipping pode ser influenciada pelo tipo de anti-séptico, presença de matéria orgânica, reposição do produto e equipamento utilizado. Segundo Costa et al. (1996a) o pré-dipping pode prevenir a contaminação do equipamento por microrganismos de origem ambiental encontrados na superfície do teto e o pós-dipping de microrganismos adquiridos durante o processo de ordenha. Os autores observaram que a eficácia de anti-sépticos, como o iodo, é influenciada pela presença de matéria orgânica como fezes e leite incorporados ao produto pela limpeza incorreta dos tetos. Este fato pode ser observado neste trabalho no qual a não higienização dos tetos com água antes da ordenha e a utilização de copo que permite refluxo do anti-séptico predispõem à infecção.

Schukken et al. (1990) verificaram que a anti-sepsia dos tetos estava associada a um aumento de casos de mastite clínica provavelmente porque propriedades com elevados índices de mastite estão mais propensas a utilização do pré-dipping.

A realização de exames laboratoriais e antibiograma foram fatores predisponentes às infecções por *Prototheca* spp.. Esta prática de manejo, bastante desejável, normalmente é praticada em propriedades com elevada ocorrência de mastite. A mastite por *Prototheca* spp. é de difícil tratamento pela resistência à maioria dos antimicrobianos testados tanto *in vitro* quanto *in vivo*, sendo recomendada a segregação e/ou o descarte de animais acometidos como medida de controle eficaz (KIRK, 1991). Além disso, como o diagnóstico pode apresentar dificuldades na identificação das algas do gênero *Prototheca*, freqüentemente vacas acometidas por infecções intramamárias subclínicas com resultado microbiológico negativo não são medicadas e disseminam o agente para outros animais do rebanho, principalmente durante a ordenha (SPALTON, 1985; COSTA et al., 1996b). Costa et al. (1993) observaram que animais com mastite crônica, submetidos à terapia antibacteriana excessiva e repetida, são

mais suscetíveis às infecções fúngicas ou mistas e representam a causa predisponente mais importante de mastite micótica. Tratamento prévio com antimicrobianos foi fator predisponente neste trabalho. Na Tabela 1 observa-se que as 17 vacas com mastite por *P. zopfii* foram submetidas a terapias anteriores.

Nesta pesquisa o emprego de vacinas para prevenção de mastite foi considerado fator predisponente. Este fato pode ser explicado pela utilização da vacina J5 destinada à prevenção de mastites ambientais de origem bacteriana, principalmente enterobactérias (NICKERSON, 1998). Propriedades que utilizam essa vacina são propriedades que habitualmente têm sérios problemas com infecções intramamárias de origem ambiental.

A alimentação de bezerros com leite obtido de vacas com infecções intramamárias foi variável significativa para a ocorrência de mastite. De acordo com Costa et al. (2000), bezerros alimentados com leite de vacas com mastite por *Prototheca* spp. podem disseminar o agente, por meio de eliminação fecal e, portanto, aumentando a contaminação do meio ambiente. Nas propriedades onde este manejo foi adotado foram isoladas amostras de *P. zopfii* dos *swabs* anais dos bezerros. Por outro lado, nas propriedades onde esta alga não foi isolada de casos de mastite, a mesma não foi isolada das fezes dos bezerros lactentes. Esta prática comumente adotada nas propriedades de exploração leiteira brasileiras foi considerada imprópria para alimentar bezerros, segundo os autores.

4. CONCLUSÕES

A mastite bovina causada por *P. zopfii* ocorre em surtos ou casos esporádicos, sob forma clínica ou subclínica.

Os fatores predisponentes à mastite por *P. zopfii* associados a manejo e higiene de ordenha constaram de: criação a pasto, alimentação com pasto e silagem, ordenha mecânica em estábulo, permanência das vacas após a ordenha em mangueira sem alimento, criação de suínos próximos às instalações dos bovinos, presença de cães, gatos e roedores, armazenamento do leite em tanque de expansão, sanificação do equipamento com detergente alcalino e ácido, falta de higienização dos tetos com água, pré-imersão dos tetos em copinho com refluxo do anti-séptico, diagnóstico laboratorial e antibiograma, utilização de vacina contra mastite de origem bacteriana, alimentação dos bezerros com leite mastítico e raça Holstein.

As medidas de prevenção e controle da mastite quando não são aplicadas e corretamente podem acarretar uma elevação da predisposição a novas infecções.

5. AGRADECIMENTOS

Ao Médico Veterinário Dr. Kiefer pela colaboração na identificação da primeira propriedade leiteira com surto de mastite.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMERAYA, A.P. Aislamento de *Prototheca* em un brote de mastitis bovina. **Veterinaria México**, [S.I.], v.25, n.1, p.65-67, 1994.

AALBAEK, B.; STENDERUP, J.; JENSEN, H.E.; VALBAK, J.; NYLIN, B.; HUDA, A. Mycotica and algal bovine mastitis in Denmark. **Acta of Pathology Microbiology and Immunology Scandinavian**, Denmark, v.102, p.451-456, 1994.

ANDERSON, K.L; WALKER, R.L. Sources of *Prototheca* spp in a dairy herd environment. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, Schaumburg, v.193, n.5, p.553-556, 1988.

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. **Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira**, São Paulo, ano II, n.1, p.22-26, 1999.

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

CHEVILLE, N.F.; McDONALD, J.; RICHARD, J.L. Ultrastructure of *Prototheca zopfii* in bovine granulomatous mastitis. **Veterinary Pathology**, [S.I.], v.21, p.341-348, 1984.

COSTA, E.; CARCIOFI, A. MELVILLE, P.A.; PRADA, M.S.; SCHALCH, U. Estudo da participação do bezerro na cadeia epidemiológica da mastite bovina por *Prototheca* spp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 22., 1992, Curitiba, **Anais...**, Curitiba, 1992, p..

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

COSTA, E. O; BENITES, N.R.; MELVILLE, P. A; PRADO, R.B.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T. Estudo etiológico da mastite clínica bovina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v.17, n.4, p. 156-158, 1995.

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, Brazil. **Veterinary Research Communications**, Netherlands, v.20, p.237-241, 1996a.

COSTA, E.O.; CARCIOFI, A.C.; MELVILLE, P.A.; PRADA, M. A.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T. Bovine mastitis due to algae of the genus *Prototheca* sp. **Mycopathologia**, Netherlands, v.133, p.85-88, 1996b.

COSTA, E.O.; MELVILLE, P.A.; RIBEIRO, R.; WATANABE, E.T.; PAROLARI, M.C.F.F. Epidemiologic study of environmental sources in a *Prototheca zopfii* outbreak of bovine mastitis. **Mycopathologia**, Netherlands, 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. **Journal of Veterinary Medicine**, Berlin, v.45, p.65-71, 1998a.

COSTA, E.O.; MELVILLE, P.A.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T. Relato de um caso de consumo de queijo fresco contaminado com *Prototheca* sp. **Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira**, São Paulo, ano I, n.1, p.9-10, 1998b.

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. **Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira**, São Paulo, ano III, n.1, p.20-22, 2000.

DEAN, G.A.; DEAN, A.J; COULOMBIER, D. et al. Epi Info, Version 6: a word processing, database, and statistic program for epidemiology on microcomputers. **Center of Diseases Control and Prevention**, Atlanta, 1994.

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 estado do Paraná. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.29, n.1, p.87-89, 1999.

HARMON, R.J.; EBERHART, R.J.; JASPER; D.E.; LANGLOIS, B.E.; WILSSON, R.A. **Microbiologic procedures for diagnosis of bovine udder infection**. National Mastitis Council, Inc. Arlington, V.A., 1990.

HODGES, R.T.; HOLLAND, J.T.S.; NEILSON, F.J.A.; WALLACE, N.M. *Prototheca zopfii* mastitis in a herd of dairy cow. **New Zealand Veterinary Journal**, Palmerton North, v.33, p.108-111, 1985.

JÁNOSI, S.; RÁTZ, F.; SZIGETI, G.; KULCZÁR, M.; KERÉNYI, LAUKÓ, T.; KATONA, F. Review of the microbiological, pathological, and clinical aspects of bovine mastitis caused by the alga *Prototheca zopfii*. **The Veterinary Quarterly**, [S.I.], v.23, n.2, p.61, 2001.

JÁNOSI, S.; SZIGETI, G.; RÁTZ, F.; LAUKÓ, T.; KERÉNYI, J.; TENK, M.; KATONA, F.; HUSZENICZA, A.; KULCSÁR, M.; HUSZENICZA, G. *Prototheca zopfii* mastitis in dairy herds under continental climatic conditions. **The Veterinary Quarterly**, [S.I.], v.23, n.2, p.80-83, 2001b.

KIRK, J.H. Diagnosis and treatment of difficult mastitis cases. **Agri-Practice**, [S.I.], v.12, n.2, p.15-18, 1991.

KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 9th ed., Baltimore: Williams & Wilkins, 1984, 1268p.

LANGONI, H.; DOMINGUES, P.F.; FUNARI, S.R.; DIAS, H.L.T.; MORA, R.A.; ROCHA, N.S.; SFORCIN, A. *Prototheca zopfii* e mastite bovina: clínica e terapêutica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 22., 1992, Curitiba, **Anais...**, Curitiba, 1992, p.125.

LERCHE, M. Einen durch algen (*Prototheca*) hervorgerufene mastites der kuchi. **Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift**, Berlin, v.65, p.64-69, 1952.

LESCOURRET, F.; COULON, J.B.; FAYE, B. Predictive model of mastitis occurrence in the dairy cow. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.78, p.2167-2177, 1995.

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

NICKERSON, S.C. Estratégias para controlar a mastite bovina. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, I., 1998, Curitiba, **Anais...**, Curitiba, 1998, p.20-27.

PARDO, R.B.; CHAVES NETO, R.C.; FERNANDES, G.D.; DUARTE, D.D.S.; FERNANDES, A.A.; YOKOSAWA, S.Y.; MENCK, R.G.; GODOY, C.A.; FARINAZZO, A.M. Levantamento dos agentes etiológicos da mastite bovina na região de Arapongas, PR. – Resultados preliminares. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES, 3., 1999, Botucatu, **Anais...Botucatu**, 1999, p.159.

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

PORE, R.S. *Prototheca* taxonomy. **Mycopathologia**, Netherlands, 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. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.15, p.315-323, 1987.

PORE, R.S.; SHAHAN, T.A. *Prototheca zopfii*: natural, transient, occurrence in pigs and rats. **Mycopathologia**, Netherlands, v.101, p.85-88, 1988.

SCHALM, O.W.; NOORLANDER, D.O. Experimental observation leading to development of California Mastitis Test. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.139, p.199-204, 1957.

SCHUKKEN, Y.H.; GROMMERS, F.J.; VAN DE GEER, D.; ERB, H.N.; BRAND, A. Risk factors for clinical mastitis in herds with a low bulk milk somatic cell count. 1. Data and risk factors for all cases. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.73, p.3463-3471, 1990.

SMITH, K.L.; TODHUNTER, D.A.; SCHOENBERGER, P.S. Environmental mastitis: cause, prevalence, prevention. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.68, n.6, p.1531-1553, 1985.

SPALTON, D.E. Bovine mastitis caused by *Prototheca zopfii*: a cause study. **The Veterinary Record**, Washington, v.116, p.347-349, 1985.

TENHAGEN, B.A.; KALBE, P.; KLÜNDER, G.; HEUWIESER, W.; BAUNGÄRTNER, B. Individual animal risk factors for *Prototheca* mastitis in cattle. **Deutsch Tierärztliche Wochenschrift**, [S.I.], v.106, p.376-380, 1999.

YAMAMURA, A.A.M.; SHIMADA, M.K.; MÜLLER, E.E.; FREITAS, J.C.; GIORDANO-PRETTO, L.G.; PEREIRA, E.C. Ocorrência da mastite por algas do gênero *Prototheca* na região de Londrina, estado do Paraná. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, 3., 2001, Águas de Lindóia, **Anais...**, Águas de Lindóia, 2001, p.123.

YAMAMURA, A.M.M.; MÜLLER, E.E., PRETTO-GIORDANO, L.G.; NOGUEIRA, R.; NUNES, P. Surto de mastite bovina por algas do gênero *Prototheca* e detecção de fontes de infecção em uma propriedade leiteira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 22., 2003, Florianópolis, **Anais...**, Florianópolis, 2003, p.225.

ANEXOS

ANEXO 1
FORMULÁRIO DE INVESTIGAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA

ANEXO 1 – FORMULÁRIO DE INVESTIGAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA

FORMULÁRIO DA PROPRIEDADE

ESTUDO DOS FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À MASTITE CAUSADA POR ALGAS DO GÊNERO *Prototheca*, NA REGIÃO NORTE DO PARANÁ.

IDENTIFICAÇÃO DA PROPRIEDADE DATA:...../...../.....

NOME DA PROPRIEDADE:.....No.FICHA:.....

PROPRIETÁRIO:.....

ENDEREÇO:.....

TELEFONE:.....

DADOS DA PROPRIEDADE

PRODUÇÃO MÉDIA/VACA.....

VACAS EM LACTAÇÃO:

VACAS EM GESTAÇÃO:.....

PRODUÇÃO LEITEIRA DA PROPRIEDADE.....

- 1-TIPO DE CRIAÇÃO** (1) SUBSISTÊNCIA (2) INTENSIVA FREE STALL (3) INTENSIVA TIESTALL (4) SEMI-INTENSIVA (5) PASTO
- 2- RAÇA** (1) HOLANDESA (2) JERSEY (3) PARDO SUIÇA (4) MISTIÇA (5) GIROLANDA
- 3-ALIMENTAÇÃO** (1) PASTO (2) SILAGEM (3) FENO (4) TIPO FORRAGEM
- 4-CONCENTRADO** (1) RAÇÃO COMERCIAL (2) RAÇÃO FORMULADA NA PROPRIEDADE (3) OUTROS
- 5-ÁGUA DOS ANIMAIS** (1) TRATADA (2) NÃO TRATADA
- 6-ORIGEM DA ÁGUA** (1) RIO (2) REPRESA (3) AÇUDE PLUVIAL (4) MINA (5) OUTROS
- 7-ÁGUA ORDENHA** (1) TRATADA (2) NÃO TRATADA
- 8-ORIGEM DE ÁGUA DA ORDENHA** (1) POÇO (2) POÇO SEMI-ARTESIANO (3) MINA (4) OUTROS
- 9-CONDIÇÕES DO PASTO** (1) SOMBRA C/ BARRO (2) ÁREAS ALAGADIÇAS (3) PORTEIRAS COM BARRO
- 10-CONDIÇÕES CAMA SISTEMA INTENSIVO** (1) CAMA SECA (2) CAMA ÚMIDA
- 11-CONDIÇÕES DEJETOS SISTEMA INTENSIVO** (1) ESTERCO SÓLIDO (2) ESTERCO LÍQUIDO (3) REAPROVEITAM ÁGUA
- 12-SISTEMA PIQUETES PRESENÇA DE OUTRAS ESPÉCIES ANIMAIS**(1) SIM (2) NÃO
QUAIS.....
- 13-SISTEMA PIQUETES PRESENÇA AVES AQUÁTICAS** (1) SIM (2) NÃO
- 14-CRIAÇÃO PRÓXIMA** (1) SUÍNOS (2) AVES (3) OUTRAS
- 15- LOCALIZAÇÃO DE CRIAÇÃO PRÓXIMA** (1) ACIMA DOS PIQUETES (2) ABAIXO DOS PIQUETES
- 16-ACESSO DEJETOS CRIAÇÃO PRÓXIMA** (1) SIM (2) NÃO
- 17-DESTINO /TIPO DEJETOS BOVINOS** (1) ESTERQUEIRA/ LÍQUIDOS (2) ESTERQUEIRA/SÓLIDOS (3) DIRETO PASTO/LÍQUIDOS (4) DIRETO PASTO /SÓLIDOS
- 18-DESTINO DEJETOS OUTRAS ESPÉCIES** (1) PASTO (2) PRÓXIMO ALIMENTO DE BOVINOS
- 19- DISTÂNCIA ENTRE FOSSA OU DEPÓSITO DE FEZES E FONTE DE ÁGUA**
(1) 25M (2) MAIOR 25M (3) MENOR 25M (4) OUTRO
- 20-LOCALIZAÇÃO DE FOSSA OU DEPÓSITO DE FEZES C/ RELAÇÃO FONTE DE ÁGUA**
(1) ACIMA (2) ABAIXO (3) AO LADO
- 21-PRESENÇA** (1) CÃO (2) GATO (3) ROEDORES
- 22-PERMANÊNCIA VACAS APÓS ORDENHA** (1) CANZIL (2) MANQUEIRA S/ALIMENTO
- 23-CRIAÇÃO DE BEZERROS** (1) ALEITAMENTO EM BALDE (2) NA VACA (3) SUSCEDÂNEO DO LEITE (5) LEITE MASTÍTICO
- 24-TIPO MANEJO DE BEZERROS** (1) CASINHA (2) COLETIVO FECHADO (3) BOX INDIVIDUAIS (4) PIQUETE COLETIVO

25- SISTEMA DE ORDENHA(1) [] COM BEZERRO (2) [] MANUAL (3) [] MECÂNICA
26-ORDENHA MECÂNICA (1) [] SALA DE ORDENHA (2) [] ESTÁBULO
27-ORDENHA SISTEMA DE ARMAZENAMENTO (1) [] LATÃO (2) [] TANQUE DE EXPANSÃO
28- MANUTENÇÃO DO EQUIPAMENTO (1) [] SIM (2) [] NÃO
29-PERIODICIDADE DA MANUTENÇÃO: TROCA INSUFLADORESMESES POR[No.] DE ORDENHAS
30-SANIFICAÇÃO DO EQUIPAMENTO (1) [] ENXAGUE C/ DETERGENTE ALCALINO CLORADO (2) [] ENXAGUE C/ DETERGENTE ÁCIDO
31- SANIFICAÇÃO IMEDIATAMENTE ANTES ORDENHA (1) [] SIM (2) [] NÃO
32-SANIFICAÇÃO COM ÁGUA QUENTE (1) [] SIM (2) [] NÃO
33-SANIFICAÇÃO TETEIRAS ENTRE UMA E OUTRA VACA (1) [] SIM (2) [] NÃO
34-TIPO SANIFICAÇÃO TETEIRAS (1) [] C/ ÁGUA (2) [] C/DESINFETANTE
35-TEMPO EM MINUTOS DESINFECÇÃO TETEIRAS
36-TROCA DA ÁGUA E DESINFETANTE (1) [] SIM (2) [] NÃO
37-LAVAGEM DOS TETOS COM ÁGUA (1) [] SIM (2) [] NÃO
38-USO DE ANTI-SÉPTICO PRÉ-DIPPING (1) [] SIM (2) [] NÃO
39-USO DE ANTI-SÉPTICO PÓS-DIPPING (1) [] SIM (2) [] NÃO
40-TIPO DE APARELHO P/PRÉ E PÓS-DIPPING (1) [] SPRAY (2) [] COPINHO (3) [] C/REFLUXO
41-UTILIZAÇÃO DE SECAGEM (1) [] PAPEL TOALHA (2) [] PANO (3) [] OUTROS
42-EFETUA ORDEM DE ORDENHA (1) [] SIM (2) [] NÃO
43-FREQUÊNCIA/ LIMPEZA SALA DE ORDENHA (1) [] APÓS CADA ORDENHA (2) [] DIARIAMENTE (3) [] OUTROS
44-MÉTODO / LIMPEZA/ SALA DE ORDENHA (1) [] SOMENTE ÁGUA (2) [] ÁGUA E DESINFETANTE

45-TIPO DE LEITE (1) [] A (2) [] B (3) [] C
46-NÚMERO DE ORDENHAS (1) [] UMA (2) [] DUAS (3) [] TRÊS
47-TESTES P/ DETECTAR MASTITE-(1) [] TESTE DA CANECA (2) [] CMT
48- PERIODICIDADE DO CMT (1) [] SEMANAL (2) [] QUINZENAL (3) [] MENSAL
49-CONTAGEM CÉLULAS SOMÁTICAS (1) [] TANQUE (2) [] VACA/ CONTROLE OFICIAL (3) [] OUTROS
50-PERIODICIDADE CONTAGEM CÉL. SOMÁTICAS (1) [] QUINZENAL (2) [] MENSAL
51-UTILIZA DIAGNÓSTICO LABORATORIAL E ANTIBIOGRAMA (1) [] SIM (2) [] NÃO
52-TRATAMENTO IMEDIATO DE MASTITE CLÍNICA (1) [] SIM (2) [] NÃO
53-FORMA /TRATAMENTO/ MASTITE CLÍNICA (1) [] PARENTERAL (2) [] INTRAMAMÁRIO
54-FASE / LACTAÇÃO / TRATAMENTO MASTITE SUBCLÍNICA (1) [] DURANTE LACTAÇÃO (2) [] FINAL / LACTAÇÃO
55-TRATAMENTO / VACA SECA (1) [] SÓ VACAS PROBLEMA (2) [] TODAS
56-VACINA CONTRA MASTITE : QUAL.....

FICHA DE RESULTADOS E DE IDENTIFICAÇÃO DOS ANIMAIS AMOSTRADOS POR PROPRIEDADE

RESULTADO: LEITE

57- MASTITE POR *PROTOTHECA*: (1)SIM (2)NÃO
 58-MASTITE POR *PROTOTHECA* ASSOCIADA A BACTÉRIA: (1)SIM (2)NÃO
 58-MASTITE POR *PROTOTHECA* ASSOCIADA A LEVEDURA: (1)SIM (2)NÃO
 59-MASTITE BACTERIANA: (1)SIM (2)NÃO
 60- MASTITE POR LEVEDURA: (1)SIM (2)NÃO

RESULTADO: DA ÁGUA E SILAGEM

61-ÁGUA DO COCHO DOS ANIMAIS: (1)SIM (2)NÃO
 62-ÁGUA DE LAVAGEM DAS INSTALAÇÕES: (1)SIM (2)NÃO
 63-ÁGUA EM LAMA AO LONGO DA TRILHA PARA A SALA DE ORDENHA: (1)SIM (2)NÃO
 64-ÁGUA DO SOLO DA ÁREA DA SALA DE ORDENHA: (1)SIM (2)NÃO
 65-ÁGUA DE ABASTECIMENTO DA PROPRIEDADE: (1)SIM (2)NÃO
 66-SILAGEM DA PROPRIEDADE: (1)SIM (2)NÃO

RESULTADO: CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS

67-MÉDIA / CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS / REBANHO: (1) [] 0-140 (2) [] 141-252 (3) [] 253-565 (4) [] 566-1130 (5) [] 1131-2252 (6) 2253-4525 (7) [] .> 4525

RESULTADO: SWAB RETAL

68-SWAB RETAL DE BEZERRO: (1)SIM (2)NÃO
 69-SWAB RETAL DE VACA: (1)SIM (2)NÃO
 70-SWAB RETAL OU FEZES DE SUÍNO: (1) SIM (2) NÃO

RESULTADO: SWAB DO INSUFLADOR

71-SWAB ANTES DA ORDENHA: (1)SIM (2)NÃO
 72-SWAB APÓS A ORDENHA: (1)SIM (2)NÃO
 73-SWAB APÓS ORDENHA E IMERSÃO EM SOLUÇÃO DE CLORO: (1)SIM (2)NÃO

RESULTADO : SOLO

74-RESÍDUOS DA ÁREA DA SALA DE ORDENHA: (1)SIM (2)NÃO
 75-MATERIAL DA CAMA EM ESTÁBULO *FREE STALL*: (1)SIM (2)NÃO
 76-SOLO DA PASTAGEM DAS VACAS SECAS: (1)SIM (2)NÃO
 77-SOLO DA PASTAGEM DAS VACAS EM LACTAÇÃO: (1)SIM (2)NÃO
 78-SOLO DA PASTAGEM DOS BEZERROS: 1)SIM (2)NÃO
 79-VEGETAÇÃO AO LONGO DE RIACHOS NA PROPRIEDADE: (1)SIM (2)NÃO

ANEXO 2
FICHA INDIVIDUAL DO ANIMAL

ANEXO 2 – FICHA INDIVIDUAL DO ANIMAL

<p>Nº FICHA DA PROPRIEDADE</p> <p>IDENTIFICAÇÃO DOS ANIMAIS AMOSTRADOS POR PROPRIEDADE</p> <p>FICHA INDIVIDUAL DO ANIMAL</p> <p>Nº / NOME DO ANIMAL</p> <p>80- IDADE DO ANIMAL: (1) <input type="checkbox"/> 2-4 ANOS (2) <input type="checkbox"/> 4-6 ANOS (3) <input type="checkbox"/> 6-8 ANOS</p> <p>81-NÚMERO DE LACTAÇÕES:</p> <p>82-ESTÁGIO DA LACTAÇÃO EM MESES:</p> <p>83-CONDIÇÃO CORPORAL (1)...MAGRA (2)...NORMAL (3)...GORDA</p> <p>84-MASTITES ANTERIORES: (1) <input type="checkbox"/> SIM (2) <input type="checkbox"/> NÃO</p> <p>85-EFETUADO TRATAMENTO DE MASTITE: (1) <input type="checkbox"/> SIM (2) <input type="checkbox"/> NÃO (3) <input type="checkbox"/> OUTROS</p> <p>86-TRATAMENTO INTRAMAMÁRIO: (1) <input type="checkbox"/> SIM (2) <input type="checkbox"/> NÃO</p> <p>87-TRATAMENTO PARENTERAL E INTRAMAMÁRIO: (1) <input type="checkbox"/> SIM (2) NÃO</p> <p>88-CONFORMAÇÃO DO ÚBERE QUANTO AO LIGAMENTO CENTRAL (1) <input type="checkbox"/> FORTE (2) <input type="checkbox"/> INTERMEDIÁRIO (3) <input type="checkbox"/> FRACO</p> <p>89-TIPO DE TETOS (1) <input type="checkbox"/> LONGOS (2) <input type="checkbox"/> INTERMEDIÁRIOS (3) <input type="checkbox"/> CURTOS</p> <p>90-COLOCAÇÃO DOS TETOS: (1) <input type="checkbox"/> BASE NO CENTRO DOS QUARTOS (2) <input type="checkbox"/> BASE NA PERIFERIA DOS QUARTOS (3) <input type="checkbox"/> JUNTO AO LIGAMENTO CENTRAL</p> <p>91-CONFORMAÇÃO DO ESFINCTER (1)...NORMAL (2)...C/PROTUSÃO (3)...OUTROS</p> <p>92-IDENTIFICAÇÃO DOS QUARTOS: (1) <input type="checkbox"/> ANTERIOR ESQUERDO (2) <input type="checkbox"/> ANTERIOR DIREITO (3) <input type="checkbox"/> POSTERIOR ESQUERDO (4) <input type="checkbox"/> POSTERIOR DIREITO</p> <p>93-REALIZADO SWAB RETAL DA VACA? (1) <input type="checkbox"/> SIM (2) <input type="checkbox"/> NÃO</p> <p>94-REALIZADO SWAB RETAL DO BEZERRO? (1) <input type="checkbox"/> NÃO (2) <input type="checkbox"/> NÃO</p> <p>95-CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS: ...</p> <p>96-REALIZADO SWAB DE TETEIRA? (1) <input type="checkbox"/> SIM (2) <input type="checkbox"/> NÃO</p>
