

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Ocorrência de *Prototheca zopfii* em propriedades leiteiras do estado de Goiás e avaliação do limite de sensibilidade para o seu isolamento em leite.

Eveline Silva Xavier
Orientador: Prof. Dr. Antonio Nonato de Oliveira

GOIÂNIA
2008



Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TEDE) na Biblioteca Digital da UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás-UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações - BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor: Ediane Batista da Silva CPF: E-mail: edianeveterinaria@hotmail.com

Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? Sim Não

Vínculo Empregatício do autor: Agência de fomento:

País: UF: CNPJ: Sigla:

Título: Aspectos da resposta imune humoral e celular de bovinos naturalmente infectados com Mycobacterium bovis e avaliação de vacina de subunidade protéica para tuberculose em camundongos
Palavras-chave: Antígenos recombinantes, BCG, bovino, diagnóstico, tuberculose, vacina

Título em outra língua: Cellular and humoral immune response aspects of tuberculosis cattle naturally infected with Mycobacterium bovis and evaluation of a proteic subunit tuberculosis vaccine in mice

Palavras-chave em outra língua: Recombinant antigens, BCG, bovine, diagnostic, tuberculosis, vaccine

Área de concentração: Patologia, Clínica e Cirurgia Data defesa: (dd/mm/aaaa)
05/08/2008

Programa de Pós-Graduação: Ciência Animal

Orientador(a): Ana Paula Junqueira Kipnis CPF: E-mail: anapaula@iptsp.ufg.br

Co-orientador(a): André Kipnis CPF: E-mail: akipnis@iptsp.ufg.br

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização?¹ total parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:


[] Capítulos. Especifique:

[] Outras restrições:

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Goiânia 25 de agosto de 2008


Assinatura do(a) autor(a)

¹ Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

EVELINE SILVA XAVIER

Ocorrência de *Prototheca zopfii* em propriedades leiteiras do estado de Goiás e avaliação do limite de sensibilidade para o seu isolamento em leite.

Dissertação apresentada à Escola
de Veterinária da Universidade
Federal de Goiás como parte dos requisitos para
obtenção do grau de Mestre em
Ciência Animal

Área de Concentração:
Higiene e Tecnologia de Alimentos

Linha de Pesquisa:
Controle de qualidade de alimentos

Orientador:
Prof. Dr. Antonio Nonato de Oliveira – UFG

Comitê de Orientação:
Prof. Dr. Albenones José de Mesquita - UFG
Prof. Dr. Edmar Soares Nicolau - UFG

GOIÂNIA
2008

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(GPT/BC/UFG)

X3o **Xavier, Eveline Silva.**
Ocorrência de *Prototheca zopfii* em propriedades leiteiras do estado de Goiás e avaliação do limite de sensibilidade para o seu isolamento em leite[manuscrito] / Eveline Silva Xavier. – 2008. xix,39 f. : il. ; figs., tabs.

Orientador: Antonio Nonato de Oliveira ; Co-Orientadores: Prof. Dr. Albenones José de Mesquita , Prof. Dr. Edmar Soares Nicolau.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária, 2008.

Bibliografia: f.31-38.


**Inclui listas de figuras e de tabelas.
Anexos.**

1. Leite cru refrigerado – Goiás [Estado] 2. Leite cru refrigerado – Qualidade 3. Leite cru refrigerado – Bacteriologia 4. Mastite bovina I. Oliveira, Antonio Nonato II. Mesquita, Albenones José de. III. Nicolau, Edmar Soares. IV. Universidade Federal de Goiás, **Escola de Veterinária.** V. Título.

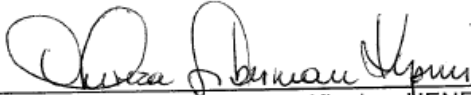
CDU: 637.12(817.3)

EDIANE BATISTA DA SILVA

Tese defendida e aprovada em **05/08/2008** pela Banca Examinadora constituída pelos professores:




Prof. Dra. Arge Paula Junqueira Kipnis
(ORIENTADOR (A))



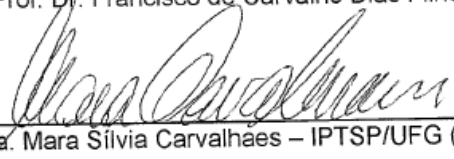
Prof. Dra. Thereza Liberman Kipnis – UENF/RJ



Dr. Pedro Moacyr Pinto Coelho Mota – LANAGRO/MG



Prof. Dr. Francisco de Carvalho Dias Filho



Profa. Dra. Mara Sílvia Carvalhães – IPTSP/UFG (memória)

DEDICATÓRIA

Dedico a Deus, aos meus pais, Lázaro e Luzia, ao meu esposo, Thiago, a minha filha Gabriela, aos meus irmãos e a todos os meus amigos e familiares.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter permitido que eu chegasse até aqui, sendo sempre meu alicerce.

A Universidade Federal de Goiás e a Escola de Veterinária, por ter-me dado a oportunidade de realizar o curso de mestrado, bem como de utilizar os laboratórios para a conclusão deste objetivo.

Aos professores da Escola de Veterinária, que me capacitaram com muita eficiência e paciência, em especial ao Prof. Dr. Albenones José de Mesquita, pelos conselhos, ensinamentos e apoio. Ao meu orientador Prof. Dr. Antonio Nonato de Oliveira.

A todos os meus colegas e amigos de jornada, em especial o Válter Ferreira Félix Bueno e a Camila Silveira de Melo, sem vocês nada seria possível, muito obrigada pelos ensinamentos e companheirismo.

Aos profissionais do Centro de Pesquisa em Alimentos, em especial a Sandra Queiroz Porto de Mesquita, Rosangela Nunes Carvalho, Neuza Dias Souza, Maria Magally de Sousa, Rodrigo Balduino Soares Neves, Silmara Dâmaso Fernandes, pela disposição em auxiliar o experimento, e pela amizade.

Às alunas de graduação Giselle do Nascimento Moreira, Paula Regina Sérgio Manzan e Dayana Silva Batista Soares, pelo auxílio no experimento e pela companhia.

Às minhas eternas amigas, Camila Silveira de Melo, Suzy Darlen Soares de Almeida e Caroline do Amaral Paixão, pela amizade, apoio, conselhos, enfim por sempre estarem ao meu lado, nos momentos mais difíceis.

A toda minha família que sempre me apoiou e se estou aqui hoje é por eles, principalmente o meu esposo Thiago Tundela de Lima, meu pai Lázaro Eurípedes Xavier e minha mãe Luzia Silva Xavier.

A vocês, toda minha gratidão e carinho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Microbiologia da <i>Prototheca</i> spp	3
2.2. Mastite bovina.....	5
2.2.1. Mastite bovina causada por <i>Prototheca</i> spp.....	6
a) Aspectos clínicos.....	6
b) Epidemiologia.....	8
c) Patologia.....	13
d) Identificação do agente e diagnóstico.....	14
e) Controle e Prevenção.....	17
f) Importância econômica e para saúde pública.....	18
3. OBJETIVOS.....	20
3.1. Objetivo Geral.....	20
3.2. Objetivos Específicos.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1. Amostragem	21
4.2. Colheita, acondicionamento e transporte das amostras	22
4.3. Análises laboratoriais	22
4.3.1. Contagem de células somáticas.....	22
4.3.2. Cultivo e isolamento da <i>Prototheca zopfii</i>	23
4.3.3. Avaliação do limite de sensibilidade da <i>Prototheca zopfii</i> ...	23
4.4 Análise Estatística	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
6. CONCLUSÕES	30
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
ANEXOS	39

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Estado de Goiás – Mesorregiões, microrregiões e principais cidades – 2000.....	21
FIGURA 2	Distribuição dos resultados das amostras analisadas nas cinco mesorregiões do estado de Goiás.....	25
FIGURA 3	Médias dos limites de sensibilidade dos métodos de cultura para crescimento da <i>Prototheca zopfii</i>	28

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Médias dos limites de sensibilidade dos métodos de semeadura para isolamento e semeadura para contagem para o crescimento de <i>Prototheca zopfii</i> em UFC/mL.....	27
TABELA 2	Análise de Variância da interação dos métodos de semeadura para isolamento e semeadura para contagem com as cepas analisadas.....	39

RESUMO

Entre as enfermidades de grande preocupação para os bovinos leiteiros encontram-se as mastites, incluindo aquelas causadas por *Prototheca* spp., um agente ambiental, relacionado à mastite bovina que destaca-se pela gravidade das lesões que causam no tecido mamário e pela resistência a ações terapêuticas. Objetivou-se com o presente estudo determinar a ocorrência de *Prototheca zopfii* no leite cru refrigerado no estado de Goiás, identificar o limite de detecção deste patógeno pelos métodos de semeadura para isolamento, e semeadura para contagem e também verificar se a incubação de amostras de leite com baixo número de células da *Prototheca zopfii* permite a obtenção de resultados positivos na cultura microbiológica. Foram analisadas 473 amostras originárias de propriedades com histórico de elevada contagem de células somáticas e procedeu-se a avaliação do limite de sensibilidade para o agente por meio do método de semeadura para isolamento, cujo limite de detecção correspondeu à faixa de 130 a 3.400 UFC/mL. Quanto ao método de semeadura para contagem o limite estabelecido foi – 25 a 300 UFC/mL. Portanto houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre os métodos analisados, porém, não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre as cinco cepas analisadas. Após a incubação das amostras por 24 horas a 37°C verificou-se que o limite de sensibilidade pelo método semeadura para isolamento diminuiu para 30 UFC/mL, diminuindo-se assim a possibilidade de ocorrência de falso negativo. Em nenhuma das amostras analisadas foi detectada a presença da *Prototheca zopfii*.

Palavras-chave: leite cru refrigerado, limite de detecção, mastite bovina, pré-incubação, *Prototheca zopfii*.

ABSTRACT

Mastitis is the most frequent disease in dairy cows, it causes great economic losses in herds and dairy industries and represents a hazard for public health. Among the etiologic agents identified, there is a predominance of bacteria species. However, several other groups of microorganisms may be present, one of those is a unicellular alga of the *Prototheca* genus, the *Prototheca zopfii*, an environmental agent of bovine mastitis. The infected cows usually have granulomatous changes in mammary tissue. Moreover microorganisms do not respond to routine therapy, resulting in the elimination of the infected animals. The main purposes of this study was to determine the occurrence of *Prototheca zopfii* on bulk tank milk in the state of Goiás and identify the limit of detection for *Prototheca zopfii* by two different approaches. We also wanted to know the samples pre-incubated with small concentration of *Prototheca zopfii* permits us to obtain positive growth in microbiological culture. We analyzed 473 samples from farms with high somatic cell count patterns but we did not detect *Prototheca zopfii* in any of those samples. The limit of sensitivity of the *Prototheca zopfii* was analyzed, in the approach of isolation the limit of detection was between 130 to 3,400 UFC/mL. In the approach of tally the limit was between 25 to 300 UFC/mL. It wasn't observed significant difference ($p>0,05$) between the approaches analyzed. However, significant statistical difference ($p<0,05$) occurred between the five types analyzed. After the pre-incubation at 37°C/24h, the limit of sensibility was analyzed by the approach isolation, the limit was 30 UFC/mL, what means that the pre-incubation is so important to decrease the possibility of occurrence of false negative.

Keywords: bovine mastitis, bulk tank milk, limit of detection, pre-incubation, *Prototheca zopfii*.

1) INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores de leite do mundo, ocupando o 6º lugar. Em 2006 foram produzidos no país aproximadamente 25.230.000.000 litros de leite. A produção nacional é praticamente o dobro da produção da Nova Zelândia e mais do que o dobro da produção da Argentina, que são países considerados referências na produção mundial (IBGE, 2008).

Em 1998, o valor bruto da produção da atividade leiteira, incluindo leite de animais descartados, correspondeu a 30% do valor da produção da pecuária, que inclui carne bovina, frango, ovos e suínos, além da própria atividade leiteira (IBGE, 2008). Em relação ao valor bruto da produção agropecuária brasileira, em 1998, a atividade leiteira correspondeu a 11%. São valores expressivos que demonstram a força econômica deste segmento do agronegócio.

A atividade leiteira é praticada em todo o território nacional em mais de um milhão de propriedades rurais e, somente na produção primária, gera acima de três milhões de empregos e agrega mais de seis bilhões ao valor da produção agropecuária nacional (IBGE, 2008). Além destes indicadores, a importância da atividade leiteira pode ser destacada pelo elevado valor nutritivo do leite, alimento essencial a alguns grupos de pessoas, pela geração de renda de centenas de produtores e ainda pela alta participação do leite e derivados na cesta básica que, por consequência, influenciam no cálculo do índice inflacionário.

O leite bovino contém 3,5% de proteínas, das quais 80% são representadas por caseína e 20% proteína do soro do leite (FONSECA & SANTOS 2000). Os alimentos lácteos são excelentes fontes de proteína de alta qualidade fornecendo quantidades variáveis de todos os aminoácidos essenciais que os humanos não podem sintetizar e em proporções geralmente maiores do que a maioria dos requerimentos de aminoácidos conhecidos. As proteínas lácteas, particularmente proteína do soro do leite, são uma rica fonte de aminoácidos de cadeia ramificada - leucina, isoleucina e valina.

A produção de leite na região Centro-Oeste aumentou significativamente nos últimos anos, de 12% para 15% de participação na produção nacional, no período de 1990-1997. O estado responsável por esta mudança foi Goiás, que passou para o segundo lugar, aumentando sua

participação de 7% para 10,8% (IBGE 2008). Esse incremento foi obtido principalmente devido à melhoria da composição genética do rebanho, além de investimentos em infra-estrutura, nutrição e saúde animal.

A melhoria genética dos rebanhos foi obtida principalmente pela introdução de animais adquiridos em outros estados notadamente das regiões Sul e Sudeste. A forma como esse processo foi consolidado, associada às precárias condições de manejo e mão-de-obra despreparada na maioria das propriedades rurais, aumentaram as possibilidades de introdução e disseminação de enfermidades nos rebanhos do país. Dentre estas enfermidades pode-se destacar a mastite.

A alga *Prototheca zopfii*, apesar de não figurar entre os agentes tradicionais da mastite bovina, gera grande impacto na produção de leite e representa perigo à saúde pública. Em virtude da importância da pecuária leiteira para o estado de Goiás e do fato de que o patógeno já foi identificado em animais com mastite no referido estado, em uma propriedade com 120 animais, 6 animais estavam infectados, portanto, torna-se imprescindível o conhecimento da enfermidade, com vistas à adoção de procedimentos para seu controle e profilaxia nos rebanhos infectados.

Deve-se incluir esse microrganismo na rotina de diagnóstico diferencial dos agentes de mastite bovina em virtude dos prejuízos na qualidade e produção de leite. Além disso, apresenta elevada resistência antimicrobiana e alto potencial zoonótico, fatores que levam ao descarte dos animais. A realização de estudos epidemiológicos que melhor caracterizem a ocorrência deste patógeno nos rebanhos e os fatores de risco associados, também constituem medidas necessárias para subsidiar futuras ações de controle e prevenção desta enfermidade.

2) REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1) Microbiologia da *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).

A *Prototheca* spp. destaca-se entre os agentes ambientais da mastite bovina principalmente em decorrência da gravidade das lesões causadas no tecido mamário e das limitações terapêuticas (JÁNOSI et al., 2001a). Além disso, pode apresentar elevada ocorrência, tornando-se o principal agente ambiental da mastite clínica (RIBEIRO, 2001).

Estudos morfofisiológicos 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 et al., 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, 1981; KAPLAN et al., 1976; KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; TANYIAMA et al., 1994).

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 30 μm) 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 romper-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).

O isolamento da *Prototheca* spp é facilitado pela cultura em ágar Saboraud dextrose mas, em trabalhos que visem a pesquisa específica de *Prototheca* sp., a cultura pode ser efetuada em meios seletivos e de enriquecimento para este agente, o meio PIM – *Prototheca* isolation medium (PORE, 1973) - ou o meio PEM - *Prototheca* enrichment medium (PORE et al., 1987).

A identificação deve ser feita com base nas características morfológicas macro e microscópicas e por comparação do padrão de assimilação de diversos substratos, como o descrito por PORE et al. (1987). *Prototheca zopfii* apenas fermenta glicose e glicerol, mas não fermenta os demais açúcares. Outra espécie deste gênero, a *Prototheca wickerhamii*, apresenta um perfil bioquímico diferente, com fermentação de glicose, glicerol, galactose e trealose; sendo que este resultado deverá ser correlacionado ao registro da morfologia, para a diferenciá-la

de *Candida glabrata*, pois têm um perfil bioquímico semelhante (KOEHLER et al., 1999).

A alta incidência de *Prototheca* spp. ocorre nas primeiras semanas de lactação e principalmente no verão (JANOSI et al., 2001a), mas há relatos de casos durante o período seco (COSTA et al., 1996b). A presença de mastite por *Prototheca* spp. pode ocorrer tanto na forma esporádica como epidêmica. Propriedades epidemicamente afetadas são relacionadas com condições inadequadas de manejo e higiene (COSTA et al., 1996a e b), havendo correlações da presença deste agente causando mastite com as condições de higienização dos tetos na pré-ordenha, assim como a manutenção dos animais em ambiente com elevada umidade.

2.2) Mastite bovina

A mastite caracteriza-se por um processo inflamatório da glândula mamária frente às agressões físicas, químicas, térmicas, mecânicas ou microbianas (FONSECA & SANTOS, 2000). PHILPOT & NICKERSON (2002) apontam que 90% das mastites são causadas por bactérias. Os microrganismos envolvidos na etiologia da mastite bovina podem ser classificados em patógenos “maiores” e “menores”. Na primeira categoria estão incluídos os agentes que provocam maiores contagens de células somáticas, alterações significativas na composição do leite e, conseqüentemente, grande impacto econômico.

Os principais patógenos “maiores” são os *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, coliformes, estreptococos, enterococos, *Pseudomonas* spp., *Actinomyces pyogenes* e *Serratia* spp., *Estafilococos* coagulase negativos e *Corynebacterium bovis* são considerados patógenos “menores” e promovem inflamação moderada com contagem de célula somática de no máximo duas a três vezes superior a dos quartos sadios (HARMON, 1994). Além destes patógenos, fungos, leveduras, algas clorofiladas do gênero *Prototheca* spp. (COSTA et al., 1998) e vírus também podem estar envolvidos na etiologia da doença, porém a ocorrência é baixa segundo BUENO et al. (2003).

A mastite pode ser dividida em dois grupos, conforme sua forma de manifestação. A forma clínica, que cursa com sinais evidentes, tais como, edema, hipertemia, endurecimento e dor da glândula mamária e/ou aparecimento de grumos, pus ou outras alterações das características do leite (BUENO *et al.*, 2002). E a forma subclínica que se caracteriza por alterações na composição do leite, porém não evidentes. Entre as principais alterações destacam-se o aumento da contagem de células somáticas, o aumento dos teores de CL^- , Na^+ , proteínas séricas e diminuição do percentual de caseína, gordura, sólido total e lactose do leite (COELHO, 2004).

2.2.1) Mastite bovina causada por *Prototheca* spp

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 (SPALTON, 1985; COSTA *et al.*, 1992; LANGONI *et al.*, 1992).

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

a) Aspectos Clínicos

Os animais infectados por *Prototheca zopfii* podem apresentar mastite subclínica ou clínica (aguda ou crônica), sendo o quadro clínico crônico a forma predominante (COSTA *et al.*, 1996a; GONZALEZ, 1998; JÁNOSI *et al.*, 2001a). Sinais sistêmicos geralmente não são observados (JÁNOSI *et al.*, 2001a; JÁNOSI *et al.*, 2001b). O quadro clínico agudo ocorre principalmente em surtos da enfermidade e se caracteriza pela acentuada redução da produção de leite, que pode cessar abruptamente. A secreção glandular pode apresentar grumos, flocos, aspecto sero-purulento ou aquoso (COSTA *et al.*, 1996b; BRITO & VEIGA, 1997;

JÁNOSI et al., 2001a). BUENO et al. (2006) verificaram que em três vacas infectadas a produção de leite reduziu de aproximadamente 20 kg diários para menos de 10 kg diários, no intervalo de um mês.

As alterações comumente observadas no quadro clínico crônico consistem no aumento da consistência do tecido glandular e alterações do leite, como aparência aquosa e presença de grumos de caseína e flocos de fibrina ou pus (LANGONI et al., 1995; GOMES et al., 1999; JÁNOSI et al., 2001a; BUENO et al., 2003). O quadro subclínico se caracteriza pela baixa produção de leite e elevada CCS, geralmente superior a 1.000.000 CS/mL, podendo atingir valores próximos a 9.000.000 CS/mL (JÁNOSI et al., 2001b; KIRK & MELLEBERGER, 2007). No entanto, as vacas infectadas também podem apresentar CCS baixa, ou seja, inferior a 200.000 CS/mL (COSTA et al., 2001; TENHAGEN et al., 2005 BUENO et al., 2002).

Rebanhos com vacas em lactação, infectadas com a alga, podem apresentar resultados elevados na contagem padrão em placas do leite armazenado em tanques de refrigeração. GONZÁLEZ et al. (1998) verificaram que em um rebanho de 192 vacas em lactação, onde 29% estavam infectadas, os resultados da contagem padrão em placas atingiram 600.000 UFC/mL.

Podem ser observadas também alterações na composição do leite, com expressiva redução dos teores de gordura, lactose e sólidos totais. Essas alterações podem decorrer do metabolismo da alga, que degrada glicerol e glicose ou da lesão tecidual do parênquima glandular (JÁNOSI et al., 2001a). BUENO et al. (2002) observaram que os resultados de gordura, lactose e sólidos totais do leite de vacas infectadas podem ser inferiores a 2,5%, 4,0% e 11,0%, respectivamente.

Independente do microrganismo envolvido, a infecção da glândula mamária geralmente decorre da penetração do agente via ascendente pelo canal do teto, com posterior colonização do tecido glandular (PHILPOT & NICKERSON, 2002). Os tecidos da glândula mamária lactante são altamente suscetíveis à infecção por *P. zoppii* e as lesões inflamatórias se encontram irregularmente distribuídas no parênquima mamário (CORBELLINI et al., 2001; JÁNOSI et al., 2001a).

Nos casos clínicos, o tecido conectivo interalveolar apresenta infiltração de linfócitos, macrófagos, neutrófilos e focos de eosinófilos (BENITES et al., 1999; JÁNOSI et al., 2001b; BUENO et al., 2006). Podem ser encontrados neutrófilos e macrófagos no lúmen alveolar, contendo o agente fagocitado, além de células gigantes nos infiltrados intersticiais (CORBELLINI et al., 2001). Nos linfonodos supramamários, observa-se linfadenite serosa aguda, com acentuada infiltração eosinofílica (JÁNOSI et al., 2001b).

Nos casos crônicos, são encontrados focos circunscritos de necrose, proliferação fibroblástica e atrofia alveolar (CORBELLINI et al., 2001; JÁNOSI et al., 2001b; BUENO et al., 2006). Comparativamente às alterações causadas por bactérias, a infiltração de células mononucleares é mais pronunciada e ocorre formação de microgranulomas associados com processo proliferativo (JÁNOSI et al., 2001a). 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.

b) Epidemiologia

Casos esporádicos de mastite causada por algas do gênero *Prototheca* foram registradas na Europa, Américas do Norte, Central e Sul, e Ásia (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)

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).

No Brasil, o primeiro caso registrado ocorreu no estado de Mato Grosso do Sul, em uma vaca importada (COSTA, 1989, citado por COSTA et al., 1999). Em seguida, outros casos foram registrados nos estados de São Paulo (COSTA et al., 1992), Minas Gerais (BRITO & VEIGA, 1994), Paraná (FILIPPENSEN et al., 1999), Rio Grande do Sul (GOMES et al., 1999), Pernambuco (MOTA et al., 1999) e Goiás (BUENO et al., 2003).

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 antiséptico, 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% das vacas em fase de lactação e 8,06% das 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 ocorrência 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. (1998) 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 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 et al., 2000) e 15,38% (PARDO et al., 1999).

COSTA et al. (2000a) analisaram as principais bacias leiteiras do estado de São Paulo entre elas: 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, predominou a *P. zopfii*. Os casos de mastite por *Prototheca* spp. foram mais elevados nas propriedades leiteiras da Bacia da Alta Paulista, tiveram números reduzidos nas propriedades das bacias leiteiras restantes e estiveram ausentes 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* foram mais frequentes em propriedades produtoras de leite tipo B quando comparadas às de leite tipo C e tipo A.

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, também isolaram o microrganismo de amostras do meio ambiente e sugeriram a possibilidade de a infecção ser resultante de lesões traumáticas causadas pela ordenhadeira mecânica e pelo hábito de as vacas leiteiras deitarem-se no chão após a ordenha sobre superfícies 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 & WALKER (1988). A alga foi isolada no estado de Carolina do Norte, Estados Unidos da América, 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 & 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). 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) isolaram *P. Zopfii*, em um 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. Alguns peixes como, por exemplo, as 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. zoppii* 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. zoppii* 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 JÁNOSI et al. (2001b) na Hungria. Os autores observaram pelo período de dois anos 223 vacas com mastite por *P. zoppii* 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.

c) Patologia

CHEVILLE et al., (1984) estudaram em vacas com infecções intramamárias agudas e crônicas a degeneração das organelas citoplasmáticas da parede celular de *P. zoppii*, ação dos macrófagos e alterações sofridas por eles 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. zoppii* 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 et al.,(1984) 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 (MCDONALD et al. 1984).

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.

d) Identificação do agente e diagnóstico

A confirmação da presença do agente só é possível com a utilização de recursos laboratoriais específicos. Embora o diagnóstico possa ser realizado através de métodos histológicos ou sorológicos, o procedimento mais empregado consiste na cultura microbiológica de amostras da secreção mamária em ágar,

principalmente o Sabouraud dextrose (JÁNOSI et al., 2001; ROESLER et al., 2001; KIRK & MELLEBERGER, 2002; COSTA et al., 2004).

BUZZINI et al. (2004) observaram que aproximadamente 20% das amostras de leite colhidas de quartos mamários infectados apresentavam contagens iguais ou inferiores a 100 UFC/mL. A sensibilidade da cultura microbiológica direta de amostras de leite sofre grande influência do número de células da alga presentes na amostra. Assim sendo, pode ser que um animal infectado possa ser erroneamente considerado livre do patógeno, em virtude de uma situação que proporcione baixa excreção do agente.

Uma alternativa comumente utilizada nos laboratórios de microbiologia para aumentar a sensibilidade da cultura microbiológica consiste no enriquecimento da amostra, através de sua inoculação em meios apropriados. No entanto, esse procedimento representa aumento do custo analítico. Por outro lado, considerando que o leite possui grande valor nutritivo, a incubação da própria amostra pode ser suficiente para elevar a sensibilidade da cultura, sem onerar a análise (BUZZINI et al. 2004).

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 et al., 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. ágar Sabouraud dextrose) são os mais apropriados para cultivar *P. zopfii* (PORE et al., 1983; COSTA et al., 1997).

Bactérias e fungos contaminantes podem inibir o crescimento de *Prototheca* e para suprimir os contaminantes bacterianos podem ser adicionados ao meio 100mg/ L de cloranfenicol (COSTA et al., 1997). 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 ágar Sabouraud mantido a 37°C por 48 horas, em condições de aerobiose, a *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 à cera, com 5 a 7mm de diâmetro podem ser vistas após longo tempo de incubação.

O microrganismo forma colônias fracas, pequenas e cinzentas em ágar sangue ou ágar 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 30um de diâmetro. Os endósporos liberados, com um citoplasma granuloso, são ovais com 8 a 15um 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, 1983), e clotrimazol - *P. zopfii* é resistente (AALBAEK et al., 1994). Testes de fermentação com 0,5% de concentração dos carboidratos, utilizados para a assimilação, em meio extrato de carne permitem identificar 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 et al., 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).

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 imunoadsorvente altamente sensível (ELISA) para a monitorização de anticorpos no soro de vacas detecta anticorpos, tanto em vacas doentes quanto em sadias, 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).

e) Controle e Prevenção

O controle de mastite por *P. zopfii* em rebanhos é altamente difícil. Em virtude da baixa eficiência terapêutica e do potencial risco à saúde pública, indica-se o descarte dos animais infectados (VARGAS, et al., 1998; JÁNOSI et al.,

2001a; KIRK & MELLEBERGER, 2007). Até que ocorra a eliminação das vacas infectadas do rebanho, essas devem ser ordenhadas por último (KIRK & MELLEBERGER, 2007). COSTA et al. (1999) recomendam o descarte das vacas com mais de um quarto infectado e cauterização química, com nitrato de prata a 0,75%, em caso de apenas um quarto mamário infectado.

Além dessas medidas específicas, deve-se manter monitoramento contínuo do rebanho e seguir as recomendações para controle de mastite, com ênfase na correta rotina de ordenha, conforto e higiene ambiental (BLOWEY & EDMONDSON, 1995; COSTA et al., 1999; FONSECA & SANTOS, 2000; JÁNOSI et al., 2001a). Considerando que o agente pode sobreviver na água, a qualidade desta deve ser sempre avaliada quando da preparação dos tetos para ordenha, a fim de se prevenir a infecção intramamária (PORE et al., 1983; CORBELLINI et al., 2001). A correta realização da imersão dos tetos em solução desinfetante, antes da ordenha, contribui para a redução de novas infecções, pois iodo, clorexidina, cloro ou quaternário de amônio, nas concentrações comerciais, eliminam o agente (RIBEIRO, 1996).

Devido a possibilidade de introdução do agente no rebanho por animais recém-adquiridos (LANGONI et al., 1995; BRITO & VEIGA, 1997; BRITO et al., 1999), recomenda-se a realização de análises microbiológicas do leite antes da aquisição de novos animais (FONSECA & SANTOS, 2000) e, ou estabelecimento de contratos de compra e venda com cláusulas específicas.

f) Importância econômica e para saúde pública

A acentuada redução do volume de leite produzido constitui grande prejuízo decorrente da infecção da glândula mamária por *P. zoppii* (JÁNOSI et al., 2001a; BUENO et al., 2003). Podem ocorrer também gastos desnecessários com uso de antimicrobianos (JÁNOSI et al., 2001b). Em virtude das lesões irreversíveis na glândula mamária e das limitações terapêuticas, as vacas infectadas devem ser descartadas ou mantidas apenas para fins reprodutivos (COSTA et al., 1999; JÁNOSI et al., 2001a; KIRK & MELLEBERGER, 2007). Os prejuízos econômicos

são potencializados em função do número de animais acometidos no rebanho (JÁNOSI et al., 2001b).

COSTA et al. (1998a) relataram a ocorrência de distúrbio gastrointestinal em voluntário que consumiu queijo fresco fabricado com leite sabidamente contaminado com *P. zopfii*. Os autores registraram ainda o isolamento da alga a partir das fezes do voluntário. Segundo MELVILLE et al. (1999), a resistência do microrganismo à pasteurização pode aumentar seu potencial zoonótico. A infecção humana por *P. zopfii* também pode se manifestar-se na forma de bursite, peritonite e lesões cutâneas, embora esses quadros estejam relacionados principalmente à *P. wickerhamii* (PORE et al., 1983; MELVILLE, 1999).

3) OBJETIVOS

3.1) Objetivo geral

Estudar a ocorrência de *Prototheca zopfii* no leite cru refrigerado com alta contagem de células somáticas no estado de Goiás.

3.2) Objetivos específicos

Estudar e comparar a ocorrência de *Prototheca zopfii* nas cinco mesorregiões do estado de Goiás;

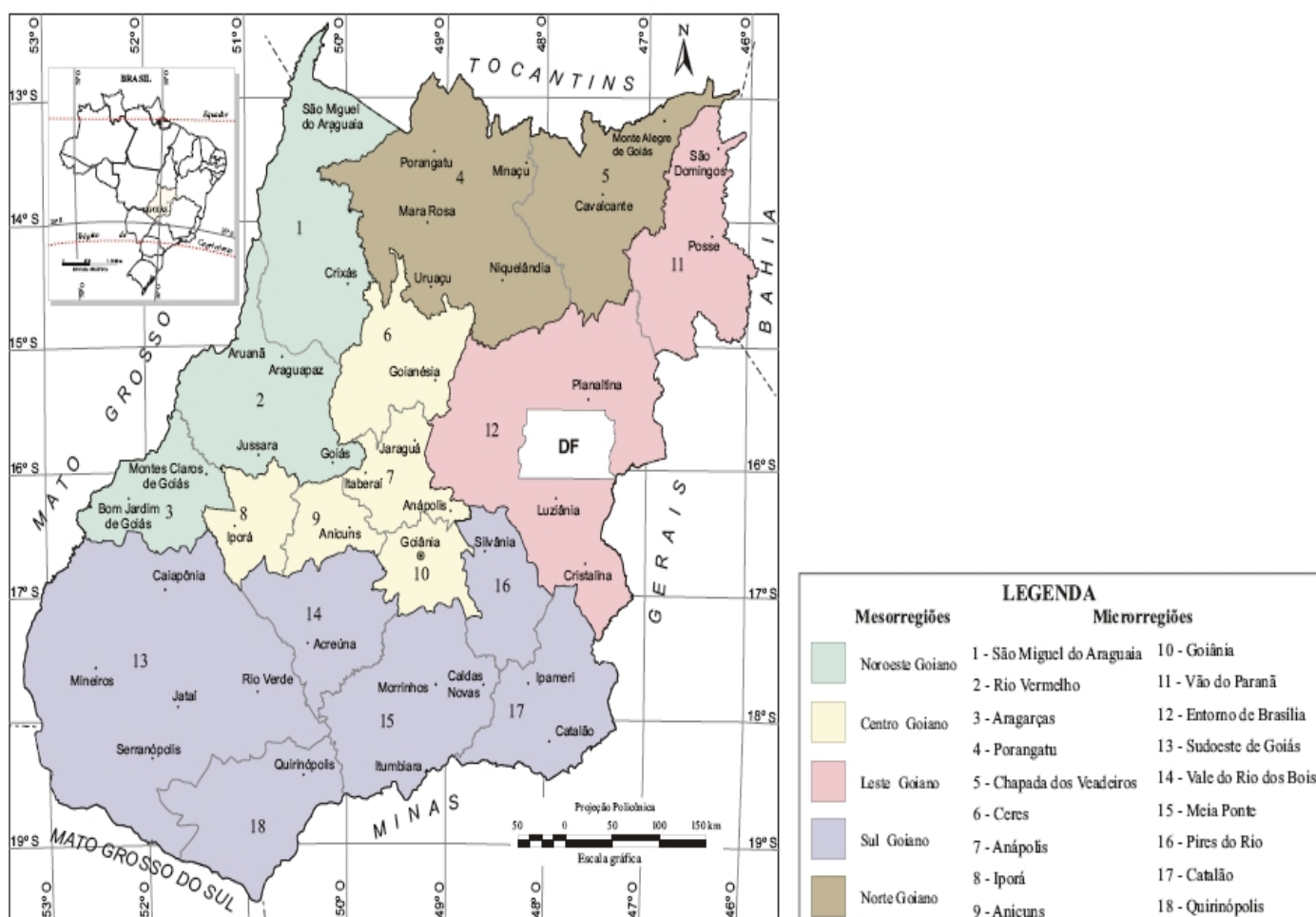
identificar o limite de detecção do método de cultura da *Prototheca zopfii* em amostras de leite;

verificar se a incubação de amostras de leite com baixo número de células de *Prototheca zopfii* permite a obtenção de resultados positivos na cultura microbiológica.

4) MATERIAL E MÉTODOS

4.1) Amostragem

Conforme o Anuário Estatístico do Planejamento do Estado de Goiás (Anuário - Goiás 2006), o mesmo é dividido em cinco mesorregiões. Foram colhidas 130 amostras no Centro Goiano, 15 no Leste Goiano, 82 no Noroeste Goiano, 87 no Norte Goiano e 159 no Sul Goiano, perfazendo um total de 473 amostras originárias de propriedades com histórico de elevada contagem de células somáticas.



Fonte: <http://www.observatoriogeogoiias.com.br/observatoriogeogoiias/mapa.htm>

FIGURA 1: Estado de Goiás – Mesorregiões, microrregiões e principais cidades – 2000.

4.2) Colheita, acondicionamento e transporte das amostras

As amostras de leite foram obtidas em 473 propriedades do estado de Goiás, diretamente dos tanques de expansão, pelos laticínios das regiões. Após homogeneização do leite no tanque foram colhidos aproximadamente 25mL de leite em frascos de plástico e colocados em caixa isotérmica com gelo reciclável. As amostras colhidas foram levadas ao Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás (CPA-EV-UFG). A temperatura das amostras não ultrapassou 7°C durante todo o período compreendido entre a colheita e a recepção no laboratório.

4.3) Análises laboratoriais

4.3.1) Contagem de Células Somáticas (CCS)

Para a análise da contagem de células somáticas utilizou-se o equipamento Fossomatic 500 Basic[®] (Foss Electric A/S. Hillerod, Denmark), cujo princípio analítico baseia-se na citometria de fluxo. Após ser automaticamente pipetada para dentro do equipamento, uma alíquota da amostra foi misturada aos reagentes. As membranas das células somáticas se romperam, permitindo a coloração do DNA pelo brometo de etídio. O equipamento possui uma lâmpada halógena que emite raios de luz azul que ao incidirem sobre o DNA corado, provocaram a emissão de pulsos de luz vermelha, os quais são ampliados e contados por um dispositivo foto-multiplicador, fator de correção, e então o equipamento expressa o resultado em células/mL. As amostras foram pré selecionadas, de acordo com o número de células somáticas por mL, foram sorteadas as amostras com mais de 400.000 células/mL, pois, de acordo com KIRK E MELLENBERGER (2007) há maior probabilidade de se encontrar *Prototheca zopfii* nesta condição.

4.3.2) Cultivo e isolamento da *Prototheca zopfii*

As amostras de leite foram incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, por 24 horas e posteriormente inoculadas com aros calibrados de 100 μL , em Ágar Sabouraud Dextrose e incubadas em estufa a $36^\circ \pm 1^\circ\text{C}$, em condições de aerobiose, durante 48 horas.

Após este tempo as colônias foram observadas e as que apresentaram características morfológicas sugestivas de *Prototheca* foram analisadas em microscópio de contraste de fase, a fresco, com solução salina. Foi feita a frequência absoluta e relativa para análise destes dados.

4.3.3) Avaliação do limite de sensibilidade da *Prototheca zopfii*.

Utilizaram-se quatro cepas de *Prototheca zopfii*, previamente isoladas de casos de mastite bovina e, ainda, uma cepa de referência (ATCC 16529), adquirida de uma coleção de cultura alemã. A partir das culturas puras em ágar Sabouraud dextrose, as colônias foram suspensas em solução salina 0,85% esterilizada.

Da suspensão inicial, 1,0 mL foi inoculado em frascos contendo 20 mL de leite UHT. Após esta etapa foram feitas diluições seriadas sucessivas em frascos contendo 9 mL de leite (UHT) e 1 mL da diluição anterior, totalizando quatro diluições, chamadas de L0, L1, L2, L3 e L4.

Foram avaliados dois métodos para identificar o limite de detecção de cultura da *Prototheca zopfii*. O primeiro método foi a semeadura para isolamento e o segundo a semeadura para contagem.

Para o método de semeadura para isolamento utilizaram-se as amostras L0, L1, L2, L3 e L4. Estas foram estriadas em uma placa de ágar Sabouraud dextrose dividida em cinco partes, utilizando-se uma alça microbiológica calibrada de 100 μL . Foi feito este procedimento para as cinco cepas analisadas. As placas foram incubadas a 37°C durante 48 horas em aerobiose.

Foi feita então a leitura das placas. As amostras que apresentaram crescimento de *Prototheca zopfii* foram positivas e as que não apresentaram

crescimento foram negativas. A identificação das colônias foi baseada nos aspectos morfológicos das colônias e das células ao microscópio óptico (JANOSI et al., 2001a).

Após a identificação do número mínimo necessário para identificação de uma amostra positiva, as amostras de leite que apresentaram concentrações inferiores à concentração necessária para se obter um isolamento positivo foram incubadas por 24 horas a 37°C. Após este período, foram realizados os mesmos procedimentos anteriores.

Para a avaliação do segundo método, de semeadura para contagem do número de colônias, foram preparadas, a partir das diluições de leite L0, L1, L2, L3 e L4 mais quatro diluições seriadas em água peptonada 0,1%. Estas diluições foram plaqueadas conforme procedimento descrito para contagem de *Staphylococcus aureus*, porém em ágar Sabouraud dextrose (BRASIL, 2003).

Utilizou-se uma placa para cada diluição, onde se inoculou 0,1 mL de solução e, com a ajuda de um bastão, espalhou-se a solução por toda a placa. Após este procedimento, as placas foram incubadas a 37°C durante 48 horas e, após este tempo, foi feita a contagem de colônias nas placas.

4.4) Análise Estatística

Para a análise estatística foram utilizadas distribuição de frequência, análise de variância e teste tukey. A frequência foi utilizada para descrever a distribuição de ausência ou presença de *Prototheca zopfii* nas amostras de leite das cinco mesorregiões estudadas. Esta também foi utilizada para descrever a frequência de positividade no método de semeadura para isolamento, após incubação de amostras que continham um baixo número de células de *Prototheca zopfii*. A Análise de Variância e o teste Tukey foram utilizados para avaliar o limite de detecção do método de semeadura para isolamento e para contagem sobre as diferentes cepas de referência. O intervalo de confiança foi de 95%, $p \leq 0,05$.

5) RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras de leite obtidas das cinco mesorregiões do estado de Goiás foram analisadas quanto à presença ou ausência da alga *Prototheca* spp.. Das 473 amostras, em 100% não foi detectada a presença do microrganismo estudado, como ilustrado na Figura 1. Porém, é necessário que se continue analisando o leite dos rebanhos goianos, pois há grande movimentação interestadual de animais, podendo vir animais infectados que podem infectar outros animais do rebanho. Devido a grande importância em saúde pública da *Prototheca zopfii* deve-se ficar em alerta.

Tal resultado foi oposto ao resultado publicado por BUENO et al. (2003), que, em seu trabalho identificaram vacas infectadas por *Prototheca zopfii* no estado de Goiás.

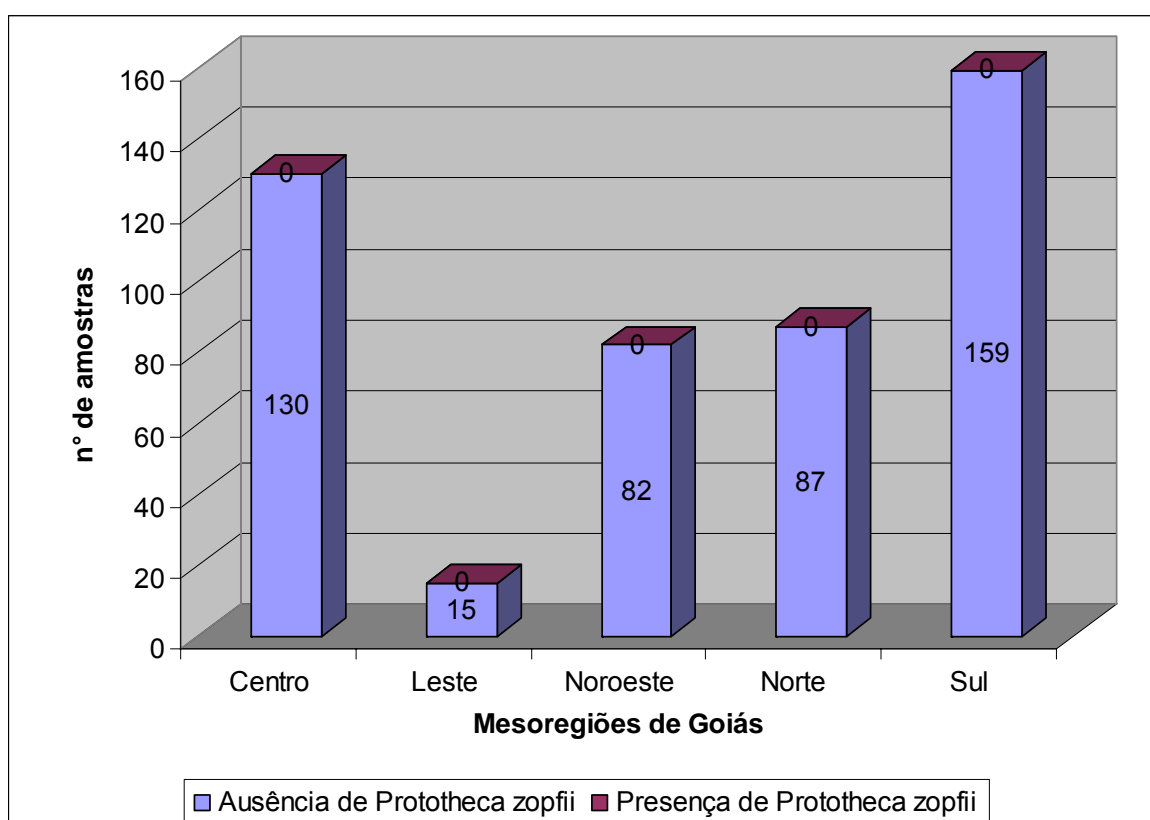


FIGURA 2: Distribuição dos resultados das amostras analisadas nas cinco mesorregiões do estado de Goiás.

Em outros estados a ocorrência de *Prototheca* spp. tem sido frequente, como relataram COSTA et al. (1998a), quando descreveram a prevalência de mastite ambiental em 52 propriedades leiteiras localizadas em 32 municípios dos estados de São Paulo e Minas Gerais, enfocando os principais agentes patogênicos ambientais em 736 casos de mastite bovina. Entre os diferentes microrganismos isolados, a *Prototheca* spp. teve uma participação em 41,2% das infecções. Em outro trabalho, 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%.

Ainda COSTA et al., (1996b) observaram em uma propriedade índices de mastite por *Prototheca* spp de 14,95% nas vacas em lactação e 8,06% em vacas secas. YAMAMURA (2006) em pesquisa realizada na região norte do Paraná encontrou *Prototheca zopffi* em 12,3 % das amostras analisadas, uma prevalência também alta.

Em alguns estados a prevalência é baixa, porém, não deixa de ser preocupante. No estudo de FILIPPSEN et al. (1999) no Paraná, 0,45% das amostras analisadas foram positivas para *Prototheca zopfii*, o que consideramos uma baixa frequência desta alga como agente etiológico da mastite nos rebanhos estudados.

GOMES et al. (1999) isolaram *Prototheca zopfii* de 10 vacas de rebanhos leiteiros situados no Rio Grande do Sul, o que corresponde 4,97% dos animais, considerada uma pequena prevalência, comparada ao percentual de animais com aumento de conteúdo celular somático (95,27%). VAZ et al. (2005) isolaram *Prototheca* spp a partir de oito das amostras de leite de quartos individuais, provenientes de três vacas em Santa Catarina. Todos os quartos relacionados apresentavam apenas a presença da *Prototheca* spp. como patógeno. Por outro lado, MELVILLE (1995) pesquisando amostra de tanque e de vacas individualmente também encontrou baixa porcentagem de vacas acometidas por *P. zopfii*.

Relatos de surtos com elevado número de animais acometidos por *Prototheca* spp. também ocorrem com certa frequência em outros países. HODGES et al. (1985) descreveram um surto na Nova Zelândia com 17 vacas infectadas, de um total de 120. BEXIGA et al. (2003) descreveram o isolamento e

identificação de *Prototheca zopfii* em seis amostras de leite provenientes de quatro vacas com mastite subclínica oriundas de propriedades do litoral-centro de Portugal.

Os resultados obtidos para identificar o limite de detecção do método de cultura da *Prototheca zopfii* em amostras de leite estão descritos na Tabela 1.

TABELA 1 – Médias dos limites de sensibilidade dos métodos de semeadura para isolamento e semeadura para contagem para o crescimento de *Prototheca zopfii* em UFC/mL.

Métodos de Cultura	Cepas de <i>Prototheca zopfii</i>				
	Referência	A	B	C	D
	UFC/mL				
1	5,6x10 ^{2Aa}	1,3x10 ^{2Aa}	1,0x10 ^{3Aa}	2,2x10 ^{3Aa}	3,4x10 ^{3Aa}
2	3,0x10 ^{2Aa}	2,5x10 ^{1Aa}	2,5x10 ^{1Ba}	3,0x10 ^{1Ba}	3,5x10 ^{1Ba}

*Parâmetros estatísticos obtidos pela análise de variância ($S^2e = 0,35$ e $CV = 27,54\%$) e as letras sobrescritas distintas indicam a diferença estatística entre as médias dos tratamentos (Teste Tukey).

^A Nas colunas, médias com letras maiúsculas comuns são equivalentes.

^a Nas linhas, médias com pelo menos uma letra minúscula comum são equivalentes.

1 – Semeadura para isolamento

2 – Semeadura para contagem

De acordo com os resultados descritos na Tabela 1, pode-se dizer que não há diferença significativa ($p > 0,05$) entre as cepas estudadas, mas há diferença significativa ($p < 0,05$) entre os métodos de semeadura para isolamento e semeadura para contagem e identificação de *Prototheca zopfii*. É necessária uma maior concentração de *Prototheca zopfii* no método de semeadura para isolamento para que haja detecção do microrganismo estudado. Este limite variou entre 130 a 3.400 UFC/mL. Na Figura 2 pode-se comparar os dois métodos utilizados com as diferentes cepas.

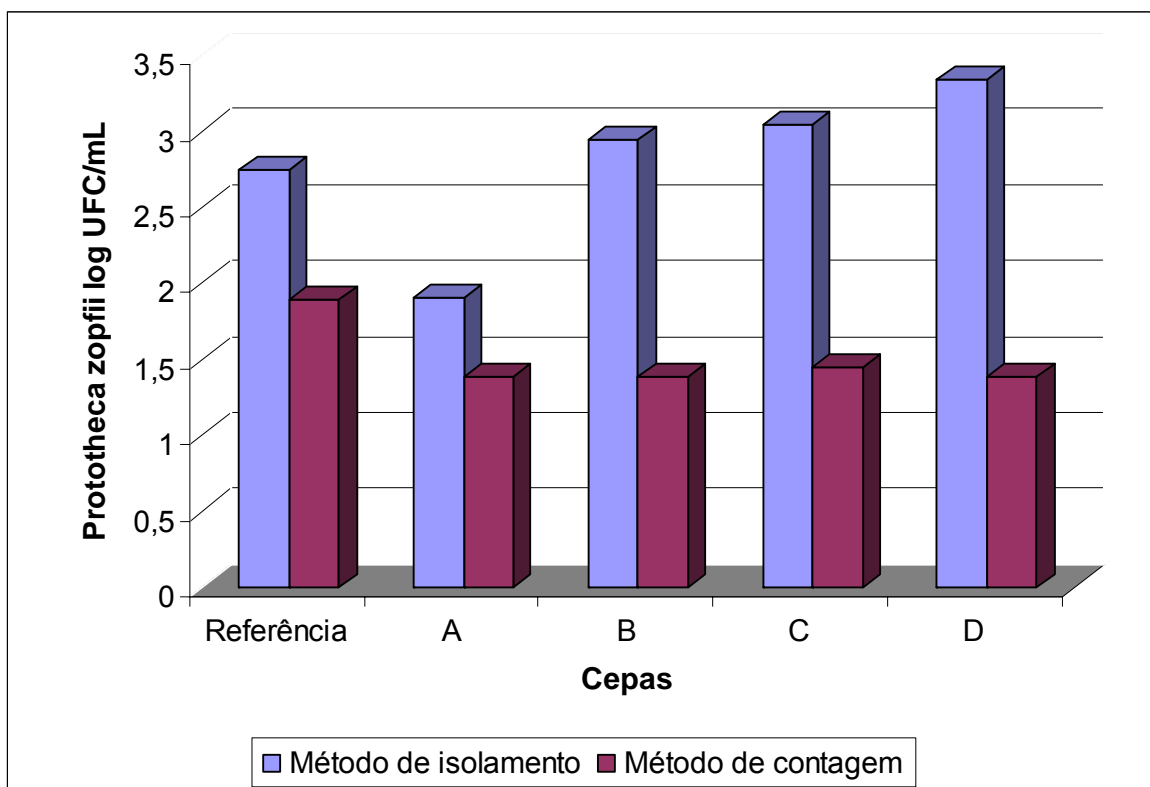


FIGURA 3: Médias dos limites de sensibilidade dos métodos de cultura para crescimento da *Prototheca zopfii*.

No método de semeadura para contagem o limite de sensibilidade variou entre 25 e 300 UFC/mL, sendo então este método mais sensível que o método anterior.

Os resultados obtidos após a incubação das amostras pelo método de semeadura para isolamento mostraram que, com a contagem inicial de 30 UFC/mL, é possível detectar a positividade da amostra, ou seja, o crescimento de pelo menos uma colônia de *Prototheca zopfii*, assegurando-se assim que não pode ter ocorrido falso negativo nas amostras estudadas de leite cru refrigerado. O que se permite concluir a viabilidade de detecção da *Prototheca zopfii* em leites oriundos de tanques de expansão, facilitando assim a coleta das amostras e a realização de novos experimentos, com conseqüente redução dos custos analíticos.

Finalmente, apresenta-se como sugestão aos órgãos de vigilância sanitária, principalmente à Agência Goiana de Defesa Agropecuária – AGRODEFESA, o estabelecimento de critérios para evitar a introdução de animais contaminados no

estado de Goiás, uma vez que a presença da *Prototheca zopfii* no leite causa grandes prejuízos, tanto ao produtor rural, com o descarte precoce de matrizes e de leite, quanto ao setor industrial, com redução do rendimento industrial do leite, além da contaminação dos produtos lácteos.

Com o mercado globalizado e altamente competitivo, barreiras sanitárias serão instrumentos de reserva de mercado, o que exige dos produtos lácteos de Goiás alta qualidade, isentos de qualquer tipo de contaminação, aumentando assim as possibilidades da indústria goiana acessar o mercado internacional e manter-se nele.

6) CONCLUSÕES

Não houve ocorrência de *Prototheca zopfii* no leite cru refrigerado nas propriedades estudadas.

O limite de detecção da *Prototheca zopfii* varia de acordo com o método. O método de semeadura para contagem foi mais eficiente, ou seja, apresentou menor limite de detecção do agente.

A pré-incubação das amostras pelo método de semeadura para isolamento diminuiu o limite de detecção, ou seja, amostras de leite com baixo número de células de *Prototheca zopfii* permitem a obtenção de resultados positivos.

7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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.
2. ALMERAYA, A.P. Aislamento de *Prototheca* em un brote de mastitis bovina. **Veterinária México**, [S.I.], v.25, n.1, p.65-67, 1994.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. BEXIGA, R.; CAVACO, L.; VILELA, C.L. Isolamento de *Prototheca zopfii* a partir de leite bovino. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v.98, n. 545, p.33-37, 2003.
8. BLOWEY, R & EDMONDSON, P. **Mastitis control in dairy herds**. United Kingdom: Farming Press Books, 1995. 196p.
9. BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da União**. Brasília, seção 1, p. 14, 18 set. de 2003.
10. BRITO, M.A.V.P.; VEIGA, M.O. Mastite clínica causada por *Prototheca* spp. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE MEDICINA VETERINÁRIA EM LÍNGUA PORTUGUESA, 6. 1994, Salvador. **Anais...**, Salvador: [s.n.], 1994. p. 225.
11. 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.

12. BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F. **Diagnóstico microbiológico da mastite**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 1999. 26p.
13. BUENO, V.F.F.; NICOLAU, E.S.; MESQUITA, A.J.; RIBEIRO, A.R.; SILVA, J.A.B.; COSTA, E.O.; COELHO, K.O.; NEVES, R.S. Mastite bovina clínica e subclínica, na região de Pirassununga-SP: frequências e redução na produção. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.3, n.2, p.47-52, 2002.
14. BUENO, V.F.F.; MESQUITA, A.J.; NEVES, R.B.S.; MANSUR, J.R.G.; SOUZA, M.A.; RIBEIRO, A.R. Mastite bovina por *Prototheca zopfii* no Estado de Goiás. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 22., 2003, Florianópolis. **Anais eletrônicos...**[CD-ROM], Florianópolis: SBM, 2003.
15. BUENO, V.F.F.; MESQUITA, A.J.; NEVES, R.B.S.; SOUZA, M.A.; RIBEIRO, A.R.; NICOLAU, E.S.; OLIVEIRA, A.N. Epidemiological and clinical aspects of the first outbreak of bovine mastitis caused by *Prototheca zopfii* in Goiás State, Brazil. **Mycopathologia**, Den Haag, v.161, v.3, p.141-145, 2006.
16. BUZZINI, P.; TURCHETTI, B.; FACELLI, R.; BAUDINO, R.; CAVARERO, F.; MATTALIA, L.; MOSSO, P.; MARTINI, A. First large-scale isolation of *Prototheca zopfii* from milk produced by dairy herds in Italy. **Mycopathologia**, Den Haag, v.158, p.427-430, 2004.
17. 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
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. COELHO, K.O. **Impacto dos eventos ocorridos antes e após o parto sobre o desempenho produtivo e reprodutivo da lactação anterior e da posterior de vacas Holandesas**. 2004. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
22. 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.l.], v.33, p.463-470, 2001.

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

24. 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.

25. 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.

26. 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.

27. 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.

28. COSTA, E.O.; MELVILLE, P.A.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T. Relato de um caso de consumo de queijo fresco contaminado por *Prototheca* spp. **Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira**, São Paulo, v.1, n.1, p. 9-10, 1998.

29. 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. **Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira**, São Paulo, ano II, n.6, p.12-16, 1999.

30. 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.

31. 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.

32. 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 à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira**, São Paulo, v.4, n.4, p.6-9, 2001.
33. COSTA, E.O.; RIBEIRO, M.G.; RIBEIRO, A.R.; ROCHA, N.S.; NARDI JÚNIOR, G. Diagnosis of clinical bovine mastitis by fine needle aspiration followed by staining electron microscopy in a *Prototheca zopfii* outbreak. **Mycopathologia**, Den Haag, v.158, p.81-85, 2004.
34. 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.
35. FILIPPSEN, 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.
36. FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo. Lemos Editorial, 2000. 175p.
37. GOMES, M.J.P.; DRIEMEIER, D.; FERREIRO, L. Ocorrência de casos de mastite por *Prototheca zopfii* em bovinos, no de casos de mastite por *Prototheca zopfii* em bovinos, no Rio Grande do Sul. **Napgama**, Ano II, n.4, 1999.
38. GONZÁLEZ, R.N.; BENNETT, G.J.; SICKLES, S.A.; HILAIRE, D.St.; NYDAM, D.V. *Prototheca* mastitis: effect on SCC and SPC. In: PANAMERICAN CONGRESS ON MASTITIS CONTROL AND MILK QUALITY, 1., 1998, Merida. **Proceedings...** Merida: [s.n.], 1998. p.232-235.
39. HARMON, R.J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.77, n.7, p.2103-2112, 1994.
40. 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.
41. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: www.ibge.gov.br. Acessado em: 09 de jun. 2008.
42. JÁNOSI, S.; RÁTZ, F.; SZIGETI, G.; KULCSÁR, M.; KERÉNYI, J.; LAUKÓ, T.; KATONA, F.; HUSZENICZA, G.. Review of the microbiological, pathological and clinical aspects of bovine mastitis caused by the alga *Prototheca zopfii*. **The Veterinary Quarterly**, The Hague, v.23, n.2, p. 58-61. 2001a.
43. 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.

44. 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.

45. KIRK, J; MELLENBERGER, R. Mastitis control program for *Prototheca* mastitis in dairy cows. [on line]. Disponível em: <http://www.vetmed.ucdavis.edu/vetext/INF-DAMastitisControl/prototheca.pdf>
Acesso em 19 mar.2007.

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

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

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

49. 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.

50. 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.

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

52. 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, 1984.

53. 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.

54. MELVILLE, P.A. *Prototheca zopfii*. Importância como agente de mastite e para saúde pública. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES, 3., 1999, Botucatu. **Anais...**, Botucatu: FMVZ-UNESP, 1999. p.43-45.
55. MOTA, R.A.; SÁ, M.E.P.; OLIVEIRA, A.A.F.; SILVA, L.B.G.; SOUZA, M.I. Mastite bovina por *Prototheca zopfii* no Estado de Pernambuco. Brasil. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES, 3., 1999, Botucatu. **Anais...**, Botucatu: FMVZ-UNESP, 1999. p.162.
56. 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.
57. 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.
58. PHILPOT, N.W.; NICKERSON, S.C. **Vencendo a luta contra a mastite**. Piracicaba: Westfalia Surge/Westfalia Landtechnik do Brasil, 2002.188 p.
59. 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.
60. PORE, R.S. Selective medium for the isolation of *Prototheca*. **Applied Microbiology**, [S.l.], v.26, n.4, p.648-649, 1973.
61. PORE, R.S.; BARNETT, E.A.; BARNES JR, W.C.; WALKER, J.D. *Prototheca* ecology. **Mycopathologia**, Netherlands, v.90, p.129-139, 1983.
62. PORE, R.S. *Prototheca* taxonomy. **Mycopathologia**, Netherlands, v.90, p.129-139, 1985.
63. 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.
64. PORE, R.S.; SHAHAN, T.A. *Prototheca zopfii*: natural, transient, occurrence in pigs and rats. **Mycopathologia**, Netherlands, v.101, p.85-88, 1988.
65. RIBEIRO, A. R. **Influência da anti-sepsia pós-ordenha na ocorrência de mastite bovina**. 1996. 124 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
66. RIBEIRO, A. R. **Estudo da mastite bovina causada por microrganismos ambientais: influência do manejo e higiene, sazonalidade e qualidade**

microbiológica da água. 2001. 138f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

67. ROESLER, U.; HOLGER, S.; HENSEL, A. Immunodiagnostic identification of dairy cows infected with *Prototheca zopfii* at various clinical stages and discrimination between infected and uninfected cows. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v.39, n.2, p.539-543, 2001.

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

69. 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.

70. SUDMAN, M.S. Protothecosis: a critic review. **American Journal of Clinical Pathology**, [S.I.], v.61, p.10-19, 1974.

71. 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.

72. 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.

73. TENHAGEN, B.A.; HILLE, A.; SCHMIDT, A.; HEUWIESER, W. Shedding patterns and somatic cell counts in milk from quarters chronically infected with *Prototheca* spp. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, Hannover, v.112, n.2, p. 44-48, 2005.

74. 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.

75. VAZ, A.K.; CARNEIRO, D.M.V.F.; DICK, W.; LUCIANO, A.M. Mastite bovina por *Prototheca* sp. Em Santa Catarina: Relato de caso. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v.4, n.1, p. 72-75, 2005

76. 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.

77. YAMAMURA, A.A.M.; SHIMADA, M.K.; MÜLLER, E.E.; FREITAS, J.C.; GIORDANOPRETO, 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.

78. YAMAMURA, A. A. M. **Fatores predisponentes associados à mastite bovina causada por *Prototheca zopfii***. 2006. 69f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2006.

ANEXOS

Tabela 2. Análise de Variância da interação dos métodos de semeadura para isolamento e semeadura para contagem com as cepas analisadas.

	GL	SQ	QM	F	Fcrítico
Métodos	1	8,383252	8,383252	23,93367	3,48
Cepas	4	1,338658	0,334665	0,955447	
Métodos x cepas	4	1,375784	0,343946	0,981944	
Resíduo	10	3,502703	0,35027		
Total	19	14,6004			

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = Fcalculado.