

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**MASTITE BOVINA: AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO LEITE, COM  
ÊNFASE NAS LEVEDURAS ISOLADAS DE CASOS DE MASTITE CLÍNICA E  
SUBCLÍNICA, NA REGIÃO DO PLANALTO MÉDIO-RS, EM 2005 E 2006.**

**ELSIO AUGUSTO WUNDER JÚNIOR**

**PORTO ALEGRE  
2007**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**MASTITE BOVINA: AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO LEITE, COM ÊNFASE NAS LEVEDURAS ISOLADAS DE CASOS DE MASTITE CLÍNICA E SUBCLÍNICA, DA REGIÃO DO PLANALTO MÉDIO-RS, EM 2005 E 2006.**

Autor: Elsio Augusto Wunder Júnior

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de Microbiologia Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Laerte Ferreiro  
Co-orientadora: Profa. Dra. Patrícia Valente

**PORTO ALEGRE  
2007**

## FOLHA DE APROVAÇÃO

ELSIO AUGUSTO WUNDER JÚNIOR

MASTITE BOVINA: AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO LEITE, COM ÊNFASE NAS LEVEDURAS ISOLADAS DE CASOS DE MASTITE CLÍNICA E SUBCLÍNICA, DA REGIÃO DO PLANALTO MÉDIO-RS, EM 2005 E 2006.

Aprovada em 30 JAN 2007

APROVADO POR:

---

Dr. Laerte Ferreiro  
Orientador e Presidente da Comissão

---

Dr. Eduardo César Tondo  
Membro da Comissão

---

Dra. Maira Balbinotti Zanela  
Membro da Comissão

---

Dr. Mário Carlos Araújo Meireles  
Membro da Comissão

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Laerte Ferreiro, por sua amizade, paciência, pelas oportunidades oferecidas e confiança empregada.

Agradeço a amiga Andréia Spanamberg, pela colaboração de extrema importância, assim como a minha co-orientadora Patrícia Valente.

Agradeço aos meus sempre ilustres mestres J. J. Bangel e Joaquim C. T. Fernandes.

Agradeço aos amigos, principalmente ao irmão Felipe Cardoso, pelos mates e conversas nas horas certas.

Agradeço a minha família, que suporta essa longa jornada desde o início.

E finalmente, mas de extrema importância, agradeço a minha amiga e esposa, Aline A. Jacometti, pela sua generosidade, paciência, atenção e amor dedicados a mim, sem os quais seria quase impossível chegar onde estou.

## RESUMO

A mastite bovina é comprovadamente um dos maiores problemas atuais da pecuária leiteira no Brasil e no mundo, acarretando ônus aos produtores, à indústria e ao consumidor final. Foram analisadas 240 amostras de leite proveniente de animais com mastite clínica e de animais com mastite subclínica, criados em propriedades leiteiras de alta produção, da região do Planalto Médio, Rio Grande do Sul. Houve isolamento de 250 agentes bacterianos em 218 amostras (90,8%) e 65 agentes leveduriformes em 39 amostras (16,25%). Foram identificados 10 gêneros e 12 espécies de bactérias, sendo os gêneros *Staphylococcus*, *Corynebacterium* e *Nocardia* responsáveis por 88% dos isolados. Foram identificados 08 gêneros (29 espécies) de leveduras além de 02 gêneros de fungos semelhantes a leveduras (04 espécies), sendo os gêneros *Candida*, *Pichia*, *Cryptococcus* e *Rhodotorula* responsáveis por 80% das espécies isoladas. Apenas 03 amostras apresentaram crescimento puro de leveduras, o restante estando associado com isolamentos bacterianos, o que demonstra uma importante relação entre fungos e bactérias na etiologia das mastites. Mais de 90% dos agentes leveduriformes isolados tiveram crescimento em temperaturas acima de 37°C, demonstrando seu potencial patogênico. Verificou-se que a prevalência de mastite fúngica na região é significativa e fortemente relacionada com a presença de agentes bacterianos, o tratamento inadequado com produtos antimicrobianos e a saúde do úbere.

## **ABSTRACT**

*The bovine mastitis is one of the largest problems of dairy herds in Brazil and all over the world, resulting in losses to producers, to the industry and to the final consumer. High production dairy herds were analyzed in Planalto Médio, Rio Grande do Sul, were 240 samples with clinical and subclínica mastitis were collected. There was the isolation of 250 bacterial agents in 218 samples (90,8%) and 65 yeast organisms in 39 samples (16,25%). There was identification of 10 genera and 12 species of bacteria, and 88% of the isolates were from genera Staphylococcus, Corynebacterium and Nocardia. There was the identification of 08 genera (29 species) of yeasts and 02 genera of yeast-like organisms (04 species), and 80% of the isolates were from genera Candida, Pichia, Cryptococcus and Rhodotorula. Only 03 samples presented pure growth of yeasts, the remaining was associated with bacterial isolations, which demonstrates an important relationship between yeasts and bacteria in the etiology of the mastitis. More than 90% of the yeast isolates had growth in temperatures above 37°C, which demonstrates their pathogenic potential. It was verified that in this particularly region, the occurrence of mastitis caused by yeasts has a significant importance and are closely related with the bacterial agents' presence, the inadequate treatment with antibiotic products and udder's health.*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 -</b>	Mapa do estado do Rio Grande do Sul, com destaque para a mesorregião noroeste.....	24
<b>Figura 2 -</b>	Distribuição porcentual dos principais agentes isolados durante o período do estudo, comparado com o tipo de mastite.....	38
<b>Figura 3 -</b>	Relação dos agentes mais isolados com a sensibilidade aos antimicrobianos utilizados no teste de TSA.....	40
<b>Figura 4 -</b>	Comparação dos principais gêneros de leveduras isolados, de acordo com o quadro de mastite identificada.....	44
<b>Figura 5 -</b>	Comparação dos principais gêneros microbianos isolados de acordo com o quadro de mastite clínica ou mastite subclínica.....	45
<b>Figura 6 -</b>	Tendência do isolamento bacteriano e micótico conforme o quadro de mastite.....	46

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Total de amostras estudadas, distribuídas de acordo com o tipo de mastite e o número percentual de amostras com algum crescimento microbiológico nos meios de ágar sangue, ágar MacConkey e/ou YM.....	35
<b>Tabela 2</b>	Distribuição das amostras que apresentaram crescimento bacteriano e micológico com o respectivo percentual, de acordo com o tipo de mastite.....	36
<b>Tabela 3</b>	Distribuição porcentual dos agentes isolados nas amostras de leite provenientes de animais com diagnóstico de mastite clínica.....	37
<b>Tabela 4</b>	Distribuição porcentual dos agentes isolados nas amostras de leite provenientes de animais com diagnóstico de mastite subclínica.....	37
<b>Tabela 5</b>	Distribuição porcentual dos agentes isolados nas amostras de leite que apresentaram mastite subclínica, de acordo com a classificação das mastites conforme CMT.....	38
<b>Tabela 6</b>	Quantidade de isolados fúngicos de acordo com a espécie e a classificação dos casos de mastite.....	41
<b>Tabela 7</b>	Distribuição dos gêneros identificados de acordo com a classificação dos casos de mastite.....	42
<b>Tabela 8</b>	Espécies de leveduras isoladas em 03 amostras onde não ocorreu crescimento bacteriano.....	43

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	12
<b>2.1</b>	<b>Mastite fúngica</b> .....	15
<b>2.1.1</b>	Etiologia.....	16
<b>2.1.2</b>	Incidência.....	17
<b>2.1.3</b>	Epidemiologia.....	18
<b>2.1.4</b>	Sinais Clínicos, Patogenia e Patologia.....	19
<b>2.1.5</b>	Diagnóstico.....	21
<b>2.1.6</b>	Tratamento e Controle.....	22
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	24
<b>3.1</b>	<b>Amostras de leite</b> .....	24
<b>3.2</b>	<b>Procedimentos laboratoriais para bacteriologia</b> .....	25
<b>3.2.1</b>	Isolamento.....	25
<b>3.2.2</b>	Identificação e Classificação.....	26
<b>3.2.3</b>	Teste de Suscetibilidade a Antimicrobianos (TSA).....	26
<b>3.3</b>	<b>Procedimentos laboratoriais para micologia</b> .....	27
<b>3.3.1</b>	Isolamento.....	27
<b>3.3.2</b>	Manutenção das Culturas.....	28
<b>3.3.3</b>	Identificação Fenotípica.....	28
3.3.3.1	Características Morfológicas Coloniais.....	29
3.3.3.2	Características Morfológicas da Célula Leveduriforme.....	29
3.3.3.3	Verificação de Formação de Ascosporos.....	29
3.3.3.4	Produção de Clamidosporos.....	29
<b>3.3.4</b>	Testes Bioquímicos.....	30
3.3.4.1	Teste de Fermentação.....	30
3.3.4.2	Teste de Assimilação de Fontes de Carbono.....	31
3.3.4.3	Teste de Assimilação de Fontes de Nitrogênio.....	31
<b>3.3.5</b>	Testes Fisiológicos.....	32
3.3.5.1	Teste de Produção de Urease e Reação ao DBB.....	32
3.3.5.2	Teste de Crescimento em Diferentes Temperaturas.....	33
3.3.5.3	Teste de Tolerância ao NaCl 10% e 16%.....	33
3.3.5.4	Teste de Tolerância à Glicose 50%.....	33

<b>3.4</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>34</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
<b>4.1</b>	<b>Análise Bacteriológica.....</b>	<b>36</b>
<b>4,2</b>	<b>Análise Micológica.....</b>	<b>40</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>47</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>60</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>62</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Segundo levantamento da produção científica brasileira sobre mastite bovina (BRITO et al., 1996), a parte relativa à identificação dos agentes etiológicos da mastite já vem sendo efetuada desde longa data em diversas bacias leiteiras, como pode ser verificado através de diversas publicações (LANGENEGGER et al., 1970; HARROP et al., 1975; FERREIRO et al., 1981; FERREIRO et al., 1985; NADER FILHO et al., 1985; LANGONI et al., 1991; COSTA et al., 1995; BRITO et al., 2001; SANTOS et al., 2005; COSTA et al., 1993).

Entretanto, nas duas últimas décadas, os critérios para a definição da qualidade do leite cru mudaram consideravelmente para atender demandas da indústria e dos consumidores. De acordo com Korhonen (1997) essas mudanças podem ser atribuídas a vários fatores: condições de produção de leite na propriedade rural; tecnologias usadas no processamento do leite; demandas do consumidor por alimentos mais saudáveis; mudanças nos padrões nacionais e internacionais e nas legislações relacionadas aos produtos lácteos e o desenvolvimento de procedimentos e métodos laboratoriais.

As demandas citadas visam especialmente adequar os produtos lácteos aos requisitos de segurança dos alimentos e de qualidade exigidos para o consumo humano, o rendimento industrial e as exigências do consumidor, que determina em última análise, o sucesso da indústria como um todo. Segundo Heeschen et al. (1996), esses requisitos devem ser atendidos pelo leite cru, pois nenhum processamento industrial é suficiente para melhorar o leite se ele não tem qualidade.

A exploração de bovinos com aptidão leiteira vem crescendo, nas últimas décadas, em todo o país. Como referência, o norte do Rio Grande do Sul tem se estabelecido como uma região de alta produção de leite bovino, reunindo propriedades de grande destaque, favorecendo a vinda de grandes indústrias para a região.

Buscando sempre uma melhor qualidade e o aumento da produção, investimentos, principalmente em genética, sanidade e alimentação, são fatores determinantes. Porém, aumentar produção consiste não somente em aumentar o número de animais, mas, essencialmente, aumentar a produtividade individual. E com isto, surgem os problemas, muitas vezes inevitáveis, como a mastite.

Reconhecidamente uma doença mundial, de grande importância econômica, mas também de saúde pública, a mastite ainda hoje é um dos principais fatores que interferem na produção e, principalmente, na qualidade do leite e de todo e qualquer produto derivado.

Sabe-se que as bactérias são os principais agentes envolvidos nas causas de mastite infecciosa. Porém, o uso indiscriminado de produtos antimicrobianos, sem controle e sem orientação, assim como o estresse a que são submetidos os animais de alta produção atualmente, leva a ocorrência de casos de mastite por agentes não usuais, como algas, bactérias filamentosas, fungos e leveduras.

Este trabalho tem como objetivo avaliar amostras de leite provenientes de animais com mastite clínica e de animais com mastite subclínica, de diferentes propriedades do Planalto Médio, no Rio Grande do Sul, identificando os principais agentes envolvidos, utilizando-se meios específicos para o isolamento bacteriano e fúngico.

Espera-se que as informações obtidas possam esclarecer a prevalência da mastite na região, assim como no Estado, e ajudar a determinar qual o enfoque que se deve dar para a mastite bovina no futuro.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A mastite bovina representa um dos maiores entraves, senão o principal, à exploração leiteira em todo o mundo. É uma das doenças infecciosas que mais recursos financeiros têm mobilizado para o seu estudo e, ainda assim, devido à complexidade do problema, segue a merecer contínua prioridade (FERREIRO 1978).

É uma doença de alta frequência em rebanhos leiteiros e a que mais onera a produção. As perdas econômicas são causadas tanto em nível de fazenda, pela diminuição na produção de leite, custo com mão-de-obra, honorários profissionais, medicamentos, morte ou descarte precoce de animais (HARMON, 1998), como em nível de laticínios, pela queda na qualidade do produto final, diminuição no rendimento industrial para a fabricação dos seus derivados, alterações na composição do leite afetado e resíduo de antimicrobianos (SCHÄELLIBAUM, 2000; SANTOS, 2001; RUEGG, 2003). Estas perdas acabam sendo indiretamente transmitidas também aos consumidores (LANGONI, 1999; NMC 1999).

Mastite é uma inflamação da glândula mamária, uma resposta do úbere com o objetivo de destruir ou neutralizar o agente infeccioso e suas toxinas, permitindo à glândula voltar com suas funções normais. A infecção pode também ser causada por agentes irritantes, tóxicos ou trauma, mas são raras. O agente infeccioso invade o úbere, se multiplica no tecido glandular e sintetiza toxinas que são as causas imediatas da doença (NMC, 1999).

A infecção pode se apresentar de duas formas: a mastite clínica, onde os sinais de anormalidade do úbere e secreções são rapidamente observados na presença de flocos no leite, aparência aquosa, edema glandular e aumento da temperatura do úbere; e mastite subclínica, onde não há uma mudança visualmente detectável no úbere e no

leite, sendo diagnosticada por testes microbiológicos ou pela presença de células inflamatórias em testes como o Califórnia Mastite Teste (CMT), executado segundo Fernandes et al. (1967). Esta última é a forma mais prevalente de mastite, além de ser a que mais causa perdas na produção de leite, pela redução da produção por um maior período de tempo (NMC, 1999; RUEGG, 2003).

Como toda enfermidade, a mastite bovina é multifatorial, resultando da interação entre agente etiológico, meio ambiente e hospedeiro susceptível (ANDERSON, 1979).

Segundo Amaral (1999), a mastite bovina apresenta basicamente dois modelos epidemiológicos fundamentados no momento da infecção: a mastite contagiosa, que ocorre no momento da ordenha, e a mastite ambiental que ocorre no intervalo entre as ordenhas.

Os agentes causadores de mastite incluem bactérias e agentes não bacterianos, como micoplasmas, fungos, leveduras e clamídias. Em geral, infectam o úbere pelo canal do teto (ducto papilar), única abertura para o exterior e o primeiro mecanismo de defesa da glândula mamária (RADOSTITS et al, 1994).

A invasão microbiana na glândula mamária ocorre via canal do teto e é mais freqüente no período não lactante. O mecanismo utilizado pelos microrganismos para atravessarem o canal do teto, não é totalmente compreendido. Porém, os organismos na pele do teto e na porção distal do canal do teto, estão em excelente posição para invadirem essa barreira. Entre os períodos de ordenha e especialmente durante o período não lactante, a pressão intramamária é elevada, tendendo a dilatar a porção proximal do canal do teto, diminuindo sua capacidade de fechamento e, portanto, de defesa (McDONALD, 1970).

Segundo Wilson et al. (1997), a mastite bovina, definida pelo isolamento do agente etiológico, é relativamente comum, muito mais freqüente do que muitos

produtores acreditam. Num estudo feito na década de 90, com mais de 100.000 animais dos Estados de Nova Iorque e Pensilvânia, nos EUA, a prevalência da mastite foi perto dos 50%.

Numa pesquisa recente feita com amostras do Rio Grande do Sul, houve prevalência de *Corynebacterium* sp. (19,5%), *Staphylococcus* sp. coagulase positiva (16,95%) e *Streptococcus* sp. (14,97%) sendo que 26,53% das amostras foram negativas (WUNDER *et al.*, 2003). Na década de 1970, Fernandes *et al.* (1973) isolou 45,26% de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva e 12,16% de *Streptococcus* sp., porém nenhum isolamento de *Corynebacterium* sp. foi feito.

Segundo Fernandes *et al.* (2001), num levantamento feito desde 1972, em 19.113 amostras de leite com mastite de municípios do Rio Grande do Sul, a maior prevalência de microorganismos isolados no leite nas 8.848 amostras com crescimento, foi de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva (30,1% das amostras), *Corynebacterium bovis* (22,5%), *Staphylococcus epidermidis* (13,1%) e *Streptococcus agalactiae* (14,2%) além de isolados de *Prototheca zoopfi*, *Nocardia asteroides*, *Candida albicans* dentre outros. O detalhe interessante do trabalho foi o grande número de amostras negativas, 10.265 (53,7%), o que pode ser interpretado como mastite causada por agentes irritantes ou trauma. Porém, segundo Schalm (1971), as células de defesa do organismo, no início da resposta imune, fagocitam um grande número de antígenos, a ponto de que eles não sejam encontrados em uma quantidade suficiente para isolamento. E existem ainda agentes microbianos de características fastidiosas como: *Mycoplasma* spp., *Brucella* spp., *Leptospira* spp., *Nocardia* spp., *Prototheca* spp., *Ureaplasma* spp., *Campylobacter* spp., *Mycobacterium* spp., dentre outros agentes fúngicos e bacterianos. (NMC, 1999; PIANTA, 1999; METTIFOGO, 1999, CABRAL, 1999; PINHEIRO, 1999; GOMES *et al.*, 1999).

## 2.1 Mastite fúngica

Fungos são organismos comuns na natureza, presentes na água, na terra e no ar. O crescimento destes microrganismos pode determinar doenças infecciosas ou tóxicas, em vegetais e animais, incluindo o homem. A simples presença do fungo não é fator determinante de doença, a qual depende da relação parasita/hospedeiro. Os reservatórios habituais dos fungos que infectam o homem e o animal pode ser o próprio homem e o animal, ou um sítio da natureza onde o fungo desenvolve-se como saprófita. Dentre as manifestações clínicas em animais às quais os fungos podem estar associados, citam-se as mastites micóticas ou fúngicas (RUZ-PERES et al., 2004).

A mastite fúngica é muito comum em rebanhos leiteiros de bovinos e caprinos. As leveduras são a maior causa deste tipo de mastite e sua incidência elevou-se com o advento da terapia antibacteriana intramamária durante a década de 50 e 60. (HAGAN AND BRUNER'S, 1981).

Segundo Tucker (1954) as mastites fúngicas já eram reconhecidas por anos, mas a incidência era muito baixa até meados de 1948. Neste mesmo trabalho, o autor analisa alguns casos de mastite e descreve organismos morfológicamente semelhantes com *Candida* sp. como sendo os responsáveis pela enfermidade, além de alertar que estes organismos são refratários aos fármacos freqüentemente empregados e que em geral são introduzidos no úbere no momento de um tratamento inadequado.

As leveduras são microrganismos que podem ser encontrados em uma grande variedade de substratos como solo, plantas e água. Muitos destes organismos são oportunistas e incluem-se como fonte de infecção à pele do úbere, secreção do úbere, mão do ordenhador, ordenhadeira, chão, palha, alimento, poeira, solo, medicamentos e soluções desinfetantes (RICHARD et al., 1980).

A mastite fúngica é descrita normalmente após tratamento com antimicrobianos via intramamária, sem a verificação microbiológica do quarto afetado ou com soluções feitas artesanalmente. Considerando a prática disseminada de utilização de antimicrobianos não específicos pelo produtor e muitas vezes pelo próprio veterinário, é provável que aumentem os casos de mastite causada por fungos (RICHARD *et al.*, 1980).

Os primeiros relatos de mastite fúngica remontam ao final do século 19 e início do século 20. Entre os anos de 1934 e 1950, diversos fungos foram isolados de animais com mastite, porém com baixa incidência. Durante a década de 50 e 60, relatos de mastite induzida por leveduras e a identificação das espécies envolvidas, tornou-se comum (FARNSWORTH, 1977).

No Brasil, o primeiro isolamento descrito foi em 1974, *Cryptococcus laurentii*, de uma vaca com mastite crônica resistente ao tratamento com várias drogas. Junto, foram isoladas culturas de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva e *Staphylococcus* sp. (MINAMI *et al.* 1974).

### 2.1.1 Etiologia

As de leveduras têm sido descritas, em diversos países, como causadoras de mastite (KRUKOWSKI *et al.*, 2000) e a grande maioria dos isolados pertencem aos gêneros *Candida*, *Cryptococcus* e *Trichosporon*, porém muitos outros gêneros como *Pichia*, *Debaryomyces*, *Geotrichum* e *Rhodotorula*, também podem estar presentes (LAGNEAU *et al.*, 1996; LANGONI *et al.*, 1997; CHAHOTA *et al.*, 2001; RUZPERES *et al.*, 2004).

A mastite causada por fungos filamentosos é menos freqüente. Ferreiro *et al.* (1989) descreveram um caso de mastite no Rio Grande do Sul causado pelo fungo

*Aspergillus fumigatus*. Este agente tem sido descrito em alguns casos, particularmente na Europa. O fungo *Pseudallescheria boydii* também tem sido descrito, além do aumento de casos relacionados com a bactéria filamentosa *Nocardia* sp. (HOWARD AND SMITH, 2003).

### 2.1.2 Incidência

A prevalência da mastite micótica é de aproximadamente 1% a 12% do total de mastites de origem infecciosa. Em alguns rebanhos esse número pode aumentar em surtos quando, em geral por motivos de manejo, a maioria das vacas em lactação é afetada (KRUKOWSKI et al., 2003).

Em geral, a incidência de mastite causada por fungos é, normalmente, baixa em países como os Estados Unidos, variando de 2 a 7%. Porém, em países tropicais, caso do Brasil, essa porcentagem pode ser mais elevada (LAGNEAU et al., 1996). Em um estudo recente realizado no estado de São Paulo (SANTOS et al., 2005) com o objetivo de determinar a prevalência das leveduras nos casos de mastite, foi isolado algum gênero fúngico em 25,4% do total das amostras, sendo que um total de 09 espécies diferentes de *Candida* sp. foram encontradas em 17,3% das amostras analisadas.

Ferreiro (1978) observou que num estudo feito no estado de São Paulo (CAMPEDELLI et al., 1977), onde os autores encontraram 20% de mastite causada por leveduras, uma porcentagem razoavelmente alta, as amostras foram semeadas, como rotina, em Agar Sabouraud glicose, além dos meios de Ágar Sangue e MacConkey, o que explicaria a alta taxa de isolamentos e reforçando a tese de que, nos estudos posteriores, deveria ser dada maior atenção às leveduras como agentes causadores de mastite.

### 2.1.3 Epidemiologia

Como todas as mastites, as causadas por fungos são influenciadas por fatores de manejo. Dois aspectos da rotina diária são particularmente importantes: (1) higiene de ordenha e (2) uso de agentes antimicrobianos, especialmente por via intramamária (HOWARD AND SMITH, 2003).

A inadequada higiene de ordenha permite a passagem de agentes causadores de mastite de uma glândula para outra, convertendo uma doença basicamente esporádica numa doença transmissível de grandes proporções epidemiológicas. A mastite micótica, quando um problema de rebanho, está relacionada com a ordenha e outras práticas envolvendo rápido e sucessivo contato dos quartos com pessoas ou equipamentos capazes de agirem como veículos de transmissão. Alimentos com alta contaminação por fungos também podem levar a problemas de rebanho (HOWARD et al, 2003; RUZPERES et al., 2004).

O uso de drogas antimicrobianas pode interferir na incidência e disseminação da mastite de duas maneiras; proporcionar o meio de entrada dos esporos fúngicos na glândula, pois estes são abundantes no meio ambiente, incluindo a pele do úbere, além do que, leveduras têm sido encontradas em preparações de antimicrobianos recentemente abertos, sugerindo contaminação na sua fabricação. Alguns antimicrobianos são suspeitos de estimular crescimento fúngico e deprimir alguns mecanismos de defesa do hospedeiro. Por exemplo, as tetraciclínas são descritas como tendo os dois efeitos com relação à *Candida albicans*. Em geral, as circunstâncias que envolvem um surto de mastite micótica freqüentemente incluem tratamento com antimicrobianos por via intramamária, mas a contaminação alimentar também está implicada. Num estudo recente, provou-se que mastite causada pelo gênero *Candida*

independe de fatores como imunossupressão e tratamento prévio com antimicrobianos (HOWARD AND SMITH, 2003).

Leveduras podem colonizar o canal do teto e/ou o teto e cisternas da glândula sem causar doença. Se uma mastite bacteriana ocorre, estas leveduras podem multiplicar e invadir o parênquima afetado, causando uma mastite secundária. É provável que bactérias comensais do úbere inibam a multiplicação destas leveduras e sua remoção por antimicrobianos é um fator importante na sua multiplicação. Isto é o que ocorre na candidíase oral em humanos, e pode explicar a infecção que surge após tratamento intramamário quando o agente não é identificado no produto ou na cânula de aplicação (FARNSWORTH, 1977; COSTA et al., 1993).

Num estudo realizado em caprinos, mostrou-se que os blastoconídeos/clamidosporos do gênero *Candida*, em casos crônicos de mastite, encontram-se em grande parte dentro de macrófagos (SINGH et al., 1998).

#### **2.1.4** Sinais Clínicos, Patogenia e Patologia

A mastite causada por fungos produz praticamente as mesmas manifestações clínicas que outros agentes, portanto é difícil estabelecer diagnóstico baseado nestas informações (STANOJEVIC et al., 2003). Redução do fluxo de leite, inchaço e maior firmeza da glândula afetada são observados, juntamente com diversas anormalidades na aparência do leite e resultados positivos no CMT. Podem ocorrer picos febris, não relacionados com disseminação fúngica. O grau de severidade da doença e sua duração estão relacionados com o número de organismos que penetram a glândula, o gênero do fungo envolvido e sua capacidade de crescer a 37 - 40°C (HOWARD AND SMITH, 2003).

A patogenicidade das leveduras não é muito documentada nas espécies animais. A grande maioria é considerada saprófita, porém, em alguns casos são considerados patógenos potenciais (CHENGAPPA et al., 1984).

Num estudo experimental feito com *Candida krusei* em bovinos, verificou-se que entre 10.000 a 20.000 organismos ocasionaram em uma mastite clínica leve, sendo que 5.000.000 ou mais produziram uma mastite clínica severa com alta temperatura e efeitos sistêmicos, o que levou a conclusão de que a infecção e sua severidade podem estar relacionadas com a quantidade do agente envolvido (FARNSWORTH et al., 1974).

A infecção do úbere por *Cryptococcus* sp. e *Nocardia* sp. causa uma mastite clínica severa, caracterizada por inchaço inicial do quarto, picos febris, inapetência e queda brusca na produção, que pode continuar indefinidamente (FARNSWORTH, 1977). Porém, a mastite fúngica mais severa descrita é causada pelo *Cryptococcus neoformans*, que pode se estender por semanas e meses, levando a supressão completa de fluxo de leite e causando efeitos permanentes na produção da glândula afetada, quando o parênquima glandular é substituído por tecido de granulação e muitos animais acabam tendo que ser sacrificados (INNES et al., 1952). Em contraste, infecções por outros agentes, especialmente leveduras (*Candida* spp.), em número suficiente, são menos severas e causam inflamação local, inchaço, febre, queda na produção de leite e um grande aumento na contagem de leucócitos no leite, porém a maioria é autolimitante em 1-2 semanas e as funções do úbere retornam ao normal. Em estudos feitos em surtos, foi encontrada uma grande quantidade de animais afetados, mas clinicamente saudáveis, mesmo quando *C. neoformans* estava presente (HOWARD AND SMITH, 2003).

A mastite causada por *Aspergillus fumigatus* caracteriza-se por hemorragias e necroses no parênquima, curso progressivo ou crônico, com nódulos disseminados pelo parênquima, freqüentemente envolvidos por cápsula fibrosa. Os linfonodos

supramamários estão normalmente envolvidos, podendo haver disseminação via hematogena, ocasionando uma micose sistêmica (FERREIRO et al., 1989). Mastite por *Prototheca* spp., embora podendo ser aguda ou crônica, também segue um curso progressivo e irreversível, que leva à destruição da glândula afetada (RANJAN et al., 2006).

Vacas que se recuperaram clinicamente de uma mastite por *Candida* spp. podem continuar a eliminar o organismo por até 08 meses após a infecção (FARNSWORTH, 1977).

### 2.1.5 Diagnóstico

Na falta de critérios clínicos específicos, demonstrar o agente causador por exames diretos e/ou cultura é um requerimento para estabelecer um diagnóstico de mastite micótica (HOWARD AND SMITH, 2003). Testes, como o CMT, não são suficientes para se estabelecer diagnóstico, pois são baseados em reações indiretas de inflamação. Portanto, para um diagnóstico sensível e seguro, a utilização das técnicas de isolamento, com os meios adequados, é imprescindível para o diagnóstico destas mastites (STANOJEVIC et al., 2003).

Alguns autores relataram que 2% das vacas com úberes clinicamente normais podem eliminar organismos leveduriformes no leite (FARNSWORTH et al., 1974). Além disso, agentes fúngicos são facilmente encontrados no meio ambiente, na pele e mesmo no canal do teto (SANTOS et al., 2005). Sendo assim, o isolamento destes no leite não é prova da sua importância epidemiológica no caso de mastite. A presença de uma única espécie de levedura em grande número e com bom crescimento a 37°C, são critérios úteis no diagnóstico. Muitas vezes o histórico do rebanho pode ajudar: práticas

de manejo e tratamento prévio e repetido com antimicrobianos por via intramamária, sem sinais de cura (HAGAN AND BRUNER'S, 1981).

Em geral o leite deve ser semeado tanto em Agar Sangue como em Agar Sabouraud à 37°C. O crescimento das células leveduriformes, em Agar Sangue é mais lento, com relação às bactérias, sendo que o crescimento destas últimas obscurece o crescimento lento dos agentes fúngicos. Sendo assim é necessária a adição de antimicrobianos no meio de Sabouraud. Subseqüente identificação das leveduras isoladas é baseada em características como: cor da colônia, assimilação de açúcar e formação de clamidoconídeo, blastoconídeo e artroconídeo (HAGAN AND BRUNER'S, 1981).

#### **2.1.6 Tratamento e Controle**

Apesar da grande maioria das leveduras serem sensíveis a nistatina, anfotericina e 5-fluorouracil, o tratamento é sem sucesso. Por este motivo, nenhum produto intramamário à base de antifúngicos foi aprovado nos EUA. Além disso, todos os antifúngicos mencionados acima são tóxicos tanto no uso local na glândula como de forma sistêmica, podendo causar mais danos que o próprio agente (HOWARD AND SMITH, 2003; HAGAN AND BRUNER'S, 1981).

Muitos casos se resolvem espontaneamente em 2-4 semanas até 02 meses, porém alguns podem causar danos irreversíveis ao quarto afetado (FARNSWORTH, 1977; STANOJEVIC et al., 2003).

O controle é feito com base na adequação dos tratamentos intramamários e atenção aos ferimentos de teto. Secagem de quartos afetados e uma adequada higiene de ordenha irão reduzir a exposição (FARNSWORTH, 1977).

Outra grande importância da mastite bovina é sua relevância na saúde pública. Muitos agentes causadores de mastite são fontes de infecção também para o homem, tanto pelas toxinas produzidas por algumas bactérias bem como por agentes de caráter zoonótico (LANGONI, 1999).

Diante de todos estes fatos, o diagnóstico tem um papel fundamental nesta enfermidade, a fim de se obter informações mais efetivas sobre a doença e principalmente para se estabelecer um controle adequado. A verificação da prevalência desses agentes na pecuária leiteira gaúcha, vem de encontro com o fato de que muitos casos de mastite não são diagnosticados, considerando-se que em grande parte dos estudos não são utilizados meios específicos para isolamento micológico. Sendo assim, uma relevante porcentagem das amostras consideradas negativas, pode estar sendo erroneamente negligenciada.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Amostras de Leite

Estudou-se um total de 240 amostras de leite, provenientes de 28 propriedades leiteiras, com animais de alta produção, com média de 25 litros por animal, da região do Planalto Médio do Estado do Rio Grande do Sul, mesorregião do noroeste do estado (**Figura 1**), coletadas no período de janeiro de 2005 a junho de 2006.



Figura 1 – Mapa do estado do Rio Grande do Sul, com destaque para a mesorregião noroeste.

Todas as amostras enviadas apresentavam diagnóstico de mastite clínica ou mastite subclínica, esta última identificada pela utilização do teste de CMT em todos os quartos mamários, segundo Fernandes et al. (1967), classificando-se a reação inflamatória de acordo com os escores: negativo, positivo +, positivo ++ e positivo +++, de acordo com a consistência do gel formado pela adição do reagente ao leite. Os casos clínicos foram identificados pela presença de secreção anormal (flocos, grumos ou anormalidade na coloração ou na consistência) e/ou sinais de inflamação na glândula.

A colheita era feita dos quartos afetados nos animais com diagnóstico de mastite. Imediatamente antes das ordenha, os tetos afetados foram lavados com água, secados individualmente com papel toalha descartável, desinfecção com álcool 70°GL, desprezava-se os primeiros jatos de leite e então jatos subseqüentes eram colhidos em tubos estéreis, individuais para cada teto afetado, conforme NMC (1999).

As amostras foram congeladas imediatamente após a coleta, conforme WUNDER et al. (2003), para seu posterior processamento no Laboratório de Micologia da Faculdade de Veterinária da UFRGS. Foram realizados diversos testes antes do experimento (dados não publicados) demonstrando não haver perda de viabilidade das culturas após o congelamento.

### **3.2 Procedimentos laboratoriais para bacteriologia**

#### **3.2.1 Isolamento**

Semeou-se um volume de 10µl de cada amostra de leite, com alça calibrada e descartável, em cada quadrante de uma placa de Agar Sangue preparado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro, assim como numa placa de Agar MacConkey. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, quando foi feita a primeira leitura, seguindo-se nova incubação por mais um período de 24 horas e segunda leitura, com uma última incubação e leitura no final de 48 horas. As colônias isoladas em ambos os meios foram observadas quanto à morfologia, tamanho, pigmentação, presença de hemólise no Agar Sangue e degradação de lactose no Agar MacConkey. Os microrganismos isolados foram observados ao microscópico por meio de esfregaços corados pelo método de Gram (CARTER et al., 1990).

### 3.2.2 Identificação e Classificação

As bactérias isoladas foram identificadas de acordo com Carter et al. (1990) e classificadas de acordo com o Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1974) utilizando-se características morfológicas e bioquímicas.

Bactérias do gênero *Streptococcus* foram identificadas pela ausência de produção de catalase e pelos testes de CAMP (Christie, Atkins e Munch-Peterson), hidrólise do hipurato de sódio e hidrólise da esculina. As bactérias do gênero *Staphylococcus* foram classificadas em *Staphylococcus* sp. coagulase negativa e *Staphylococcus* sp. coagulase positiva, de acordo com a produção de catalase e coagulação do plasma de coelho. Bastonetes Gram-positivos pequenos, pleomórficos e não esporulados, com morfologia semelhante à difteróides, foram identificados como *Corynebacterium* sp. pela ausência de inibição do teste de CAMP e produção de urease e catalase.

As amostras identificadas como sendo Gram negativas e isoladas no meio MacConkey foram identificadas utilizando-se os testes em meio de SIM (*Sulfur Reduction Test, Indole Production, Motility*), TSI (*Triple Sugar Iron*), Citrato e Uréia, além dos testes bioquímicos de açúcares, recomendados no Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1974) para identificação destes gêneros. As amostras identificadas como *Nocardia* sp. e *Prototheca* sp. foram classificadas pela morfologia de colônia e pela análise da coloração de Gram (CARTER et al, 1990).

### 3.2.3 Teste de Suscetibilidade a Antimicrobianos (TSA)

A susceptibilidade aos antimicrobianos, das amostras bacterianas isoladas, foi testada de acordo com os procedimentos do método de difusão por disco, em meio sólido de Mueller-Hinton, conforme Kirby et al. (1966). Uma colônia de cada bactéria

em crescimento isolado foi semeada em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) por 8 horas a 37°C. Um *swab* de algodão estéril foi mergulhado na suspensão bacteriana e antes de ser retirado foi pressionado contra a parede do tubo para retirar o excesso. Foi então esfregado na superfície três vezes, girando a placa para garantir a distribuição do inóculo por toda a superfície. Deixou-se que o excesso fosse absorvido por 03 a 05 minutos e depositaram-se os discos. Foram utilizados discos de Amoxicilina, Ampicilina, Cefoperazona, Ceftiofur, Gentamicina, Neomicina, Oxacilina, Penicilina + Novobiocina, Sulfazotrim e Tetraciclina. Estes foram distribuídos na distância de 24 mm (entre os centros) um do outro, com o uso de pinça estéril, comprimindo levemente sobre o Agar. As placas foram incubadas em aerobiose, invertidas, a 37°C.

As placas foram examinadas em 24 horas. Os diâmetros foram medidos, incluindo o diâmetro dos discos, com régua milimetrada. Com o uso de tabela do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), as bactérias foram classificadas como suscetíveis, intermediárias ou resistentes.

### **3.3 Procedimentos laboratoriais para micologia**

#### **3.3.1 Isolamento**

Uma alíquota de 100µL de leite foi coletada e semeada em triplicata pela Técnica de Espalhamento em Superfície no meio YM (Yeast Médium) acrescido de 400mg/L de cloranfenicol. Após incubação por 3-5 dias a 22-25°C, foi realizada a contagem das colônias morfológicamente diferentes. Colônias de leveduras e fungos semelhantes a leveduras (*yeast-like fungi*) de cada tipo morfológico foram selecionadas e purificadas pela técnica de esgotamento em placas contendo Agar YEPG (Yeast Extract Peptone Glucose) para obtenção de culturas puras. Foram escolhidas para

isolamento colônias com características morfológicas diferentes e que se apresentavam isoladas umas das outras.

### 3.3.2 Manutenção das Culturas

Todas as leveduras e fungos semelhantes a leveduras utilizados nesse trabalho foram conservados em tubos de ensaio com meio YEPG. Após o crescimento das culturas a 25°C por 48-72 horas, foram cobertos com cerca de 3ml de vaselina estéril e mantidos em geladeira.

### 3.3.3 Identificação Fenotípica

As leveduras e fungos semelhantes a leveduras foram fenotipicamente caracterizados por testes padrões morfológicos e fisiológicos (YARROW, 1998). A identificação das leveduras foi realizada de acordo com Barnett *et al.* (2000) e o programa de computador *YEAST COMPARE* (Ciriello. C.; Lachance, M. A., Copyright ©1999-2001), que compara as características fisiológicas das leveduras com as espécies conhecidas. Os fungos semelhantes a leveduras produtores de artroconídeos são classificados nos gêneros *Geotrichum* ou *Trichosporon*. Espécies não produtoras de urease e Diazonium Blue B (DBB) negativo, foram classificadas no gênero *Geotrichum*, enquanto que as produtoras de artroconídeos e DBB positivo foram classificadas no gênero *Trichosporon* (BARNETT et al., 2000). Em alguns casos, características fisiológicas também foram avaliadas, tais como crescimento em diferentes temperaturas e testes de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio específicas. Estes testes foram analisados de acordo com os métodos empregados para identificação convencional de leveduras (YARROW, 1998).

### 3.3.3.1 Características Morfológicas Coloniais

Foram observadas as características coloniais como cor, forma, margem, superfície, elevação e consistência, segundo Yarrow (1998).

### 3.3.3.2 Características Morfológicas da Célula Leveduriforme

Foram feitos esfregaços de cultivo a partir do crescimento de culturas em Agar Sabouraud com no máximo uma semana de incubação a 25°C e a observação foi feita em microscopia óptica com aumento de 400 a 1000 vezes. Os caracteres morfológicos celulares observados foram: forma e tamanho da célula, presença de pseudohifa, tipo de reprodução assexuada e, no caso de brotamento, tipo de brotamento, presença de ascósporos e de balistosporos.

### 3.3.3.3 Verificação da Formação de Ascosporos

A formação de ascosporos foi realizada utilizando o meio especial Agar Acetato, com incubação a 25°C por até um mês. A pequena quantidade de carboidratos nesse meio de indução restringe o crescimento vegetativo e aumenta a produção de ascosporos. As características observadas em microscopia óptica foram a presença ou ausência de conjugação, forma e número de ascosporos por asca e liberação ou não de esporos logo após a sua formação. A verificação dos ascosporos foi realizada com esfregaços de cultivo a partir do crescimento das culturas e a visualização foi feita em microscopia óptica com aumento de 400 a 1000 vezes.

### 3.3.3.4 Produção de Clamidosporos

A indução da formação de clamidosporos foi realizada como triagem em culturas de leveduras possivelmente patogênicas, servindo como um critério de

identificação. A técnica escolhida foi a de microcultivo utilizando o meio Agar Fubá. A cultura suspeita foi inoculada através de estrias na superfície do meio e após, coberta com uma lamínula. Os clamidosporos aparecem em 24-48 horas com incubação a 30°C. Após o período de incubação, a visualização foi feita através da montagem da lamínula colocada sobre as estrias diretamente em microscopia óptica, onde se procurou observar a formação de hifa, pseudohifa, clamidosporos terminais, células de leveduras e blastosporos em diversas disposições (NEUFELD, 1999).

### 3.3.4 Testes Bioquímicos

#### 3.3.4.1 Teste de Fermentação

Verificou-se, a capacidade de cada levedura e fungo semelhante à levedura em fermentar glicose. Antes da realização do teste, as culturas foram repicadas em Agar Sabouraud para a obtenção de células metabolicamente ativas e incubadas por 48 horas a 25°C-30°C. As culturas foram posteriormente inoculadas em tubos de ensaio com o meio para fermentação de glicose contendo tubos de *Durham* invertidos em seu interior. A leitura dos resultados foi feita regularmente em 1, 2, 3, 4, 7, 10, 14 e 21 dias após a incubação. A produção de gás foi confirmada pelo seu acúmulo nos tubos de *Durham*. A leitura foi considerada negativa quando não houve acúmulo de gás ou quando apenas algumas bolhas foram observadas no tubo de *Durham*, +1 quando apenas 1/3 do tubo estiver ocupado por gás, +2 quando o gás estiver presente em 2/3 do tubo e +3 quando o tubo de *Durham* encontrou-se cheio de gás. As cepas que apresentaram resultados +2 ou +3 foram consideradas fermentadoras. As que tiveram leitura +1 foram consideradas fermentadoras fracas (NEUFELD, 1999; BARNETT *et al.*, 2000).

#### 3.3.4.2 Teste de Assimilação de Fontes de Carbono

As cepas foram inoculadas, a partir de culturas recentes em Agar Sabouraud, em tubos de ensaio contendo 2ml de água destilada estéril, por no máximo dois dias para que esgotassem suas fontes energéticas. A densidade do inoculo nos tubos com água estéril foi medida pelo cartão de *Wickerham* (grau 0,5). Após esse período, uma alíquota de 8µL de cada levedura foi inoculada na placa contendo a fonte de carbono específica de acordo com o método de réplica em placas. A proporção química de cada meio foi de 0,67% de YNB, 0,5% da respectiva fonte de carbono, com exceção da rafinose cuja proporção foi de 1% e 2% de Agar (KREGER-VAN RIJ, 1984; YARROW, 1998; BARNETT et al., 2000). Como controle positivo foi utilizado uma placa com meio YNB acrescido de glicose e Agar, e como controle negativo uma placa com meio YNB acrescido somente de Agar. A leitura dos resultados foi realizada uma vez por semana durante três semanas consecutivas, comparando o crescimento da levedura na placa de controle positivo e de controle negativo com o crescimento na fonte de carbono analisada.

#### 3.3.4.3 Teste de Assimilação de Fontes de Nitrogênio

O teste de assimilação de fontes de nitrogênio baseou-se na utilização de nitrato e lisina como única fonte desse elemento, utilizando o método de réplica em placas. As linhagens foram inoculadas, a partir de culturas recentes em Agar Sabouraud, em tubos de ensaio contendo 2ml de água destilada estéril, por no máximo dois dias para que as leveduras esgotassem suas fontes energéticas. A densidade do inóculo nos tubos com água estéril foi medida pelo cartão de *Wickerham* (grau 0,5). Após esse período, uma alíquota de 8µL de cada cultura foi inoculada na placa contendo a fonte de nitrogênio específica de acordo com o método de réplica em placas. A proporção

química de cada meio foi 1,17 % de YCB, 2% Agar, 0,078% de nitrato ou 0,056 % de lisina. Para controle positivo foi utilizado meio contendo peptona e Agar e como controle negativo apenas YCB e Agar (KREGGER-VAN RIJ, 1984; YARROW, 1998; BARNETT *et al.*, 2000). A leitura dos resultados foi realizada uma vez por semana durante três semanas consecutivas, comparando o crescimento da levedura na placa de controle positivo e de controle negativo com o crescimento na fonte de nitrogênio analisada.

### **3.3.5 Testes Fisiológicos**

#### **3.3.5.1 Teste de Produção de Urease e Reação ao DBB**

No teste de urease e DBB foi empregado o método descrito por Hagler *et al.* (1990). As linhagens foram inoculadas, a partir de culturas recentes em Agar Sabouraud, em meio sólido YCB-Uréia (Yeast Carbon Base). Os tubos de ensaio para teste da produção de urease foram incubados a temperatura ambiente por três dias, sendo as leituras feitas diariamente. A atividade da enzima urease, quando presente na linhagem, provocou uma mudança do indicador de uma cor fucsina (rosa) para branco, devido à elevação de pH após a hidrólise da uréia no presente meio. Após a leitura da uréase, as culturas foram incubadas a 55°C por cerca de dezesseis horas, sendo posteriormente adicionadas sobre o inóculo 1ml de uma solução resfriada contendo o reagente DBB tamponado com Tris-HCl 1M para pH 7.0. As culturas que adquiriram uma coloração avermelhada após um minuto de contato com o reagente DBB foram consideradas positivas e de afinidade basidiomicética. As linhagens que não desenvolveram cor avermelhada foram consideradas negativas e de afinidade ascomicética (BARNETT *et al.*, 2000).

### 3.3.5.2 Teste de Crescimento em Diferentes Temperaturas

Este teste avaliou a capacidade de crescimento das leveduras e fungos semelhantes a leveduras nas temperaturas de 37°C, 40°C e 42°C., sendo a temperatura ótima de crescimento para a maioria das espécies de 20°C a 30°C. As espécies patogênicas crescem favoravelmente entre 30°C e 37°C, sendo o crescimento a 37°C bem característico. Este teste foi realizado com a utilização do meio caldo Sabouraud. Após a inoculação, os tubos foram incubados em banho-maria nas respectivas temperaturas testadas por três dias, sendo a leitura realizada diariamente através do grau de turvação, de acordo com a escala de *Wickerham* (KREGER-VAN RIJ, 1984; YARROW, 1998; BARNETT et al., 2000).

### 3.3.5.3 Teste de Tolerância ao NaCl 10% e 16%

As espécies de leveduras diferem na capacidade de suportarem soluções hipertônicas, tornando essa característica relevante na identificação das espécies. Avaliou-se a capacidade de crescimento das leveduras durante três semanas, sendo a leitura realizada uma vez por semana, em meio hipertônico 10% e 16%. O meio utilizado foi o Agar Sabouraud acrescido de NaCl. Para o controle positivo utilizou-se o meio sem NaCl (BARNETT et al., 2000).

### 3.3.5.4 Teste de Tolerância à Glicose 50%

Seguindo os mesmos preceitos do teste de tolerância a soluções hipertônicas, foi testada a capacidade das leveduras em multiplicarem-se em meio de Ágar Sabouraud acrescido de 50% de glicose (solução glicosada hipertônica). Avaliou-se a capacidade de crescimento das leveduras durante três semanas, com leituras em intervalos semanais.

### **3.4 Análise estatística**

Os dados foram analisados pelo teste de Qui-quadrado para verificação das associações de variáveis qualitativas e o teste de correlação de Pearson, para identificação de correlação entre variáveis quantitativas com o objetivo de eliminar possíveis fatores de confusão (bias). O SPSS versão 8.0 (Statistical Package for Social Sciences) será usado para a avaliação estatística dos dados (Morgan et al., 2001).

## 4 RESULTADOS

Durante o período de estudo, foram analisadas 240 amostras de leite, distribuídas da seguinte forma: 46 amostras provenientes de animais com diagnóstico de mastite clínica e 194 amostras provenientes de animais com diagnóstico de mastite subclínica (53 amostras com CMT +; 80 amostras com CMT ++; 61 amostras com CMT +++). Com relação ao isolamento de algum agente microbiológico, 95,7% das amostras com diagnóstico de mastite clínica e 91,2% das amostras com diagnóstico de mastite subclínica foram positivas, sendo que a menor porcentagem de amostras positivas foi no CMT +, onde 86,8% das amostras apresentaram algum crescimento microbiológico, como mostra a **Tabela 1**.

Tabela 1 – Total de amostras estudadas, distribuídas de acordo com o tipo de mastite e o número percentual de amostras com algum crescimento microbiológico nos meios de ágar sangue, ágar MacConkey e/ou YM.

<b>Tipos de mastite</b>	<b>Total</b>	<b>%</b>	<b>% de positivos</b>
Clínica	46	19,2	95,7
Subclínica (CMT +)	53	22,1	86,8
Subclínica (CMT ++)	80	33,3	91,3
Subclínica (CMT +++)	61	25,4	95,1
<b>TOTAL</b>	<b>240</b>	<b>100</b>	<b>92,1</b>

Houve um percentual de 92,1% de amostras totais que apresentaram crescimento de algum microrganismo e apenas 7,9% de amostras totalmente negativas na análise microbiológica efetuada, com cultivo nos meios de ágar sangue, MacConkey e YM.

Com relação ao crescimento bacteriano, 218 amostras (90,8%) apresentaram isolamento de algum agente, sendo que 95,7% das amostras de mastite clínica e 89,7% de amostras de mastite subclínica foram positivas.

No que se refere ao isolamento de fungos e leveduras, houve algum crescimento em 39 amostras (16,3%), sendo que 28,3% das amostras de mastite clínica e 13,4% das amostras de mastite subclínica foram positivas. Houve três amostras em que se verificou

crescimento micológico apenas, negativas no isolamento bacteriano, sendo todas elas de mastite subclínica. A relação dos tipos de mastite com os crescimentos bacteriano e micológico, está descrita na **Tabela 2**.

Tabela 2 – Distribuição das amostras que apresentaram crescimento bacteriano e micológico com o respectivo percentual, de acordo com o tipo de mastite.

Tipos de mastite	Crescimento bacteriano <sup>1</sup>	%	Crescimento micológico <sup>2</sup>	%	Negativas totais	%
Clínica	44	95,7	13	28,3	02	4,4
Subclínica (CMT +)	46	86,8	10	18,9	07	13,2
Subclínica (CMT ++)	71	88,8	08	10,0	07	8,8
Subclínica (CMT +++)	57	93,4	08	13,1	03	4,9
TOTAL	218	90,8	39	16,3	19	7,9

Coefficientes de análise de correlação de Fisher: <sup>1</sup> p=0,26 <sup>2</sup> p=0,014

#### 4.1 Análise Bacteriológica

No total de 240 amostras analisadas, realizou-se isolamento de 250 agentes bacterianos, sendo 50 isolados de amostras com mastite clínica e 200 de amostras com mastite subclínica. Foram identificados 10 gêneros e 12 espécies. Nesta análise incluiu-se o gênero de alga *Prototheca* sp.

Na mastite clínica, o agente mais prevalente foi o *Staphylococcus* spp. coagulase positiva, com 32,6%, seguido de *Nocardia* spp. (21,7%) e Enterobactérias (17,4%) como *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. com destaque para *Serratia* spp. Apenas 02 amostras (4,4%) não apresentaram crescimento bacteriano, como mostra a **Tabela 3**.

Nas amostras de mastite subclínica, o agente mais prevalente foi o *Corynebacterium* spp. com 32,0%, seguido de *Staphylococcus* spp. coagulase negativa (30,9%) e *Staphylococcus* spp. coagulase positiva (15,5%). As Enterobactérias aparecem com 6,7% de isolados, seguido de *Nocardia* spp. com 5,7%. No total das

amostras, 20 não apresentaram crescimento bacteriano (10,3%), sendo que o CMT + apresentou o maior percentual de amostras negativas, com 13,2% seguido pelo CMT ++ e CMT +++ (11,3% e 6,6% respectivamente). Os resultados gerais da análise bacteriológica nas amostras provenientes de animais com diagnóstico de mastite subclínica, apresentando o porcentual de agentes isolados em todas as amostras, estão demonstrados na **Tabela 4** e **Tabela 5**.

Tabela 3 – Distribuição porcentual dos agentes isolados nas amostras de leite provenientes de animais com diagnóstico de mastite clínica.

<b>Agente</b>	<b>Total</b>	<b>%</b>
<i>Staphylococcus</i> spp. coagulase positiva	15	32,6
<i>Nocardia</i> spp.	10	21,7
<i>Staphylococcus</i> spp. coagulase negativa	06	13,0
<i>Serratia</i> spp.	05	10,9
<i>Corynebacterium bovis</i>	05	10,9
<i>Prototheca</i> spp.	03	6,5
<i>Bacillus cereus</i>	02	4,4
<i>Klebsiella</i> spp.	02	4,4
<i>Escherichia coli</i>	01	2,2
<i>Streptococcus agalactiae</i>	01	2,2
Negativos	02	4,4

Tabela 4 – Distribuição porcentual dos agentes isolados nas amostras de leite provenientes de animais com diagnóstico de mastite subclínica.

<b>Agente</b>	<b>Total</b>	<b>%</b>
<i>Corynebacterium bovis</i>	62	32,0
<i>Staphylococcus</i> spp. coagulase negativa	60	30,9
<i>Staphylococcus</i> spp. coagulase positiva	30	15,5
<i>Nocardia</i> spp.	11	5,7
<i>Streptococcus uberis</i>	09	4,6
<i>Prototheca</i> spp.	06	3,1
<i>Escherichia coli</i>	06	3,1
<i>Serratia</i> spp.	05	2,6
<i>Bacillus cereus</i>	04	2,1
<i>Streptococcus agalactiae</i>	04	2,1
<i>Klebsiella</i> spp.	02	1,0
<i>Enterococcus</i> spp.	01	0,5
Negativos	20	10,3

Tabela 5 - Distribuição percentual dos agentes isolados nas amostras de leite que apresentaram mastite subclínica, de acordo com a classificação das mastites conforme CMT.

Agente	CMT	%	CMT	%	CMT	%
	+		++		+++	
<i>Corynebacterium</i> spp.	01	1,9	25	31,3	36	59,0
<i>Staphylococcus</i> spp. coagulase negativa	27	50,9	21	26,3	12	19,7
<i>Staphylococcus</i> spp. coagulase positiva	07	13,2	18	22,5	05	8,2
<i>Nocardia</i> spp.	01	1,9	03	3,8	07	11,5
<i>Prototheca</i> spp.	-	-	03	3,8	03	4,9
<i>Serratia</i> spp.	01	1,9	03	3,8	01	1,6
<i>Escherichia coli</i>	-	-	02	2,5	04	6,6
<i>Streptococcus uberis</i>	06	11,3	02	2,5	01	1,6
<i>Streptococcus agalactiae</i>	02	3,8	02	2,5	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	03	5,7	01	1,3	-	-
<i>Klebsiella</i> spp.	01	1,9	01	1,3	-	-
<i>Enterococcus</i> spp.	-	-	01	1,3	-	-
Negativos	07	13,2	09	11,3	04	6,6

- = Não houve isolamento

A **Figura 2** mostra a comparação de todos os tipos de mastite, com relação aos agentes mais frequentes isolados, que somados, perfizeram um total de 88% dos isolados bacterianos.

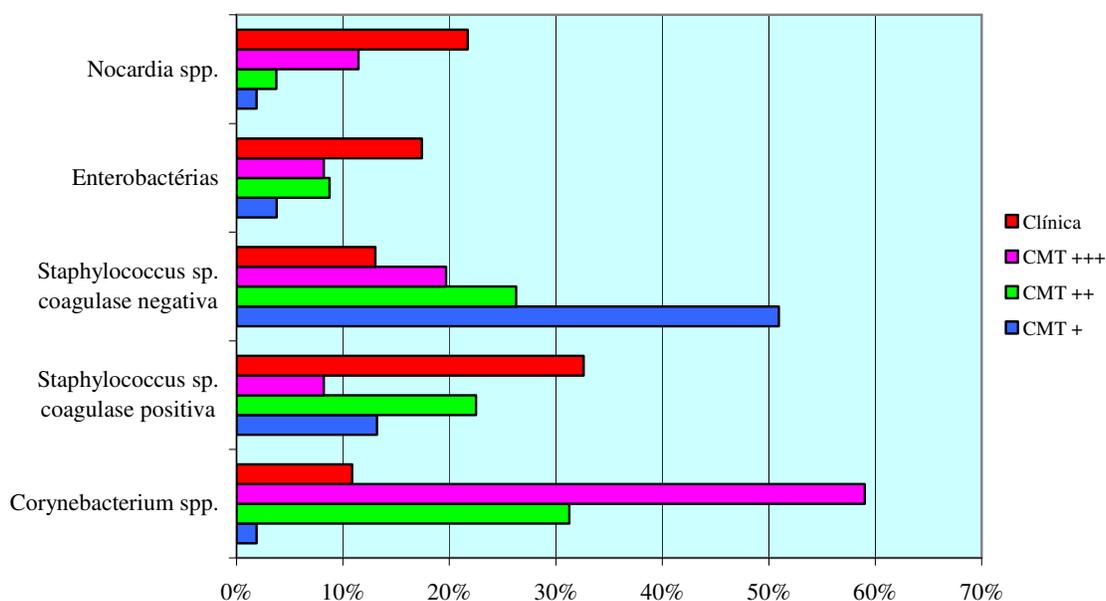


Figura 2 – Distribuição percentual dos principais agentes isolados durante o período do estudo, comparado com o tipo de mastite.

Em 32 amostras (13,3%), houve crescimento de 02 agentes concomitantes. Destas, 06 (18,8%) foram de mastite clínica e 26 (81,3%) de mastite subclínica, distribuídas da seguinte forma: 03 CMT + (9,4%); 11 CMT ++ (34,4%) e; 12 CMT +++ (37,5%).

Dois agentes se destacaram com crescimento concomitante: o *Corynebacterium* spp. que cresceu em 68,8% das amostras com crescimento misto, onde em mais de 70% destes casos a sua contagem de UFC (Unidade Formadora de Colônias) foi superior ao outro agente; e o *Staphylococcus* spp. coagulase negativa que cresceu em 56,3% destas amostras, porém em apenas 40% dos casos sua contagem de UFC foi superior ao outro agente. Entre estes dois agentes, houve crescimento concomitante em 12 casos de 32 (37,5%), sendo que destes, apenas em 02 casos o crescimento de *Staphylococcus* spp. coagulase negativa foi superior. Houve ainda 03 casos de crescimento misto de *Corynebacterium* spp. com *Staphylococcus* spp. coagulase positiva.

Juntos, o *Corynebacterium* spp. e o *Staphylococcus* spp. coagulase negativa somaram mais de 60% dos casos de crescimento misto, sendo o restante distribuído entre 08 agentes diversos, com destaque para o *Bacillus cereus* que foi isolado apenas 06 vezes em todas as 240 amostras, sendo 05 destas com crescimento concomitante com outro agente e com contagem de UFC inferior em relação ao outro agente. Este agente, porém, foi isolado sozinho numa amostra de mastite clínica com alta contagem de UFC.

Foram isoladas 09 amostras de *Prototheca* sp. (3,75%) de 05 diferentes propriedades, sendo que 04 amostras foram isoladas concomitantes com fungo.

Com relação às propriedades, 57,1% das amostras de *Nocardia* sp. foram isoladas de uma mesma propriedade. Apenas uma propriedade não apresentou nenhum crescimento bacteriológico.

Referente ao TSA, a **Figura 3** mostra os resultados obtidos com os agentes mais isolados, em relação ao número de amostras sensíveis aos antibióticos que são: Amoxicilina (Amo), Ampicilina (Amp), Ceftiofur (Cft), Cefoperazona (Cpz), Gentamicina (Gen), Neomicina (Neo), Oxacilina (Oxa), Penicilina + Novobiocina (PnN), Sulfametoxazol + Trimetoprima (Sut) e Tetraciclina (Tet).

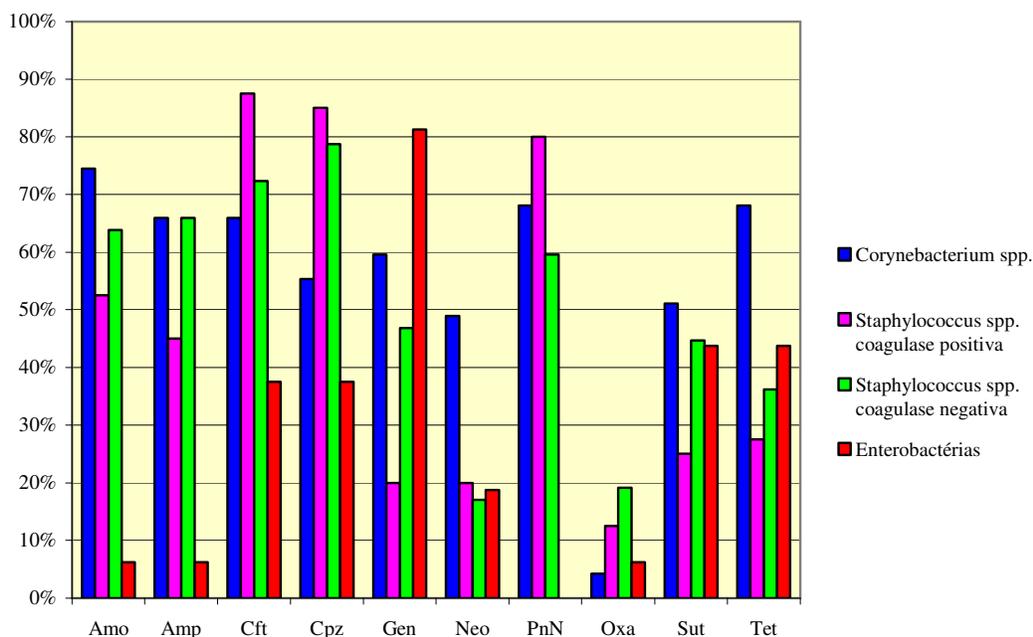


Figura 3 – Relação dos agentes mais isolados com a sensibilidade aos antimicrobianos utilizados no teste de TSA.

#### 4.2 Análise Micológica

Em um total de 240 amostras, realizou-se isolamento de 65 agentes leveduriformes. Foram 23 isolados em amostras provenientes de animais com mastite clínica e 42 em amostras provenientes de animais com mastite subclínica.

Um total de 10 gêneros de fungos foi identificado. Dentro destes, foram classificados 08 gêneros como leveduras, num total de 29 espécies e 02 gêneros foram identificados como leveduras semelhantes a fungos (*Trichosporon* e *Geotrichum*), com 04 espécies identificadas. Com relação às espécies mais prevalentes no estudo, foram

isoladas 06 amostras de *Candida* sp. (9,2%), 05 amostras de *Pichia guilliermondii* (7,7%), 04 amostras de *Cryptococcus* sp. (6,2%) e 03 amostras (4,6%) de *Candida zeylanoides*, *Debaryomyces hansenii*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula minuta* e *Trichosporon* sp., perfazendo um total de 61,5% do total de agentes isolados. O restante ficou dividido em 25 espécies diferentes, como mostra a **Tabela 6**.

Tabela 6 – Quantidade de isolados fúngicos de acordo com a espécie e a classificação dos casos de mastite.

<b>Agente</b>	<b>Clínica</b>	<b>CMT+</b>	<b>CMT++</b>	<b>CMT+++</b>	<b>TOTAL</b>
<i>Candida</i> sp.	02	03	01	-	<b>06</b>
<i>Candida aaseri</i>	-	01	-	-	<b>01</b>
<i>Candida caseynolitica</i>	01	-	-	-	<b>01</b>
<i>Candida catenulata</i>	-	-	01	01	<b>02</b>
<i>Candida membranifaciens</i>	01	01	-	-	<b>02</b>
<i>Candida pseudoglaebosa</i>	01	-	-	-	<b>01</b>
<i>Candida robusta</i>	01	-	-	-	<b>01</b>
<i>Candida glabrata</i>	-	01	-	-	<b>01</b>
<i>Candida rugosa</i>	01	-	-	01	<b>02</b>
<i>Candida saitoana</i>	01	02	01	-	<b>04</b>
<i>Candida sorbophila</i>	-	-	-	01	<b>01</b>
<i>Candida zeylanoides</i>	01	-	02	-	<b>03</b>
<i>Cryptococcus</i> spp.	-	01	01	02	<b>04</b>
<i>Cryptococcus curvatus</i>	01	-	01	-	<b>02</b>
<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	01	-	<b>01</b>
<i>Debaryomyces hansenii</i>	02	-	01	-	<b>03</b>
<i>Galactomyces geotrichum</i>	-	01	-	-	<b>01</b>
<i>Geotrichum</i> sp.	01	-	01	-	<b>02</b>
<i>Geotrichum capitatum</i>	01	-	-	-	<b>01</b>
<i>Geotrichum flagrans</i>	01	-	-	-	<b>01</b>
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	-	-	-	01	<b>01</b>
<i>Pichia</i> sp.	-	-	-	01	<b>01</b>
<i>Pichia castillae</i>	-	-	-	01	<b>01</b>
<i>Pichia deserticola</i>	-	-	01	01	<b>02</b>
<i>Pichia guilliermondii</i>	01	02	01	01	<b>05</b>
<i>Pichia kluyveri</i>	01	-	01	-	<b>02</b>
<i>Pichia kluyveri-like</i>	-	01	-	-	<b>01</b>
<i>Pichia membranifaciens</i>	01	-	-	-	<b>01</b>
<i>Rhodosporidium toruloides</i>	01	-	-	-	<b>01</b>
<i>Rhodotorula glutinis</i>	01	-	02	-	<b>03</b>
<i>Rhodotorula mucilaginoso</i>	01	-	-	-	<b>01</b>
<i>Rhodotorula minuta</i>	02	-	-	01	<b>03</b>
<i>Trichosporon</i> sp.	-	01	01	01	<b>03</b>
<b>TOTAL</b>	<b>23</b>	<b>14</b>	<b>16</b>	<b>12</b>	<b>65</b>

- = Não houve isolamento

Ao serem analisados os gêneros, verificou-se que o mais prevalente foi o gênero *Candida*, com 38,5% dos isolados fúngicos, seguido pelo gênero *Pichia* com 20% e pelos gêneros *Cryptococcus* e *Rhodotorula* com 10,8%. Foram devidamente identificadas 11 espécies diferentes do gênero *Candida* e 06 do gênero *Pichia*, que totalizam mais de 50% das espécies identificadas, sem levar em conta 06 amostras classificadas como *Candida* sp. e 01 amostra como *Pichia* sp. O gênero *Candida* só não foi prevalente nas amostras com CMT+++, onde o gênero *Pichia* foi predominante, como mostra a **Tabela 7**.

Tabela 7 – Distribuição dos gêneros identificados de acordo com a classificação dos casos de mastite.

<b>Gênero</b>	<b>Clínica</b>	<b>CMT+</b>	<b>CMT++</b>	<b>CMT+++</b>	<b>%</b>
<i>Candida</i>	09	08	05	03	<b>38,5</b>
<i>Pichia</i>	03	03	03	04	<b>20,0</b>
<i>Cryptococcus</i>	01	01	03	02	<b>10,8</b>
<i>Rhodotorula</i>	04	-	02	01	<b>10,8</b>
<i>Geotrichum</i>	03	-	01	-	<b>6,2</b>
<i>Debaryomyces</i>	02	-	01	-	<b>4,6</b>
<i>Trichosporon spp.</i>	-	01	01	01	<b>4,6</b>
<i>Galactomyces geotrichum</i>	-	01	-	-	<b>1,5</b>
<i>Kluyveromyces</i>	-	-	-	01	<b>1,5</b>
<i>Rhodosporidium</i>	01	-	-	-	<b>1,5</b>

- = Não houve isolamento

Do total de 39 amostras com crescimento fúngico, houve 15 (38,4%) em que se isolou mais de um agente, sendo que a grande maioria, 10 (66,7%), houve isolamento de apenas 2 espécies. Em 1 amostra isolou-se 7 agentes diferentes e em 2 amostras isolou-se 3 e em outras 2 isolou-se 4 espécies diferentes. Ao analisarmos com relação ao gênero, verificamos que em apenas duas amostras houve crescimento de 3 gêneros diferentes, sendo que uma delas foi a que apresentou maior crescimento, 7 espécies, e a outra apresentou crescimento de 4 espécies.

Com relação às propriedades, 16 apresentaram crescimento de leveduras (57,1%). Três propriedades apresentaram dados importantes; em uma delas foram feitas

03 coletas diferentes com isolamento de 10 espécies, onde foram identificadas, em datas diferentes, as únicas 2 amostras de *Candida rugosa* do estudo, ambas com UFC/ml >100 sendo que uma delas associada com *Rhodotorula glutinis*, também com alta contagem. Também, em datas diferentes, isolou-se 2 amostras de *Pichia guilliermondii*, sendo uma delas associada com *Rhodotorula minuta* com maior contagem de UFC e a outra associada com duas espécies de *Candida* sp., ambas com menor UFC. Em outra propriedade isolou-se 13 espécies, sendo duas amostras de *Pichia guilliermondii* e 02 amostras de *Trichosporon* sp.. Na terceira propriedade isolou-se 14 espécies, e houve 03 amostras de leite onde não se isolou nenhum agente bacteriano, como mostrado na **Tabela 8**. Nesta última propriedade houve isolamento das únicas duas amostras de *Cryptococcus curvatus* do estudo. Sendo assim, em apenas 03 propriedades isolou-se 56,9% de todas as espécies identificadas.

Tabela 8 – Espécies de leveduras isoladas em 03 amostras onde não ocorreu crescimento bacteriano

<b>Amostra</b>	<b>Agente</b>	<b>Mastite</b>	<b>UFC/ml</b>
<b>01</b>	<i>Candida zeylanoides</i>	CMT ++	05
<b>02</b>	<i>Pichia</i> sp.	CMT +++	>100
<b>03</b>	<i>Cryptococcus curvatus</i>	CMT ++	>100
	<i>Candida catenulata</i>		05

Os agentes bacterianos mais comumente isolados junto com as leveduras foram o *Staphylococcus* spp. coagulase negativa (33,3%), o *Corynebacterium* spp. (23,1%) e o *Staphylococcus* spp. coagulase positiva (17,9%). A *Prototheca* sp., identificada em apenas 09 amostras em todo o estudo, apresentou crescimento concomitante com fungos em 04 amostras (44,4%). O isolamento concomitante de *Nocardia* sp. com agentes fúngicos ocorreu em 02 amostras e em ambas houve crescimento de *Debaryomyces hansenii*.

Com relação à contagem de UFC/ml, 15 amostras (23,1%) apresentaram uma contagem  $\leq 5$  UFC/ml, sendo cinco dessas com crescimento de apenas uma espécie fúngica e uma sem qualquer crescimento bacteriano. Outras 14 amostras (21,5%) tiveram uma contagem  $\leq 40$  UFC/ml. Apenas nov (13,9%) amostras tiveram uma contagem entre 51 e 100 UFC/ml. Porém, 25 amostras (38,5%) tiveram uma contagem  $>100$  UFC/ml, sendo que cinco dessas identificaram-se dois agentes ambos com contagem  $>100$  UFC/ml, uma dessas amostras apresentando crescimento concomitante de *Prototheca* sp. e o restante com o crescimento concomitante com bactérias do gênero *Staphylococcus*.

A **Figura 4** mostra a distribuição, conforme o tipo de mastite, dos principais gêneros de leveduras identificados, que somados, perfazem um total de 80% das amostras isoladas.

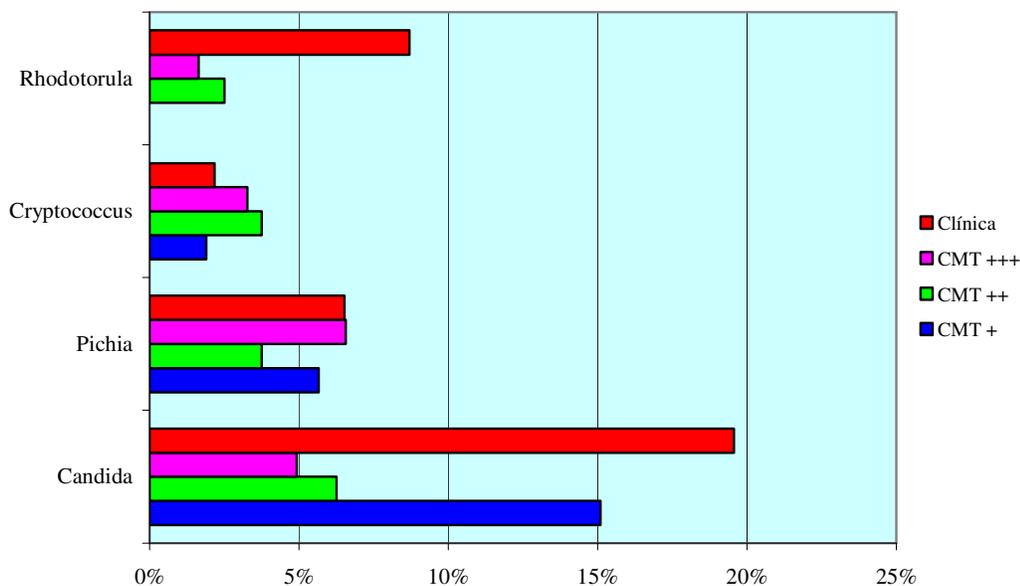


Figura 4 – Comparação dos principais gêneros de leveduras isolados, de acordo com o quadro de mastite identificada.

A comparação dos principais gêneros isolados, tanto bacterianos quanto leveduriformes, de acordo com o quadro de mastite clínica ou subclínica, é mostrado na **Figura 5**.

Na análise estatística, determinou-se a tendência de ocorrência de um agente, bacteriano ou micótico, de acordo com o quadro de mastite. Tanto fungos quanto bactérias, neste estudo, tiveram maior tendência à ocorrência na mastite clínica, como mostra a **Figura 6**.

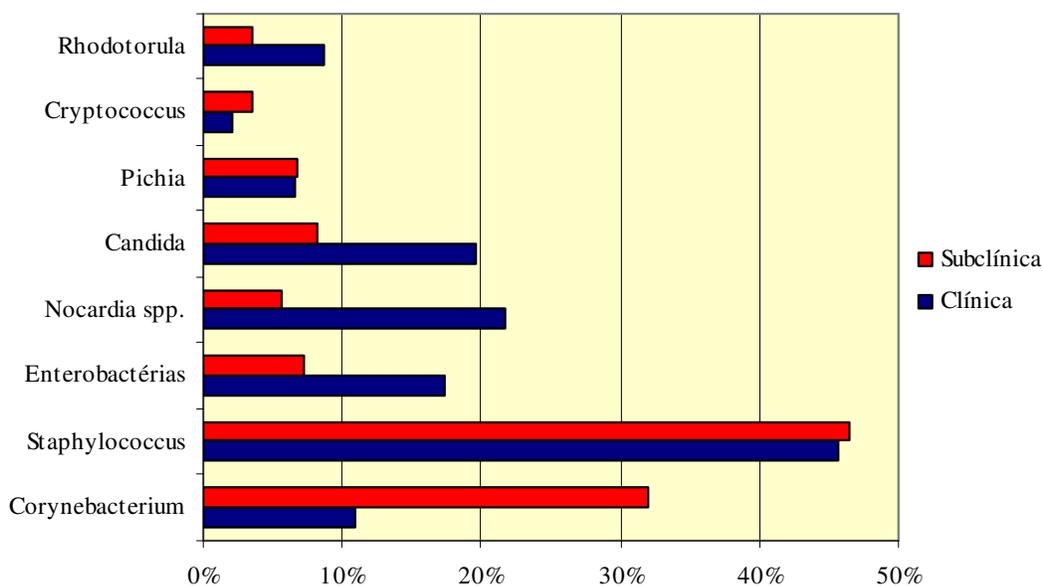
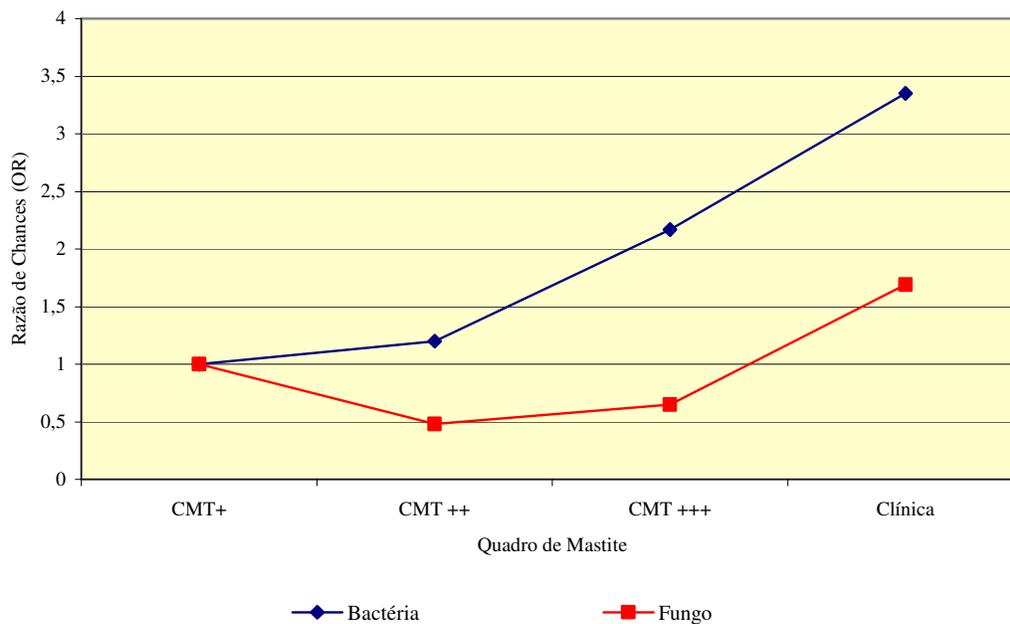


Figura 5 – Comparação dos principais gêneros microbianos isolados de acordo com o quadro de mastite clínica ou mastite subclínica.

Com relação ao teste de diferentes temperaturas (37°C, 40°C e 42°C), apenas 05 espécies isoladas (7,7%) não apresentaram crescimento em nenhuma das temperaturas testadas. Dos 04 isolados de *Cryptococcus* sp., 03 foram negativos no teste de crescimento em diferentes temperaturas, porém em apenas uma das amostras houve o crescimento isolado deste agente. As outras espécies negativas no teste foram, uma amostra de *Rhodotorula glutinis* e uma amostra de *Trichosporon* sp., ambas com outras

espécies isoladas na mesma amostra. A amostra de *Candida zeylanoides* isolada sem crescimento bacteriano não cresceu em 37°C, mas teve crescimento fraco em 40 e 42°C.

Neste mesmo teste, 30 espécies apresentaram crescimento fraco em 37°C, porém apenas 21 destas apresentaram crescimento fraco em todas as temperaturas, o restante apresentando crescimento positivo em 40°C e/ou 42°C. Destacam-se os 03 isolados de *Debaryomyces hansenii*, os 02 isolados de *Cryptococcus curvatus* e os 02 isolados de *Candida membranifaciens*, além dos isolados únicos de *Pichia membranifaciens* e *Rhodospiridium toluoides*.



\* Coeficientes de análise de correlação de Fisher: Bactéria  $p=0,07$  Fungo  $p=0,19$

Figura 6 – Tendência do isolamento bacteriano e micótico conforme o quadro de mastite.

Se fossem desconsideradas as linhagens sem crescimento e/ou crescimento fraco nas diferentes temperaturas, mais quatro amostras de leite seriam negativas na análise fúngica, porém diminuiria a quantidade de espécies isoladas, especialmente no caso das amostras com 4 e 7 espécies diferentes identificadas, facilitando a análise.

## 5 DISCUSSÃO

Mesmo tendo este estudo 100% de amostras com diagnóstico de mastite, sem pesquisa de animais sadios, ficou evidente que a prevalência de mastite subclínica foi superior, o que comprova dados de que a mastite subclínica é de 15 a 40 vezes mais predominante (PHILPOT et al., 1991). Pearson et al. (1971) referiram que para cada animal com mastite clínica existiam 14 animais com mastite subclínica e que para cada quarto com mastite clínica havia 32 quartos mamários com mastite subclínica.

Segundo Costa et al. (2001), a proporção de mastite mais aceita é 1:10, isto é, para cada caso de mastite clínica existiriam 09 casos de mastite subclínica. Neste mesmo estudo, nos estados de São Paulo e Minas Gerais, foi determinado que a proporção foi de 1:6. Subjetivamente, poderíamos afirmar que neste estudo a proporção foi de 1:4. Deve-se levar em conta que a mastite clínica é vista com mais facilidade, portanto, a incidência de casos de mastite subclínica está diretamente relacionada com o uso de testes como o CMT.

Apesar de existir uma intensa pesquisa etiológica na mastite, 20-35% dos casos clínicos não possui etiologia determinada. A explicação para estas altas percentagens de amostras negativas pode ser a baixa concentração de patógenos no úbere e a presença de outros patógenos como mycoplasma, leveduras, fungos filamentosos e vírus. (WELLEMBERG *et al*, 2002). Porém, neste estudo, considerando-se o isolamento de todos os agentes, apenas 7,9% das amostras foram negativas. Sem o isolamento micológico, este valor aumenta para 9,2%, o que ainda é extremamente baixo, comparado com valores acima de 50% encontrados por Fernandes et al (2001).

Segundo Dingwell et al. (2003), o CMT possui uma sensibilidade de 82,4% e uma especificidade de 80,6%. Sendo assim, existem chances de ocorrer casos de CMT positivos sem isolamento microbiano, assim como existam casos onde haja uma

infecção sem que o teste consiga detectar as células inflamatórias existentes. Porém, Thiers et al. (1999) afirmaram que o CMT é um eficiente indicador da presença de células inflamatórias, podendo ser executado com muita facilidade e rapidez em nível de campo.

O maior número de casos de mastite sem isolamento foi no CMT + (13,2%), o que pode ser explicado por erros de interpretação no teste, erros do teste, ou a presença de algum agente não estudado além de causas não infecciosas. Com relação à mastite clínica, apenas 4,3% das amostras foram negativas, que, além das teorias acima citadas, com exceção as referentes ao CMT, podemos ainda citar a possibilidade de, no momento da coleta do leite, o animal já apresentar cura microbiológica sem a cura clínica, o que também poderia ocorrer na mastite subclínica. Além disso, Monardes (1995) cita que 10% dos casos de mastite podem ser por causa traumática.

Houve isolamento bacteriano em 90,8% das amostras, com pouca correlação entre as amostras de mastite clínica e subclínica. Porém, houve 16,3% das amostras com algum isolamento fúngico, com uma correlação com as amostras de mastite clínica. Este resultado não comprova os dados de Krukowski et al. (2003), que citam uma baixa incidência de casos de mastite por fungos, mas está de acordo com dados que citam a importância das mastites fúngicas em países tropicais (LAGNEAU et al., 1996). Em estudo no estado de São Paulo, Costa et al. (1993) identificaram 12,07% de casos de mastite fúngica e no mesmo estado, Santos et al. (2005) identificaram 25,4% de casos.

O isolamento de 250 agentes bacterianos, divididos em 10 gêneros e 12 espécies, em 240 amostras estudadas, confirma o que Brabes et al. (1999) afirmavam, que a maioria das infecções é de origem bacteriana e cerca de 90% de todos os casos são devido a um reduzido número de espécies. Neste estudo, cerca de 80% dos isolados foram de apenas 03 gêneros diferentes, como mostra a **Figura 2**.

O agente mais isolado em todo o estudo foi o *Corynebacterium* spp., principalmente em amostras de mastite subclínica. É interessante observar que em um estudo feito na década de 70 no Rio Grande do Sul (FERNANDES et al., 1973) este agente não aparecia entre os isolados. Porém, atualmente este vem sendo uma das principais causas de mastite, principalmente subclínica (FERNANDES et al., 2001). Costa et al. (1994) sugerem a importância deste agente, principalmente pelo fato de alguns animais infectados poderem ser negativos no teste de CMT e servir de fonte transmissora durante a ordenha.

Segundo Costa et al. (2001), num estudo realizado em propriedades leiteiras de São Paulo e Minas Gerais, foi observado um menor nível de mastite clínica e uma maior ocorrência de casos de mastite subclínica, quando o principal agente etiológico foi o *Corynebacterium bovis*. Analisando os dados aqui encontrados, pode-se comprovar esta informação. Porém, alguns autores (PANKEY et al, 1985; POCHIECHA, 1989; PHILPOT et al, 1991) afirmam que quartos infectados por *Corynebacterium bovis* são menos suscetíveis principalmente à infecção por *Staphylococcus aureus*, mas também por agentes etiológicos em geral, além de serem mais suscetíveis à infecção por *Streptococcus agalactiae* e terem menor contagem de células somáticas. Neste estudo, ao analisar a **Figura 2**, vê-se que não existe este tipo de relação com nenhum agente, com exceção dos casos de CMT + onde os poucos isolados de *Corynebacterium* spp. contrasta com a grande quantidade de isolados de *Staphylococcus* spp. coagulase negativa. Além disso, a grande maioria dos isolados de *Corynebacterium* spp. foi de mastite subclínica com CMT ++ e principalmente CMT +++, e este agente foi identificado em quase 70% dos crescimentos mistos bacterianos que foi encontrado, sendo que em 12 casos de 32 apareceu concomitantemente com *Staphylococcus* spp.

coagulase negativa, além de em 03 casos aparecer com *Staphylococcus* spp. coagulase positiva.

A presença de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva, principalmente nos casos de mastite clínica, esta de acordo com estudos que mostram a importância deste agente nas mastites (FERREIRO et al, 1985, LANGONI et al, 1991). A terapia da vaca seca é eficaz na prevenção de novas infecções por *Staphylococcus aureus* (BERRY et al., 2002), porém diversos autores concordam com a dificuldade de tratamento deste agente (PHILPOT et al., 1991). Estes mesmos autores afirmam que casos não devidamente curados de mastite clínica podem ressurgir como mastite subclínica.

As Enterobactérias são agentes de mastite ambiental e estão relacionadas com condições de higiene e manejo (Hogan et al., 1989). A presença destes agentes, principalmente nos casos de mastite clínica, confirma os dados de Langoni et al. (1998). Porém, ao contrário da maioria dos estudos, a principal enterobactéria aqui isolada foi a *Serratia* spp., 10,9% e 2,6%, em mastite clínica e subclínica respectivamente, superando a *Escherichia coli* como a enterobactéria mais frequentemente envolvida em casos de mastite, como mostra as **Tabelas 3 e 5**.

Um dado interessante é que a maioria dos estudos relata de uma prevalência considerável de *Streptococcus* spp. em leites com mastite, principalmente *Streptococcus agalactiae* (LANGONI et al, 1998; FERNANDES et al, 2001; WUNDER et al, 2003). Porém, neste estudo, foram isoladas apenas 14 amostras de *Streptococcus* spp., sendo 05 amostras de *S. agalactiae* e 09 de *S. uberis* (**Tabelas 3 e 4**). Esta observação comprova os dados de Costa et al (2001) que afirmam que a prevalência de *S. agalactiae*, com o advento da terapia antimicrobiana, decresceu, enquanto que a causada pelos gêneros *Staphylococcus*, *Corynebacterium* e até mesmo *S. uberis*, cresceu mundialmente.

O alto índice de *Nocardia* spp. isolada (8,4%) principalmente em mastite clínica (21,7%), mas também em mastite subclínica (5,7%) estão em desacordo com diversos estudos (LANGONI et al, 1998; FERREIRO et al, 1985; COSTA et al, 1995) onde os isolamentos variaram de 1,3% a 3,8%. Porém, num estudo recente do Rio Grande do Sul, Wunder et al. (2003) demonstraram uma prevalência de 7,3% de *Nocardia* spp., com prevalência de 28,6% em mastite clínica. Isto demonstra a crescente importância deste agente em mastites, causando uma infecção muito refratária, geralmente caracterizada por quartos cronicamente endurecidos, com nódulos palpáveis, extensa fibrose e secreção purulenta, podendo evoluir para casos crônicos (PHILPOT et al, 1991). Um dado interessante é que 57,1% das amostras de *Nocardia* spp. deste estudo, foram isoladas de uma mesma propriedade, demonstrando que ela é altamente contagiosa e pode se tornar um problema grave. Além disso, em termos de saúde pública, um estudo demonstrou que linhagens de *Nocardia asteroides* isoladas de mastite foram resistentes aos processos de pasteurização empregados no país (COSTA et al., 1999).

Isolamentos de *Prototheca* sp., uma alga aclorofilada, está se tornando mais comum, porém com baixa prevalência, a exceção de casos com surto. Neste estudo, porém, a prevalência de 3,75% foi alta para este agente, já que em um trabalho recente (WUNDER et al., 2003), apenas 0,8% de amostras foram positivas para estes agente. Considerando ainda que houve isolamento em 05 propriedades diferentes, além da sua característica refratária e de fácil disseminação (CORBELLINI et al, 2001), preocupa a sua participação como um agente relevante em casos de mastite. Além disso, assim como a *Nocardia* spp., segundo Melville et al. (1999), algumas linhagens de *Prototheca zoopfi* foram resistentes aos processos de pasteurização, podendo ter implicações na qualidade do produto final e derivados.

De 240 amostras analisadas, apenas 32 apresentaram crescimento misto, sendo no máximo 02 agentes identificados sem que houvesse nenhuma amostra considerada contaminada (com 03 ou mais agentes bacterianos identificados). Já com relação ao crescimento misto no isolamento fúngico, 38,4% das amostras apresentaram isolamento de mais de uma espécie, sendo que em apenas 20% destas houve crescimento de mais de 03 espécies, podendo ser considerada a hipótese de contaminação. Isto mostra que a metodologia de coleta foi adequada, resultando em amostras de qualidade para o estudo.

Com relação ao TSA, o teste de difusão foi escolhido por ser um teste tanto qualitativo como quantitativo (FERREIRO et al, 1981b). Como mostra a **Figura 3**, pode-se verificar que; assim como afirmam os autores, as espécies de *Corynebacterium* spp. são fáceis de controlar (PHILPOT et al., 1991); espécies de Enterobactérias apresentaram uma boa sensibilidade (acima de 50%) apenas para 03 agentes, Gentamicina, Sulfazotrim e Tetraciclina, porém sabe-se que a Gentamicina possui baixa distribuição no úbere (ZIV, 1980); a Cloxacilina é um antimicrobiano com um grande número de produtos comerciais disponíveis, porém mostrou o pior resultado no TSA, além de possuir baixa distribuição no úbere (ZIV, 1980); concordando com os autores (SEARS et al., 2003), o *Staphylococcus aureus*, além de ser um agente difícil de controlar com medidas de manejo é também difícil de ser controlado por meio de antimicrobianos, já que apenas 04 agentes apresentaram uma sensibilidade para mais de 50% das amostras, sendo os melhores resultados com Ceftiofur, Cefoperazona e a associação de Penicilina com Novobiocina.

Dos 65 agentes leveduriformes identificados, a maior prevalência foi do gênero *Candida*, o que confirma os dados de diversos estudos (SANTOS et al., 2005; KUO et al., 1993; LAGNEAU et al., 1996; SWINNE et al., 1997; KRUKOWSKI et al., 2000). Como mostra a **Figura 5**, o gênero *Candida*, em casos de mastite clínica, fica atrás

apenas de espécies do gênero *Staphylococcus* e *Nocardia*. A grande maioria destes isolados foram em amostras de mastite subclínica, porém, considerando a maior incidência deste quadro de mastite, a análise estatística mostrou que o isolamento de agentes leveduriformes está mais relacionado com mastite clínica, como mostra a **Tabela 2**. Porém, ao comparar a tendência de crescimento de agentes bacterianos e leveduriformes nos diferentes quadros de mastite (**Figura 6**), a análise estatística mostra que a significância de tendência de crescimento bacteriano em amostras de mastite clínica é maior em relação aos outros quadros de mastite e em relação com o crescimento de leveduras e fungos semelhantes a leveduras.

Dos gêneros mais prevalentes de leveduras neste estudo, destaca-se o gênero *Pichia*, com relevância para a espécie *P. guilliermondii*, descrita como sendo de alta patogenicidade (KOTLIAR et al., 1990). Este gênero não é comumente isolado em amostras de leite (COSTA et al., 1993; LAGNEAU et al., 1996), porém neste estudo aparece como o segundo gênero mais isolado, com identificação de 06 espécies diferentes (**Tabela 6**) divergindo de resultados de diversos estudos (KRUKOWSKI et al., 2000; SWINNE et al., 1997), que mostram o gênero *Cryptococcus* e *Trichosporon* mais prevalentes, sendo que aqui ficaram em terceiro e sétimo lugar respectivamente (**Tabela 7**). Este estudo está mais de acordo com dados obtidos por Swinne et al. (1997), que identificaram o gênero *Pichia* como o mais prevalente, junto com *Candida*, mas com a frequência quase exclusiva de *P. kluyveri*. Neste estudo, foram identificados 11 gêneros de *Candida*, o que é similar ao estudo feito por Santos et al. (2005) que identificaram 09 espécies deste mesmo gênero.

Neste estudo, não foram feitas análises de amostras de leite de animais sadios. As literaturas sobre o assunto são discordantes. Swinne et al. (1997) analisaram amostras de animais com e sem mastite, e não isolaram nenhuma levedura das amostras

normais, afirmando que amostras coletadas assepticamente de quartos normais, tendem a ser negativas. Porém, Costa et al. (1993) relataram a ocorrência de mais de 30% de casos de mastite fúngica em animais com quartos normais, concordando com os resultados obtidos por Farnsworth et al. (1972), que relataram que as leveduras estão presentes na glândula mamária e na superfície do teto, em número adequado para o desenvolvimento de mastite, desde que haja outros fatores necessários para a instalação da infecção. Mas, segundo Robersons (2003), o leite estar aparentemente normal não significa que foi eliminada a infecção, portanto, deve-se estabelecer um bom protocolo de diagnóstico para coletar amostras de leite de animais sadios em propriedades com problemas de mastite, evitando assim erros na interpretação dos resultados.

Não houve crescimento de leveduras em 12 propriedades analisadas, o que está de acordo com os dados de Costa et al. (1993), que afirmaram que o fato de existir um número significativo de propriedades sem crescimento de leveduras, mostra que a metodologia de colheita de amostra foi efetiva.

Alguns dados com relação às propriedades são interessantes; em apenas 03 propriedades, de 16 com isolamento de leveduras, foram identificadas 56,9% das espécies isoladas. Em uma delas, em datas diferentes, foram isoladas as únicas duas amostras de *C. rugosa* do estudo, com alta contagem de UFC, além de 02 amostras de *P. guilliermondii*, mostrando que estes agentes estão presentes na propriedade e atuando como causadores de mastite, já que são agentes comprovadamente patogênicos (JENSEN et al, 1994; RICHARD et al, 1980; KOTLIAR et al, 1990). Em outra propriedade, foram isoladas as únicas 03 culturas puras de leveduras do estudo, como mostra a **Tabela 8**, todas de mastite subclínica, sendo duas delas com isolamento de *Picha* spp. e *Cryptococcus curvatus*, com alta contagem de UFC, sendo que houve mais um isolamento deste último agente, nesta mesma propriedade.

Não houve isolamento da espécie *Geotrichum candidum*, *Candida albicans*, *C. kefyi*, *C. krusei* ou *Cryptococcus neoformans*, apesar de estudos mostrarem a importância destes agentes nos casos de mastite (CHAHOTA et al., 2001; Costa et al., 1993). Porém, identificaram-se diversas outras amostras do gênero *Candida* e *Cryptococcus*, com potencial patogênico, e uma amostra de *Galactomyces geotrichum*, um teleomorfo do *G. candidum*, isolado de uma amostra juntamente com *S. uberis* e com contagem acima de 10 UFC/ml, assim como o agente bacteriano, apresentando crescimento positivo a 37°C e fraco em 40 e 42°C.

Nota-se que, apesar do menor número de isolados fúngicos com relação aos agentes bacterianos, houve um grande número de gêneros (10) e espécies identificadas (33). Estes dados estão de acordo com estudos anteriores (LAGNEAU et al, 1996; SWINNE et al, 1997; COSTA et al, 1993). Mas o que se verifica é que, apesar da disseminação de diversas espécies em algumas propriedades, em geral o problema é muito localizado, como mostram os dados acima citados. Além disso, a **Figura 4** mostra que, similar aos isolados bacterianos, apenas 04 gêneros foram responsáveis por 80% das espécies envolvidas.

A grande maioria das espécies aqui isoladas de fungo foi de amostras com crescimento misto com agentes bacterianos. Houve isolamento concomitante de *Nocardia* spp. com *Debaryomyces hansenii*, mas como todos os isolados deste último foram considerados como não patogênicos, é provável que sua presença seja apenas oportunista. Os agentes bacterianos mais comumente isolados nestes casos foram aqueles mais prevalentes em todo o estudo, gêneros *Staphylococcus* e *Corynebacterium*, o que confirma dados de Howard and Smith (2003), de que a infecção fúngica normalmente ocorre secundária ao dano inicial do parênquima mamário por bactérias.

Como resultado, são freqüentemente isoladas com *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. e no leite em fase de tratamento

A grande questão, que ainda fica sem uma resposta é se este dado, citado acima, realmente é verdadeiro. Diversos estudos citam que as leveduras são favorecidas com o crescimento bacteriano, ou com os tratamentos utilizados para o controle de bactérias. Krukowski et al. (2000) citam que largas doses de antimicrobianos levam a uma redução de vitamina A, causando danos ao úbere e facilitando a invasão fúngica. Farnsworth et al. (1974) afirmam que o maior risco para a ocorrência de mastite clínica fúngica é o uso de produtos e materiais contaminados, ao invés da estimulação por meio de antimicrobianos, em úberes com mastite subclínica já instalada. Costa et al. (1993) constataram que a terapia contra mastite bacteriana, não só é ineficiente em eliminar a infecção fúngica, como representa um dos mais importantes fatores de predisposição para a mastite fúngica, pois além dos problemas já citados anteriormente, elimina os agentes bacterianos, que com seu crescimento e multiplicação rápida, agem como competidores. Sendo assim, a presença de um grande número de casos de infecção mista neste estudo, pode ser uma conseqüência natural do que ocorre em grandes propriedades leiteiras, com uso indiscriminado de produtos antimicrobianos, levando muitas vezes a casos de mastite recorrente e crônica, causando a eliminação do animal. É importante ressaltar que não foram feitas análise de amostras de mastite crônica, pois tratamos aqui com propriedades exclusivamente leiteiras, de alta produção, onde estes animais, quando identificados, são prontamente eliminados.

A falta de isolados de fungos filamentosos neste estudo, está de acordo com os dados de Santos et al. (2005), onde nenhum fungo filamentoso foi identificado. Costa et al. (1993) explica que o fato de haver mais casos de mastite fúngica causada por leveduras, quando comparados com fungos filamentosos, é devido a melhor perpetuação

das leveduras na glândula mamária, além do fato de que algumas leveduras podem utilizar antimicrobianos, como penicilina e/ou tetraciclina como fonte de crescimento.

Existem poucos estudos que comparam o crescimento bacteriano com o crescimento fúngico, e mesmo quando são realizados, não há uma conclusão sobre a provável causa primária da mastite, apenas com citação de casos mistos e puros (SANTOS et al., 2005; KRUKOWSKI et al., 2000). Mesmo com a contagem de UFC feita neste estudo, é impossível definir a etiologia dos casos de mastite. Poucas amostras apresentaram baixo UFC, porém, Lagneau et al. (1996) mostraram que, em casos de mastite, a grande maioria das espécies isoladas apresentava uma contagem menor que 11 UFC/ml, e o restante entre 12 e 50 UFC/ml. Neste estudo, mais de 50% das amostras apresentaram uma contagem maior que 50 UFC/ml. Se considerarmos o que muitos autores concordam, que o crescimento em temperaturas altas (37°C – 42°C) pode ser um indicativo de patogenicidade (HOWARD AND SMITH, 2003; LAGNEAU et al., 1996), tem-se que apenas 05 amostras isoladas neste estudo não tiveram esta característica. Outras 21 amostras tiveram crescimento fraco em temperaturas elevadas, porém, mesmo com a exclusão destas amostras, ainda existem mais de 30 casos de mastite onde houve pelo menos uma espécie de levedura envolvida. Sendo assim, pode-se concluir que a contagem de UFC é um fator importante, como mostram Singh et al. (1998), mas acima de tudo, a ocorrência de casos de mastite fúngica está focada muito mais nos fatores que se referem à presença de agentes bacterianos, o tratamento inadequado com produtos antimicrobianos e a saúde do úbere em geral.

Produzir leite com qualidade e garantir que a qualidade se mantenha após o leite deixar a fazenda é o maior desafio que a indústria laticinista enfrenta em todas as regiões produtoras, segundo Heeschen et al. (1996). A grande variedade de fungos e, principalmente, leveduras isoladas em amostras de tanque de resfriamento de leite,

somado ao alto consumo de leite *in natura* no país (RUZ-PERES et al., 2004; SPANAMBERG et al., 2004) servem de alerta, principalmente pela capacidade de algumas leveduras em produzir toxinas e de colonizar a cavidade oral e intestinos, em humanos (STANOJEVIC et al., 2003), além das alterações que estes agentes podem causar na qualidade do leite, com prejuízos para a indústria. Chengappa et al. (1984) citam que mesmo como comensais, os fungos e leveduras não podem ser ignorados, já que existem inúmeros fatores que levam um fungo comensal que não causa danos a se tornar patogênico. Porém, também é grande o número de fatores que levam a contaminação de tanques desde a coleta do leite diretamente do úbere. Estabelecer a importância e prevalência dos fungos na saúde do úbere é extremamente importante. Diversos autores destacam que devemos começar a olhar com maior atenção para os casos de mastite causada por fungos (COSTA et al, 1993; KRUKOWSKI et al, 2000) principalmente pelo uso indiscriminado de produtos antimicrobianos. Lagneau et al. (1996) citam que a presença de agentes fúngicos no úbere é comum. Porém, a sua real importância e participação, com ou sem bactérias, na causa da mastite, continua sem esclarecimento, mas afirmam que se ao menos para algumas espécies de fungos, a associação com agentes bacterianos é necessária para provocar mastite, é de fundamental importância novos estudos e a continuidade da pesquisa.

Neste estudo, verificou-se a grande variedade de fungos existentes em casos de mastite no Rio Grande do Sul, concordando com estudos realizados em outros Estados. A presença marcante de agentes bacterianos e o fato de que agentes leveduriformes causem mastite bovina associada a outras condições intervenientes, principalmente na associação com bactérias, mostram a profunda e contínua mudança da etiologia das mastites, constituindo em problemas que devem ser considerados no desenvolvimento da pecuária leiteira.

De volta ao princípio, confirma-se a afirmação de Ferreiro (1978), de que a mastite é a doença infecciosa que mais mobiliza recursos para seu estudo. Após quase 30 anos, a situação não é muito diferente. Existe espaço a ser preenchido, existem respostas a serem esclarecidas, portanto, a continuidade da pesquisa é necessária para o progresso no conhecimento do complexo da mastite bovina.

## 6 CONCLUSÕES

- A mastite subclínica tem maior prevalência em propriedades leiteiras, portanto o diagnóstico periódico através do teste de CMT é imprescindível.
- A maioria das mastites infecciosas é de origem bacteriana, sendo que 80% dos isolados pertencem a apenas 03 gêneros diferentes.
- Agentes bacterianos como *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp. coagulase negativa e positiva e *Nocardia* spp. foram os mais prevalentes com reduzida ocorrência de *Streptococcus* spp., demonstrando a mudança que vem ocorrendo na etiologia da mastite em todo o mundo.
- O *Corynebacterium* spp. está mais relacionado com a mastite subclínica e a alta contagem de células somáticas, sendo comum seu isolamento em casos de infecção mista, principalmente com o *Staphylococcus* spp.
- Casos de mastites por *Nocardia* spp. vêm tendo maior destaque, com ocorrência concentrada principalmente em propriedades específicas, provando seu caráter contagioso e de difícil controle.
- Nos isolamentos micológicos, o gênero *Candida* foi o de maior prevalência neste estudo, porém é importante dar destaque para os gêneros *Cryptococcus*, *Rhodotorula* e principalmente ao gênero *Pichia*, o segundo mais isolado e que comprova seu potencial patogênico em casos de mastite bovina.

- Houve identificação de 10 gêneros e 33 espécies de agentes micológicos, porém apenas 04 gêneros foram responsáveis por 80% das espécies envolvidas. Os casos de mastite fúngica provaram ser localizados, já que um pouco mais de 50% das propriedades apresentaram algum isolamento fúngico e apenas uma propriedade não apresentou crescimento bacteriano.
- A ocorrência de casos de mastite fúngica está relacionada com a presença de agentes bacterianos, tratamento inadequado com produtos antimicrobianos e a saúde do úbere em geral.
- A mastite fúngica é um problema real em propriedades leiteiras, demonstrado pelo isolamento de leveduras em 16% das amostras com diagnóstico de mastite, neste estudo. Porém, por questões financeiras, o isolamento micológico como rotina laboratorial para diagnóstico de mastite, deva se restringir aos casos refratários ao tratamento com antimicrobianos e, principalmente, aos estudos com ênfase na etiologia da mastite bovina.

## REFERÊNCIAS

- AMARAL, L. A. Aspectos Epidemiológicos da Mastite Bovina. In: **III ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES**, FMVZ/UNESP. *Anais...* Botucatu, São Paulo, 1999.
- ANDERSON, B. J. **The epidemiology and pathogenesis of experimental staphylococcal and coliform mastitis in the mouse.** *Brazilian Veterinary Journal*, v.135, p.163-71, 1979.
- BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeast: Characteristics and Identification.** Cambridge University Press, 2000, 1139pp.
- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.** BUCHANAN, R. E.; GIBBONS, N. E. The William & Wilkins Company, Baltimore, 1974.
- BERRY, E. A.; HILLERTON, J. E. The effect os selective dry cow treatment on new intramammary infections. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 112-21, 2002.
- BRABES, K. C. S.; CARVALHO, E. P.; DIONÍSIO, F. L. et al. Participação de espécies coagulase positivas e negativas produtoras de enterotoxinas do gênero *Staphylococcus* na etiologia de casos de mastite bovina em propriedades de produção leiteira dos Estados de São Paulo e Minas Gerais. **Napgama**, v.2, n3, p.4-11, 1999.
- BRITO, J. R. F.; SOUZA, G. N.; BRITO, M. A. V. P., RUBIALE, L. Subclinical mastitis in two institutional dairy herds: a retrospective study (1994-2000). In: **International Symposium on Mastitis and Milk Quality, 2<sup>nd</sup>.** Proceedings... Vancouver: National Mastitis Council/American Association of Bovine Practitioners, 2001. p. 436-437.
- BRITO, M. A. V. P.; BRITO J. R. F. Produção científica brasileira sobre mastite bovina. In: Brito, J.R.F. and Bressan, M. Ed. **Controle integrado da mastite bovina.** Juiz de Fora: Embrapa/CNPGL. p. 68-96, 1996.
- CABRAL, K. G. *Leptospira* spp. como agente de mastite. In: **III ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES**, FMVZ/UNESP. *Anais...* Botucatu, São Paulo, 1999.
- CAMPEDELLI, F., O.; VIANA, S. S. .S.; MORITA, T. Mamite no gado leiteiro da cidade de Pindamonhangaba. **Biológico**, v.18, n5-6, p.118-24, 1977.
- CARTER, G. R.; COLE, J. R. Jr. **Diagnostic procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology.** New York: Academic Press, 1990; 620pp.
- CHENGAPPA, M. M.; MADDUX, R. L.; GREER, S. C. et al. Isolation and identification of yeasts and yeastlike organisms from clinical veterinary sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v.19, n.3, p.427-8, 1984.
- CHAHOTA, R.; KATOCH, R.; MAHAJAN, A. VERMA, S. Clinical bovine mastitis caused by *Geotrichum candidum*. **Veterinarski Arhiv**, v.71, n.4, p.197-201, 2001.

CORBELLINI, L. G.; DRIEMEIER, D.; CRUZ, C. DIAS, M. M., FERREIRO, L. Bovine mastitis due to *Prototheca zoopfi*: clinical, epidemiological and pathological aspects in a Brazilian dairy herd. **Tropical Animal Health and Production**, n.33, p.463-70, 2001.

COSTA, E. O. et al. Survey of bovine micotic mastitis in dairy herds in the state of São Paulo, Brazil. **Mycopathologia**, v.124, p.13-7, 1993.

COSTA, E. O., BENITES, N. R., MELVILLE, P. A. et al. Estudo etiológico da mastite clínica bovina. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v.17, p. 156-8, 1995.

COSTA, E. O., GARINO JR., F., WATANABE, E. T. et al. Proporção de ocorrência de mastite clínica em relação à subclínica correlacionada aos principais agentes etiológicos. **Napgama**, v.4, n.3, p.10-3, 2001.

COSTA, E. O., VIANI, F. C., WHITE, C. R. et al. Infectious bovine mastitis: prevalence of carries in dairy herds. In: **Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias**, 14, 1994, Acapulco. Proceedings... Acapulco, 1994. p. 45.

COSTA, E. O.; SILVA, J. A. B., RIBEIRO, M. G.; RAMOS E SILVA, E. O. T. Resistência à pasteurização rápida e lenta de cepas de mastite clínica e subclínica. **Napgama**, v.2, n.4, p.13-6, 1999.

DINGWELL, R. T.; LESLIE, K. E., SCHUKKEN, Y. H. et al. Evaluation of the California mastitis test to detect an intramammary infection with a major pathogen in early lactation dairy cows. **Canadian Veterinary Journal**, v.44, p.413-5, 2003.

FARNSWORTH, R. J. Significance of fungal mastitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.170, n.10, p.1173-4, 1977.

FARNSWORTH, R. J.; SORENSEN, D. K. Prevalence and species distribution of yeast in mammary glands of dairy cows in Minnesota. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v.36, p.329-32, 1972.

FARNSWORTH, R. J.; SORENSEN, D. K. The effect of penicillin, dihydrostreptomycin and prednisolone treatment of experimental *Candida krusei* infections of the mammary glands of dairy cattle. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v.39, p.340-8, 1974.

FERNANDES, J. C. T., MOOJEN, V., FERREIRO, L. Agentes etiológicos das mastites bovinas na bacia leiteira de Porto Alegre, RS, Brasil. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, vol. 1, n. 1, p. 41-6, 1973.

FERNANDES, J. C. T.; LOUZADA, C. A. R.; SILVA, M. Nota prévia sobre o Viamão Mastite Teste. In: **CONFERÊNCIA DA SOCIEDADE DE VETERINÁRIA DO RIO GRANDE DO SUL**, *Anais...* Porto Alegre; SOVERGS, 1967, p.17.

FERNANDES, J. C. T.; RHODEN, A.; EICKHOFF, F.; MORAES, I. M. A.; GOMES, M. J. P. Mastite bovina: microorganismos isolados no Rio Grande do Sul. In: **IV CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA**. *Anais...* Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 2001.

FERREIRO, L. Agentes etiológicos e terapêutica da mastite bovina no Brasil. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v.6, p.77-88, 1978.

FERREIRO, L., FERREIRO, C.L.R., BANGEL JR., J.J. et al. Mastite bovina na Grande Porto Alegre, RS – Brasil. 1. Agentes etiológicos isolados durante o período 1982-1985. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, n.13, p.81-88, 1985.

FERREIRO, L., SANTOS, E.C., SILVA, N. Ocorrência e etiologia da mastite bovina na Zona da Mata do Estado de Minas Gerais. **Arquivos da Escola de Veterinária UFMG**, v.33, p. 31-37, 1981.

FERREIRO, L.; BANGEL Jr., J. J.; FERNANDES, R. E.; COSTA, E. O. Mamite bovina fúngica causada por *Aspergillus fumigatus* (Sortoya fumigata). **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, n.17, p.81-5, 1989.

FERREIRO, L.; MELO, M. T. Susceptibilidade antimicrobiana de estafilococos, isolados de mastite bovina na Zona da Mata de Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.16, n.3, p.445-51, 1981b.

GOMES, M. J. P.; DRIEMEIER, D.; FERREIRO, L. **Ocorrência de casos de mastite por *Prototheca zopfii* em bovinos, no Rio Grande do Sul**. NAPGAMA. Ano II, v.4, 1999.

HAGAN AND BRUNER'S INFECTIOUS DISEASE OF SOME STC ANIMALS. Cornell University Press, 7<sup>th</sup> edition, 851p., 1981.

HARMON, R. J. Aspectos econômicos da mastite bovina. In: **SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE**, 1998, Curitiba. *Anais...* Curitiba:1998, p.36-9.

HARROP, M. H. V., PEREIRA, L. J. V., BRITO, J. R. F. et al. Incidência da mastite bovina na bacia leiteira da Zona Meridional Agreste de PE. **Pesq. Agropec. Bras., Ser. Vet.**, v.10, p. 65-67, 1975.

HEESCHEN, W. H. Bacteriological quality of raw milk. Legal requirements and payment systems. Situation in the EU and IDF member countries. International Dairy Federation. **Symposium on bacteriological quality of raw milk**. Wolfpassing, Austria: IDF, 1996. Proceedings... p. 1-18. 1996.

HOGAN, J. S.; SMITH, K. L., HOBLET, K. H. Field of survey of clinical mastitis in low somatic cell counts herds. **Journal of Dairy Science**, v.72, p.1547-56, 1989.

HOWARD, J. L.; SMITH, R. A. **Current veterinary therapy: food animal practice**. 4<sup>th</sup> ed. Edinburg: W.B. Saunders, 2003. 766p.

INNES, J. R. M.; SEIBOLD, H. R.; ARENTZEN, W. P. The pathology of bovine mastitis caused by *Cryptococcus neoformans*. **American Journal of Veterinary Research**, v.10, p.469-75, 1952.

JENSEN, H. E.; AALBAEK, B. Pathogenicity of yeasts and algae isolated from bovine mastitis secretions in a murine model. **Mycoses**, v.37, n.3-4, p.101-7, 1994.

KIRBY, W. M. M.; BAUER, A. W.; SHERRIS, J. C. **Antibiotic susceptibility testing by a standartized single disc method**. *Am. J. Clin. Pathol.*, v.45, p.493, 1966.

KORHONEN, H. Criteria for high quality milk - customer and industry demands. In: International Symposium on Professional Milk Extraction. Tumba, Suécia: Oy Alfa Laval Agri Scandinavia Ab Finland - Alfa Laval Agri AB Sweden, 1997. Proceedings... Helsinque: Oy Alfa Laval Agri Scandinavia Ab, p. 13-24, 1997.

KOTLIAR, A. N.; NAGORNAIA, S. S.; ZHAROVA, V. P. The effect of *Pichia guilliermondii* yeasts on the body of laboratory animals. **Mikrobiol Zh**, v.52, n.1, p.61-4, 1990.

KREGER-VAN RIJ, N. J. W. **The Yeasts: A Taxonomic Study**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1984, 1082p.

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

KRUKOWSKI, H.; SABA, L. Bovine mycotic mastitis. (A review). **Folia Veterinaria**, v.47, n.1, p.3-7, 2003.

KUO, C. C.; CHANG, C. H. Isolation of fungi from mastitis milk of dairy cattle. **Journal of Chinese Soc. Vet. Science**, v.19. n.4, p.284-7, 1993.

LAGNEAU, P. E.; LEBTAHI, K.; SWINNE, D. Isolation of yeasts from bovine milk in Belgium. **Mycopathologia**, v.135, p.99-102, 1996.

LANGENEGGER, J. et al. Estudo da incidência da mastite bovina na bacia leiteira do Rio de Janeiro. **Pes. Agropec. Bras.**, v.5, p. 437-440, 1970.

LANGONI, H. Complexidade Etiológica na Mastite Bovina. In: **III ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES**, FMVZ/UNESP. *Anais...* Botucatu, São Paulo, 1999.

LANGONI, H. et al. Aspectos etiológicos na mastite bovina: flora bacteriana aeróbia. **Pesq. bras. Med. Vet.**, v. 20, n. 5, p. 204-9, 1998.

LANGONI, H.; CABRAL, K. G.; TONIN, F. B. et al. Importância das leveduras na mastite bovina. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v.3, n.2, p.207-9, 1997.

LANGONI, H. et al. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite bovina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 43, p. 507-515, 1991.

McDONALD, J. S. Bovine mastitis: introductory remarks. **Journal of Dairy Science**, v.62, p.117-60, 1970.

MELVILLE, P. A.; WATANABE, E. T.; BENITES, N. R. et al. Evaluation of the susceptibility of *Prototheca zoopfi* to milk pasteurization. **Mycopathologia**, n.146, p.79-82, 1999.

METTIFOGO, E. Mastite por Micoplasmas: Epidemiologia e Controle. In: **III ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES**, FMVZ/UNESP. *Anais...* Botucatu, São Paulo, 1999.

MINAMI, P. S. et al. *Cryptococcus laurentii* em leite de vaca. Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 14, São Paulo, 1974. **Anais**. P. 113.

MONARDES, H. Contagem de células somáticas e melhoramento genético da resistência à mastite – Parte I. **Gado Holandês**, v. 59, n. 437, p. 38-42, 1995.

MORGAN, G. A.; GRIEGO, O. V.; GLOECKNER, G. W. **SPSS for Windows: an introduction to use and interpretation in research**. Mahwah: Lawrence Erlbaum Associates, 2001. p. 214.

NADER FILHO, A. et al. Prevalência e etiologia da mastite bovina na região de Ribeirão Preto, São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.5, p.53-56, 1985.

**NATIONAL MASTITIS COUNCIL (NMC)**. Laboratory Handbook on Bovine Mastitis. Madison, Revised Edition, 222p., 1999.

NEUFELD, P. M. **Manual de micologia medica - Técnicas básicas de diagnóstico**. Rio de Janeiro. Programa Nacional de Controle de Qualidade. 240p., 1999.

PANKEY, J. W.; NICKERSON, S. C.; BODDIE, R. L. HOGAN, J. S. Effects of *Corynebacterium bovis* infection on susceptibility to major mastitis pathogens. **Journal of Dairy Science**, v.68, n.10, p.2684-93, 1985.

PEARSON, J. K. L.; GREER, D. O.; SPENCE, B. K. The relationship between bulk milk cell counts and cow and quarter mastitis incidence. **The Veterinary Record**, v.88, p.488-94, 1971.

PHILPOT W. N.; NICKERSON, S. C. **Mastitis: counterattack**. Naperville: Babson Bros., 1991. 150 p.

PIANTA, C. Mastite Bovina por Fungos e Leveduras. In: **III ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES**, FMVZ/UNESP. *Anais...* Botucatu, São Paulo, 1999.

PINHEIRO, E. S. *Campylobacter jejuni* x mastite. In: **III ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES**, FMVZ/UNESP. *Anais...* Botucatu, São Paulo, 1999.

POCIECHA, J. Z. Influence of *Corynebacterium bovis* on constituents of milk and dynamics of mastitis. **The Veterinary Record**, v.16, p.628, 1989.

RADOSTITIS, O.M., LESLIE, K.E., FETROW, J. Mastitis control in dairy herds. In: RADOSTITIS, O.M., LESLIE, K.E., FETROW, J. **Herd health food animal production medicine**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1994. p.229-276.

RANJAN, R.; SWARUP, D.; PATRA, R. C.; NANDI, D. Bovine protothecal mastitis: a review. **CAB reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary, Sciences, Nutrition and Natural Resources**, v.1, n.17, p.1-7, 2006.

RICHARD, J. L. *et al.* Identification of yeast from infected bovine mammary glands and their experimental infectivity in cattle. **Am. J. Vet. Res.**, v.12, p.1991-94, 1980.

ROBERSONS, J. R. Establishing treatment protocols for clinical mastitis. **Vet. Clin. Food Anim.**, v. 19, p. 223-34, 2003.

RUEGG, P. L. Investigation of mastitis problems on farms. **Vet. Clin. Food Anim.**, v. 19, p. 47-73, 2003.

RUZ-PERES, M.; YOKOYA, E.; PASSARELLI, D. *et al.* Pesquisa de fungos no leite de tanques de refrigeração de propriedades de exploração leiteira. Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo, v.71, (supl.), p.663-5, 2004.

SANTOS, M. V. Contagem de células somáticas e qualidade do leite e derivados. In: **SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE PRODUÇÃO INTENSIVA DE LEITE**, 2001, Belo Horizonte. *Anais...*São Paulo: Instituto Fernando Costa, 2001, p.115-27.

SANTOS, R. C.; MARIN, J. M. Isolation of *Candida* spp. from mastitic bovine milk in Brazil. **Mycopathologia**, v.159, p.215-3, 2005.

SCHÄELLIBAUM, M. Efeitos de altas contagens de células somáticas sobre a produção e qualidade de queijos. In: **SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE**, 2000, Curitiba. *Anais...*Curitiba:2000, p.21-6.

SCHALM, O. W.; CARROLL, E. J.; JAIN, N. C. **Bovine Mastitis**. Philadelphia, 1 ed., 1971.

SEARS, P. M.; MCCARTHY, K. K. Management and treatment of staphylococcal mastitis. **Veterinary Clinics Food Animal Practice**, v. 19, p. 171-85, 2003.

SINGH, P.; SOOD, N.; GUPTA, P. P. *et al.* Experimental candidal mastitis in goats: clinical, haematological, biochemical and sequential pathological studies. **Mycopathologia**, v.140, p.89-97, 1998.

SPANAMBERG, A.; HARTFELDER, C.; FUENTEFRIA, A. M.; VALENTE, P. Diversity and enzyme production by yeasts isolated from raw milk in Southern Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, n.3, p.195-9, 2004.

STANOJEVIC, S.; KRNJAJIC, D. Yeast mastitis in cows. **Internet Journal of Food Safety**, v.1, p.8-10, 2003.

SWINNE, D.; DEKA, K. E.; ASSOGBA, A.; DESMET, P. Identification of yeasts from individual farm tank milk samples in Belgium. **Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift**, v.66, p.129-30, 1997.

THIERS, F. de O.; BENITES, N. R.; RIBEIRO, A. R., COSTA, E. O. Correlação entre contagem direta de células somáticas e o teste de “California Mastitis Test” (CMT) no leite de vacas. **Napgama**, v.2, n.4, p.9-12, 1999.

TUCKER, E. W. Case reports on yeast infections of the bovine udder. **Cornell Veterinarian**, v. 44, p.79-85, 1954.

WILSON, D. J.; DAS, H. H.; GONZALEZ, R. N.; SEARS, P. M. Association between management practices, dairy herd characteristics, and somatic cell count of bulk tank milk. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.210, p.1466-1469, 1997.

WUNDER JÚNIOR, E. A.; DENICOL, A. C.; SOUZA, S. R. S.; FERNANDES, J. C. T.; ASANOME, W.; FERREIRO, L. Mastite Bovina: agentes identificados no Rio Grande do Sul. In: XV SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS, 2003. **Anais...** Porto Alegre - RS. 2003.

YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance, and identification of yeasts. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The Yeasts: A Taxonomic Study**. Elsevier Science, Amsterdam, p.77-100, 1998.

ZIV, G. Drug selection and use in mastitis: systemic vs local therapy. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.176, n.10, p.1109-15, 1980.