



MARCOS TÚLIO BARCELOS LIMA

**SUSCEPTIBILIDADE DE LEVEDURAS ISOLADAS DE
MASTITE BOVINA A ANTIMICROBIANOS**

**LAVRAS - MG
2021**

MARCOS TÚLIO BARCELOS LIMA

**SUSCEPTIBILIDADE DE LEVEDURAS ISOLADAS DE MASTITE BOVINA A
ANTIMICROBIANOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Sanidade Animal e Saúde Coletiva, para a obtenção do título de mestre.

Prof. Dr. Geraldo Márcio da Costa
Orientador

**LAVRAS – MG
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Lima, Marcos Túlio Barcelos.

Susceptibilidade de leveduras isoladas de mastite bovina a antimicrobianos / Marcos Túlio Barcelos Lima. - 2021.

43 p.

Orientador(a): Geraldo Márcio da Costa.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Resistência antimicrobiana. 2. Mastite fúngica. 3. Infecções intramamárias. I. Costa, Geraldo Márcio da. II. Título.

MARCOS TÚLIO BARCELOS LIMA

**SUSCEPTIBILIDADE DE LEVEDURAS ISOLADAS DE MASTITE BOVINA A
ANTIMICROBIANOS**

**ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF YEASTS ISOLATED FROM BOVINE
MASTITIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Sanidade Animal e Saúde Coletiva, para a obtenção do título de mestre.

APROVADA em 28 de outubro de 2021.

Dr Geraldo Márcio da Costa

FZMV/UFLA

Dr^a Ana Paula Peconick

FZMV/UFLA

Dr^a Elaine Maria Seles Dorneles

FZMV/UFLA

Dr. Ulisses de Pádua Pereira

UEL/PR

Geraldo Márcio da Costa

Prof. Dr. Geraldo Márcio da Costa

Orientador

**LAVRAS – MG
2021**

A Deus, pela dádiva da vida e por ter me concedido essa vitória.

Aos meus pais, Marcos Antônio Lima e Eliana de Fátima Barcelos Lima, que por uma vida de dedicação, amor e trabalho sempre possibilitaram a seus filhos a oportunidade de realizar sonhos e conquistas como esta. Meu amor e gratidão por vocês transcende qualquer barreira de tempo e espaço.

Às minhas irmãs Ana Carolina Lima e Ana Luísa Barcelos Lima, exemplos de dignidade, bondade e caráter, pelo apoio e incentivo contribuindo para a realização de mais esse sonho. Vocês serão sempre meus exemplos de superação, generosidade e bondade, obrigado por despertarem sempre o melhor de mim.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Nossa Senhora Aparecida em primeiro lugar, por me abençoar grandemente, me iluminar e guiar meus passos em todos os momentos.

Aos meus pais e irmãs, pelo companheirismo, preocupação e amor incondicional em todos os momentos da minha vida. Obrigado por sonharem junto comigo e permitirem que mais esse sonho tornasse realidade. Obrigado pelo incentivo à minha progressão intelectual, pois foi através da educação e amor que recebi em casa que alcancei esta conquista.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram a janela que hoje vislumbro um horizonte superior, eivado pela acendrada confiança no mérito e ética aqui presentes.

Ao meu orientador Dr. Geraldo Márcio da Costa, por sua constante orientação, sempre de forma educada e com muita paciência, por seus ensinamentos imprescindíveis para minha vida profissional. Obrigado pelos “puxões de orelha” e principalmente pela amizade construída durante este tempo.

Aos professores da UFLA, em especial aqueles pertencentes ao corpo docente do Departamento de Medicina Veterinária, pela transmissão do conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade da educação no processo de formação profissional, por tanto que se dedicaram a mim, não somente por terem me ensinado, mas por terem me feito aprender e crescer. A palavra mestre, nunca fará justiça aos professores dedicados aos quais sem nominar terão os meus eternos agradecimentos.

Às minhas professoras, Ana Paula Peconick e Priscilla Barrios Chalfun, que sem sombra de dúvida posso chamar de MELHORES. Meu muito obrigado por me ouvirem, me instruírem e incentivarem a participar do processo seletivo do mestrado, por me aceitarem como aluno especial como teste para conciliar o mestrado com a segunda graduação, saibam que foi fundamental para minha tomada de decisão.

Agradeço a todo o Núcleo de Estudos em Microbiologia Veterinária (NEMIV), a Gláucia Frasnelli Mian, pela parceria, por me ouvir, me ensinar e conduzir o NEMIV nos 2 anos que estive como membro, em especial a Vanessa Mendieta Reis, que esteve sempre presente principalmente na condução do NEMIV, obrigado pela amizade sincera, pela reciprocidade, lealdade tenho muito orgulho de você, sei que vai trilhar caminhos incríveis. Ao Ítalo de Oliveira Prata e Hugo Martins, por serem amigos fiéis e me proporcionarem momentos incríveis não somente dentro do grupo de estudos, mas fora dele e até mesmo fora da UFLA,

obrigado pelo suporte, vocês são foda, tenho certeza que nossa amizade será duradoura e ainda curtiremos muito.

À minha querida amiga Dircéia, pela grande contribuição, apoio e momentos de descontração durante a coleta e tabulação de dados, além claro, das incansáveis análises laboratoriais. Obrigado por me ensinar tanto, sem sombra de dúvidas você é uma das pessoas mais guerreiras que já conheci e me sinto lisonjeado em ter você como amiga. Obrigado por ter contribuído de forma significativa para a realização deste trabalho, graças a você foi possível a concretização desse sonho que parecia tão distante.

Ao meu amigo Daniel Martimiano, que tanto me ajudou, com as caronas nos sábados e feriados, com os conselhos e incansáveis ensinamentos na lida do laboratório de bacteriologia. Sem sombra de dúvidas você fez toda a diferença para o meu aprendizado. Meu muito obrigado pela paciência, principalmente na confecção do RPMI, rs.

À equipe do Laboratório de Epidemiologia Molecular (LEM), Tuane, Rafa Andrade, Marina Martins, Amanda, Carine, Maysa, Anna Cecília, que sempre me acolheram, em especial a Erika Oliveira, sempre presente, paciente e solícita. À professora Elaine que me ajudou muito, não somente com material que precisei para o meu experimento, mas com conselhos, puxões de orelha e por despertar em todos nós uma paixão pela pesquisa, pois percebemos o quanto ela leva a sério e o tanto que torce por todos nós, nesse meio acadêmico.

Aos meus amigos da segunda graduação Daniela Aoki, Letícia Castro, Mônica Faria, Lucas Cruz e Aline Tosta pelo carinho, compreensão e incentivo. O meu muito obrigado a vocês que me ensinaram exercer a profissão de forma ética, com honestidade e competência para que o sucesso seja uma consequência, além de dividirem comigo o mesmo sonho de um dia nos tornarmos “Médicos Veterinários” contribuintes da sanidade animal, contribuindo assim com o bem social do país.

Às minhas queridas amigas Angélica do Carmo Alves, Daniela Aoki Heredia e Camila de Oliveira Costa Ferreira de Carvalho, pelo apoio emocional e financeiro, pela paciência, pelos conselhos e incentivo e principalmente por não me deixarem desistir. A minha admiração por vocês só tende a crescer, e o orgulho, claro, vocês fizeram toda a diferença nesta difícil caminhada. Gratidão por estarem comigo sempre.

Aos meus amigos e amigas de Oliveira, que fizeram as idas à minha terra amada, momentos inesquecíveis e de mais pura descontração, em especial o meu xodó Luís Henrique Nascimento Pacheco e os amigos de infância da Alexandre Queiroz.

Aos meus amigos mais próximos e que se fizeram presentes nessa etapa, como a Fernanda Silva Pinto (feg), essa batalhadora que me deu apoio, incentivo nas horas difíceis, de

desanimo e cansaço, me fazendo ter uma percepção diferente dos desafios. Ao meu irmão de vida Lucas Eduardo Urias Campos, que compartilhei meus momentos de agonia, medo e incertezas e me acolheu e aconselhou, pelo simples fato de me querer bem, pelo fato de ser um “estudante” adulto e saber o peso emocional que carregamos ao optarmos pela segunda graduação, me fazendo entender mais sobre esse processo e me fazendo olhar com mais carinho e me orgulhar de toda a minha trajetória. Minha amiga Rackel Silva, que me acompanha desde a primeira graduação e que mesmo distante me incentivou e acreditou sempre em mim e no meu sonho, às vezes, mais do que eu mesmo pude acreditar. Mostrou-me que mesmo de longe podemos fazer mais por aqueles que amamos, muito obrigado minha querida, te amo!

Ao amigo Felipe Tomita Ianni, por torcer sempre por mim, pelo exemplo de amizade verdadeira, lealdade e positivismo sempre. Obrigado por se fazer tão presente mesmo de longe, pelos momentos de descontração, espero que possamos sempre fazer parte da vida um do outro.

A toda a minha família (tias, madrinhas, primos), aos amigos e colegas de sala, que nunca me deixaram desistir desse sonho que parecia tão distante, mas que hoje se tornou realidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Muito obrigado!

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.” (José de Alencar).

RESUMO

A mastite bovina é uma das doenças mais prevalentes e impactantes na pecuária leiteira em nível mundial. Trata-se de uma enfermidade de cunho multifatorial, causada por diferentes microrganismos. Entre estes, as leveduras são agentes incomuns, mas considerados emergentes por diversos pesquisadores. Considerando a importância crescente que estes agentes apresentam na etiologia da mastite nos rebanhos, é de grande relevância determinar o perfil de suscetibilidade dos mesmos aos antimicrobianos, buscando aprofundar o conhecimento da epidemiologia das mastites ocasionadas por estes agentes e de novas alternativas para o seu tratamento e controle. No presente estudo, 56 cepas de leveduras isoladas de casos de mastite em rebanhos bovinos de Minas Gerais foram avaliadas quanto aos perfis de suscetibilidade a antimicrobianos, utilizando-se a técnica de concentração inibitória mínima (CIM). Foram testados os antifúngicos anfotericina B, fluconazol, 5-FC flucitosina, itraconazol, posaconazol, ravuconazol, e voriconazol. Altos níveis de resistência e multirresistência foram observados para os antimicrobianos na população estudada. Os índices globais de resistência verificados foram: anfotericina B (89,28%), itraconazol (76,78%), ravuconazol (67,85%), fluconazol (51,78%), posaconazol (41,07%), fluocitocina (37,5%) e voriconazol (28,57%). Verificou-se que 21,42% dos isolados foram multidroga-resistentes. O estudo aponta a necessidade de permanente monitoramento da resistência entre os agentes micóticos causadores da mastite, a fim de mitigar o problema da resistência e suas implicações na saúde coletiva.

Palavras-chave: Infecções intramamárias. Resistência antimicrobiana. Antifúngicos. Teste de susceptibilidade. Mastite fúngica. Concentração inibitória mínima (CIM).

ABSTRACT

Bovine mastitis is one of the most prevalent and impacting diseases in dairy farming worldwide. The disease is considered to have multifactorial nature and is caused by different microorganisms. Among these organisms, yeasts are uncommon agents but they can be considered emerging agents by several researchers. Considering the growing importance that these agents have in the etiology of mastitis in herds, it is of great importance to determine their susceptibility profile against to antimicrobials, seeking to deepen the knowledge related to epidemiology of mastitis caused by these agents and of new alternatives for its treatment and control. In the present study, 56 yeasts strains isolated from cases of mastitis in cattle herds from Minas Gerais were evaluated for antimicrobial susceptibility profiles, using the minimal inhibitory concentration (MIC) technique. The isolates were tested against amphotericin B, fluconazole, 5-FC flucytosine, itraconazole, miconazole, natamycin, posaconazole, ravuconazole and voriconazole. High levels of resistance and multidrug resistance were observed for antimicrobials in the studied population. The overall resistance rates observed were: amphotericin B (89.28%), itraconazole (76.78%), ravuconazole (67.85%), fluconazole (51.78%), posaconazole (41.07%), fluocytocin (37.5%) and voriconazole (28.57%), and. It was found that 21.42% of the isolates were multidrug-resistant. The study points to the need for permanent monitoring of resistance among mycotic agents that cause mastitis, to mitigate the problem of resistance and its implications to public health.

Key words: Intramammary infections, antimicrobial resistance, antifungals agents, susceptibility test, fungal mastitis, minimum inhibitory concentration (MIC).

LISTA DE SIGLAS

CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
CIM	Concentração inibitória mínima
CCS	Contagem de células somáticas
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
IIM	Infecções intramamárias

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Identificação de leveduras isoladas de infecções intramamárias de bovinos por meio da técnica de MALDI-TOF MS e testes bioquímicos.	28
Tabela 2- Antifúngicos utilizados nos testes de suscetibilidade de leveduras isoladas de mastite bovina, faixas de concentrações testadas e respectivos pontos de cortes utilizados.	30
Tabela 3 – Pontos de Corte de acordo com CLSI (2012 e 2008) e MIC 50 e MIC 90 dos antifúngicos frente às cepas estudadas.	32
Tabela 4. Suscetibilidade de leveduras isoladas de amostras de leite de vacas com mastite em rebanhos bovinos do sul de Minas Gerais no período entre 2004 - 2018, para anfotericina B, flucitosina, fluconazol, itraconazol, posaconazol, ravuconazol e voriconazol.	35

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Resultado dos testes de MIC50 e MIC90 para o antifúngico anfotericina B frente a leveduras isoladas da mastite bovina.....	32
Gráfico 2 – Resultado dos testes de MIC50 e MIC90 para o antifúngico anfotericina B frente a leveduras isoladas da mastite bovina.....	33
Gráfico 3 – Resultado dos testes de MIC50 e MIC90 para o antifúngico ravuconazol frente a leveduras isoladas da mastite bovina.....	33
Gráfico 5 – Resultado dos testes de MIC50 e MIC90 para o antifúngico posaconazol frente a leveduras isoladas da mastite.....	33
Gráfico 4 – Resultado dos testes de MIC50 e MIC90 para o antifúngico fluconazol frente a leveduras isoladas da mastite bovina	33
Gráfico 7 – Resultado dos testes de MIC50 e MIC90 para o antifúngico voriconazol frente a leveduras isoladas da mastite bovina	34
Gráfico 6 – Resultado dos testes de MIC50 e MIC90 para o antifúngico flucitosina frente a leveduras isoladas da mastite bovina	34

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	Mastite Bovina.....	17
2.2	Microrganismos envolvidos na etiologia da mastite bovina	19
2.3	Mastite micótica	20
2.4	Doenças fúngicas invasivas em humanos.....	21
2.5	Tratamento da mastite micótica.....	22
2.6	Avaliação da resistência aos antifúngicos	23
2.7	Mecanismos de ação dos antifúngicos.....	25
3	HIPÓTESE	26
4	OBJETIVOS	27
4.1	Geral.....	27
4.2	Específicos	27
5	MATERIAL E MÉTODOS	27
5.1	Microrganismos estudados.....	27
5.2	Testes de suscetibilidade a antifúngicos	28
5.3	Estatística	31
6	Resultados	31
7	DISCUSSÃO	36
8	CONCLUSÕES	39
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

1 INTRODUÇÃO

A pecuária leiteira é um setor que possui relevância na economia mundial, sendo esta de suma importância para o Brasil que tem grande destaque na produção de leite, ocupando a 4ª maior posição no cenário mundial, com produção equivalente a 35 bilhões de litros anuais e com potencial para produção de 46,7 bilhões de litros em consequência da crescente demanda mundial de leite e produtos lácteos de qualidade (ANUALPEC, 2019). No entanto, para se alcançar tal produção, exige-se uma melhor estruturação por parte de produtores e a melhoria das condições sanitárias dos rebanhos. No que se refere à melhoria das condições sanitárias, é fundamental o controle de doenças economicamente relevantes, tal como a mastite que impacta a produtividade dos rebanhos e a qualidade do leite produzido no país.

A mastite bovina é uma doença de ocorrência mundial, de múltipla etiologia, que decorre de um desequilíbrio na relação entre hospedeiro, o meio ambiente e seus agentes etiológicos. Essa enfermidade que acomete todos os mamíferos é considerada a doença infecciosa mais prevalente e impactante economicamente para a bovinocultura leiteira em todo o mundo (RUEGG, 2017). Dentre os prejuízos causados por essa enfermidade, destacam-se a queda na produção de leite, descarte prematuro de fêmeas com alto valor zootécnico, gastos com a aquisição de medicamentos e com o manejo extra de técnicos especializados, descarte de leite contaminado com resíduos de antimicrobianos, prejuízos em lactações futuras em razão da perda de área funcional do tecido mamário e até mesmo óbito ocasional de animais. Vários são os agentes envolvidos na etiologia das infecções intramamárias (IIM), incluindo vírus, bactérias, algas e fungos (LEBLANC *et al.*, 2006). Sabe-se que os processos infecciosos das glândulas mamárias são causados principalmente por microrganismos de origem bacteriana e, secundariamente, por fungos, algas, leveduras e vírus, muitos deles dotados de potencial zoonótico.

Leveduras são agentes incomuns na etiologia da mastite bovina, mas considerados emergentes, pois apesar dos fungos filamentosos e leveduras estarem amplamente distribuídos na natureza, são esporadicamente isolados de casos de mastite em si comparados com as bactérias (SPANAMBERG *et al.*, 2008a). Embora o número de casos de mastite ocasionados por esses agentes seja baixo, eventualmente podem ser observados surtos que geram grandes prejuízos, com a agravante da ausência de protocolos terapêuticos efetivos. Geralmente, as IIM ocasionadas por estes agentes estão

relacionadas às falhas no manejo sanitário em rebanhos intensivamente manejados, submetidos a tratamento com antimicrobianos intramamário repetitivo, o que reflete negativamente na qualidade do leite e gera grandes prejuízos econômicos aos produtores (COSTA *et al.*, 2012).

Estratégias para o controle das IIM e da resistência aos antimicrobianos tem sido objeto de estudo dos programas de controle de qualidade do leite no mundo todo, meta esta que pode ser atingida com ações específicas de profilaxia e controle direcionadas a esses agentes infecciosos (ESTRELA, 2018). Pensando nesse plano para controle e profilaxia, encontramos diversos obstáculos como, por exemplo, o elevado número de fatores de virulência e mecanismos de evasão do sistema imune dos patógenos causadores da mastite bovina e as dificuldades de tratamento das mastites, problema agravado pelo incremento da resistência aos antimicrobianos, devido ao uso desregulado e de forma indiscriminada desses medicamentos.

A determinação do perfil de susceptibilidade de leveduras aos antifúngicos, aferindo-se as concentrações inibitórias mínimas, poderá permitir novas abordagens terapêuticas para as mastites micóticas, bem como a vigilância da resistência aos antimicrobianos neste grupo de patógenos de grande relevância na saúde coletiva.

Esse projeto tem por objetivo determinar o perfil de suscetibilidade de leveduras isoladas de IIM de bovinos aos alguns antifúngicos usualmente empregados na terapia de infecções micóticas em seres humanos e em animais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Mastite Bovina

A palavra mastite, advém do grego “mastos”, que significa glândula mamária, e o sufixo “ite” que corresponde a inflamação, ou seja, esta enfermidade se caracteriza por uma inflamação da glândula mamária (SANTOS; FONSECA, 2019). Trata-se de uma doença de ocorrência mundial, de múltipla etiologia e que acomete diferentes espécies, a saber, animais domésticos produtores de leite, sendo o bovino de leite a espécie mais comumente afetada (GOMES; HENRIQUES, 2016). Conforme a intensidade dos sinais clínicos, a mastite é classificada como clínica ou subclínica. Na mastite clínica, observa-se resposta inflamatória mais severa que resulta em alterações no leite (pus, grumos, sangue), além de alterações inflamatórias visíveis no úbere (calor, rubor, dor, tumor,

perda de função), e alguns casos, sinais sistêmicos, podendo apresentar febre, anorexia, hiperemia, prostração que pode culminar com o óbito do animal afetado. Na mastite subclínica, por sua vez, não são observadas reações alterações macroscópicas detectáveis no animal ou leite, ocorrendo alterações na composição físico-química e microbiológicas no leite (SANTOS; FONSECA, 2019).

Com relação aos agentes etiológicos, as mastites podem ser classificadas como ambientais ou contagiosas. A mastite contagiosa é usualmente causada por microrganismos presentes na glândula mamária e sua transmissão para outros animais ocorre durante a ordenha, seja pela ordenhadeira ou mesmo pelas mãos do ordenhador. Já a mastite ambiental é causada por patógenos oportunistas presentes no ambiente em que vivem os animais (SANTOS; FONSECA, 2019). Dentre os microrganismos considerados contagiosos, temos como principais *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* sendo a sua fonte predominante a glândula mamária das vacas infectadas. No que se refere à mastite ambiental, a fonte principal dos patógenos é o próprio ambiente em que o animal se encontra, tendo como principais agentes *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis* e *Klebsiella* spp. (BOGNI *et al.*, 2011).

A relevância econômica da mastite bovina deve-se à grande prevalência da mesma nos rebanhos do mundo inteiro, sendo considerada a enfermidade que mais onera a criação e a produção de leite, causando queda na produtividade, aumento de custos com medicamentos e assistência técnica, descarte de leite de vacas em tratamento com antibióticos, depreciação da qualidade do produto, podendo ocasionar o descarte precoce ou até mesmo o óbito dos animais de grande valor zootécnico em casos mais graves (MESQUITA; FERRARI, 2020). Esta enfermidade é um dos principais entraves encontrados na produção de leite, causando grande prejuízo para os produtores, afetando a quantidade e a qualidade do leite produzido, com consequências na cadeia produtiva dos derivados lácteos. Uma das principais consequências é a alteração dos componentes do leite, como o aumento do número da contagem de células somáticas (CCS), interferindo no rendimento industrial e na vida útil de prateleira do leite, pois quanto maior a CCS, menor a vida de prateleira dos produtos lácteos (SANTOS; FONSECA, 2019).

Além dos aspectos econômicos supracitados, a mastite representa um risco potencial à saúde pública, tendo em vista que é a doença que mais demanda tratamento com antimicrobianos na propriedade leiteira, seja para sua prevenção ou controle, aumentando o risco de eliminação de resíduos no leite e o incremento nos níveis de

resistência dos patógenos com potencial zoonótico (VLIEGHER, S *et al.*, 2012). Esses resíduos vão gerar problemas na indústria, interferindo com os processos fermentativos, e problemas na saúde do consumidor, pois, o ser humano pode ter contato com essas bactérias resistentes selecionadas no ambiente da pecuária, por meio da atividade ocupacional ou por meio dos alimentos, além dos riscos relacionados a ingestão de alimentos contendo resíduos de antimicrobianos (MONARDES *et al.*, 2004; SANTOS; FONSECA, 2019).

No que concerne à produção de lácteos e derivados, o produto final pode ser alterado caso haja contaminação por leveduras presentes no leite que podem ser oriundas de contaminação do produto no pós-ordenha ou de IIM. A presença destes agentes causa alterações organolépticas no leite e derivados devido à produção de enzimas lipídicas e proteolíticas, bem como derivados metabólicos produzidos. Desta forma, os alimentos lácteos podem se tornar veiculadores de uma gama de agentes patogênicos, com potencial para gerar problemas na saúde coletiva (SPANAMBERG *et al.*, 2008a).

2.2 Microrganismos envolvidos na etiologia da mastite bovina

A mastite bovina é de cunho multifatorial, podendo ter origem tóxica, traumática, metabólica, alérgica e infecciosa, sendo esta última a mais comum (SANTOS; FONSECA, 2019). Diversos microrganismos podem estar envolvidos na etiologia desta doença infecciosa, no entanto, os agentes mais relevantes são primariamente de origem bacteriana e, secundariamente, fungos, algas e vírus (LEBLANC *et al.*, 2006). Estes agentes podem ser classificados como contagiosos ou ambientais, conforme o reservatório principal seja o animal ou o ambiente, respectivamente. Contudo, este critério de classificação não é absoluto, com a existência de um comportamento dual, tanto ambiental quanto contagioso, para a maioria dos patógenos causadores da mastite (G. COSTA, comunicação pessoal). Tal fato está relacionado com a grande heterogeneidade populacional destes microrganismos, o que torna o controle desta enfermidade ainda mais complexo.

Entre os agentes considerados ambientais, destacam-se os coliformes e *Streptococcus uberis* e, ocasionalmente algas e fungos (CARVALHO-CASTRO *et al.*, 2017). Entre estes, sobressaem espécies dos gêneros *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* e, principalmente, *Candida* (COSTA *et al.*, 2012; SANTOS; MARIN, 2005; DWORECKA-KASZAK *et al.*, 2012; KRUKOWSKI *et al.*, 2006).

O estudo das micoses em seres humanos e animais tem adquirido grande relevância pelo fato de muitas espécies de fungos anteriormente considerados não patogênicos terem se mostrado como agentes oportunistas (SPANAMBERG *et al.*, 2008a). Em seres humanos, infecções micóticas invasivas constituem importante causa de morbidade e mortalidade de indivíduos pertencentes a grupos de alto risco (LEWIS, 2012). Entre estes microrganismos destacam-se diferentes espécies do gênero *Candida* que tem participação em diferentes afecções em animais de produção e de companhia (GALIZA *et al.*, 2014).

2.3 Mastite micótica

As leveduras pertencem ao grupo de microrganismos unicelulares ubíquos presentes no ambiente e são considerados oportunistas da glândula mamária, pois, normalmente colonizam a pele do úbere e dos tetos, mãos dos ordenhadores e mesmo que em pequenas quantidades, são capazes de induzir um processo inflamatório no úbere dos animais acometidos (SANTOS, R. DE CASSIA; MARIN, 2005; KRUKOWSKI *et al.*, 2006). De modo geral as leveduras são saprófitas, sendo comumente isoladas dos tanques de armazenamento de leite de animais sadios quanto em amostras de leite provenientes de animais acometidos pela mastite (KRUKOWSKI *et al.*, 2006; RUZ-PERES, 2005; SPANAMBERG *et al.*, 2018a).

A mastite micótica é considerada emergente, sendo as leveduras, principalmente do gênero *Candida*, os agentes mais comumente envolvidos em sua etiologia. Geralmente este tipo de mastite ocorre em forma de surtos localizados e/ou após tratamentos de longa duração com antimicrobianos (CHAHOTA *et al.*, 2001; COSTA *et al.*, 2012). Várias espécies deste gênero têm sido isoladas de mastite clínica, como por exemplo *C. glabrata* e *C. krusei*. Na mastite subclínica, verifica-se uma diversidade de espécies como *C. zeylanoides*, *C. norvegica*, *C. viswanathii*, *C. guilliermondii* e *C. tropicalis* (ZARAGOZA *et al.*, 2011).

A mastite micótica está associada a fatores inerentes ao ambiente em que o animal vive, substratos orgânicos, ao ordenhador, a ordenhadeira mecânica, entre outros equipamentos que se encontram em condições higiênicas consideradas inadequadas e podem entrar em contato com a glândula mamária possibilitando a colonização de microrganismos (COSTA *et al.*, 2012; SANTOS, R. DE CASIA; MARIN, 2005). Desta forma, podem ser relacionados como fatores de risco para a mastite micótica o mau

funcionamento do sistema de ordenha, falta de higiene no manejo dos animais e do ambiente em que eles vivem, como instalações e equipamentos (RUZ-PERES, 2005; YAMAMURA *et al.*, 2007). Além disso, podem ser relacionados como fatores predisponentes para a mastite micótica, as lesões nos tetos das vacas, os tratamentos intramamários a base de tetraciclina e penicilina, antimicrobianos estes que podem ser utilizados como fontes de nitrogênio pelas leveduras (DWORECKA-KASZAK *et al.*, 2012; YAMAMURA *et al.*, 2007).

No Brasil, no Estado de São Paulo, SANTOS; MARIN, (2005) detectaram em 260 amostras de leite de vaca com mastite, a presença de *C. albicans* em 8,9% das amostras. No Rio Grande do sul, o isolamento de *Candida* spp. ocorreu em 37,9% de 194 amostras de leite de vacas com mastite subclínica, porém não foi detectado a presença de *C. albicans* (SPANAMBERG *et al.*, 2008b). No Estado de Minas Gerais, com 1.710 amostras de leite, de 1.291 animais acometidos pela mastite, sendo 263 oriundas de casos clínicos e as demais de casos subclínicos, foi observado que a maioria das leveduras isoladas (56), representando 98,2% das amostras, pertenceu ao gênero *Candida*, sendo a *C. albicans* a espécie predominante, seguida por *C. parapsilosis*, *C. catenulata*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*. As demais espécies pertencentes ao gênero *Candida* representaram 15,8% dos isolamentos (COSTA *et al.*, 2008).

2.4 Doenças fúngicas invasivas em humanos

Em seres humanos, dentre as espécies do gênero *Candida*, *C. albicans* tem sido a levedura mais comumente isolada e de maior relevância em diferentes afecções. Trata-se de um agente oportunista que faz parte da microbiota humana, mas que pode causar infecções disseminadas principalmente em pacientes imunocomprometidos, devido à expressão de diversos fatores de virulência para subverter o sistema imune do hospedeiro, facilitando assim sua instalação e propagação da infecção (NOGUEIRA DE CASTRO; ALEXANDRE DE VASCONCELOS JÚNIOR; CUNHA, 2016).

A candidíase invasiva em humanos, sobretudo em pacientes imunocomprometidos é um problema associado à elevada mortalidade, morbidade e um alto custo para tratamentos. *C. albicans* é a mais impactante, sendo esta responsável por aproximadamente 50% a 70% dos casos relatados, no entanto, diferentes espécies como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* começaram a emergir (KETT *et al.*, 2011; SAMPAIO CAMARGO *et al.*, 2010). Estas espécies tem sido também associadas

à mastite micótica (ARENDRUP, 2010). É válido salientar que na América Latina *C. parapsilosis* é a segunda espécie mais frequente em casos de micoses sistêmicas em seres humanos (HÖFLING *et al.*, 2010; SPELLBERG; FILLER; EDWARDS, 2006).

2.5 Tratamento da mastite micótica

No que tange ao tratamento da mastite micótica, não há muitos registros na literatura. Além disso, as infecções causadas por fungos são difíceis de serem controladas devido ao número limitado de produtos terapêuticos e de técnicas clínicas aplicáveis para determinadas espécies (HECTOR, 2005). A maioria dos medicamentos antifúngicos são aprovados apenas para o uso humano, havendo escassas informações de ensaios veterinários, que são fundamentais para a orientação do profissional para a escolha correta dos medicamentos a ser utilizados nos tratamentos. Os poucos dados existentes relacionam a anfotericina B, a nistatina, a natamicina, o cetoconazol, o fluconazol, tioconazol e o miconazol em solução aquosa como algumas das bases utilizadas no tratamento intramamário em vacas com mastite por *Candida* spp. (KRUKOWSKI, H., SABA, 2003; NOBRE; M. DE OLIVEIRA, 2002). De acordo com o estudo realizado por LASSA & MALINOWSKI (2007), no qual se avaliou a susceptibilidade de 319 leveduras isoladas do leite de animais infectados aos antifúngicos, os resultados demonstraram que mais de 75% dos isolados foram resistentes à anfotericina – B; 66% resistentes ao fluconazol e 40% resistentes ao primaricin e ao itraconazol.

Segundo KRUKOWSKI, H., SABA (2003), o tratamento das IIM de origem micótica é recomendado somente após a confirmação do envolvimento micótico na afecção, o que na maioria das vezes não é observado pelo clínico ou pelo proprietário. Além disso, são poucas as formulações comerciais intramamárias prontas para o uso, sendo muita das vezes preciso calcular a dose para a diluição, para posterior aplicação, o que dificulta ainda mais o tratamento deste tipo de mastite. Segundo SPANAMBERG *et al.*, (2008a), apesar do aumento do número de antifúngicos disponíveis comercialmente para o tratamento de micoses nos animais e seres humanos, são raros aqueles antifúngicos disponibilizados em veículo adequado para a utilização no tratamento da mastite micótica.

Em um surto de mastite micótica em rebanho leiteiro descrito por COSTA *et al.* (2008), constatou-se que animais submetidos à terapia intramamária intensiva por um período de tempo longo e de forma excessiva, foram os mais acometidos. Constatou-se

também que a maioria dos animais foram tratados de forma empírica, empregando-se vias e posologias inadequadas, sem conhecimento dos agentes envolvidos, e sem o devido conhecimento dos seus perfis de susceptibilidade frente à antifúngicos. Além disso, o procedimento era feito por indivíduos sem treinamento e sem o devido conhecimento dos princípios básicos de assepsia e antissepsia, sendo estes conhecimentos e cuidados essenciais quando se é feito a utilização de medicação intramamária.

Segundo GOMES; HENRIQUES, 2016; OLIVER; MURINDA (2012), a terapia intramamária com o uso de antimicrobianos ainda é considerada como uma das principais estratégias de controle e tratamento de vacas acometidas por esta enfermidade pelos programas de controle de mastite. Porém, é válido salientar que o uso de forma irrestrita e inadequada de agentes antimicrobianos está estreitamente relacionado com o surgimento e propagação de microrganismos resistentes, resultando em alto custo dos tratamentos e a não responsividade aos tratamentos subsequentes (TANGCHAROENSATHIEN; CHANVATIK; SOMMANUSTWEECHAI, 2018; WERNLI *et al.*, 2017). Embora o uso de drogas antimicóticas seja incomum nos casos de mastite bovina, com a emergência dos agentes micóticos na etiologia das IIM em bovinos, existe a tendência de maior demanda por protocolos IIM anti-micóticos. Tal fato salienta a necessidade de monitoramento da resistência destes patógenos de forma a possibilitar o uso mais racional dos medicamentos e mitigar o problema da resistência que já vem sendo apontada por alguns estudos (LASSA; MALINOWSKI, 2007).

2.6 Avaliação da resistência aos antifúngicos

A resistência está correlacionada à susceptibilidade reduzida dos microrganismos aos antimicrobianos. Desta forma, o The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) e o Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) padronizaram um método de avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos *in-vitro* que é utilizado atualmente para testar leveduras e bolores, que permite determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e trazem determinados para cada agente e droga quais os pontos classificam a amostra teste como sensível ou resistente. Porém, os pontos de corte não estão definidos para todas as espécies de microrganismos e nem para todas as drogas, inclusive para as leveduras e os bolores (PFALLER *et al.*, 2011a, 2011b).

Apesar de existirem diferenças nas metodologias dos métodos de referência EUCAST e CLSI para determinar as concentrações inibitórias mínimas, nos pontos de

corde preconizados pelas normas, ambos os métodos são baseados em respostas farmacodinâmicas em modelos animais e humanos. Entretanto não há associação total entre a CIM *in vitro* com a resposta clínica, mas é considerado um bom indicativo. Além disso, os testes variam com o ambiente clínico, os fatores de risco individuais de cada paciente e a resposta à terapia. Nos laboratórios especializados esses métodos são utilizados para testes de sensibilidade utilizando leveduras, enquanto os laboratórios de rotina utilizam de técnicas comerciais como E-test e Sensititre Yeast One (ESPINEL-INGROFF *et al.*, 2015; MELETIADIS *et al.*, 2016) ou sistemas automatizados como o ViTek (PETERSON *et al.*, 2011).

Os testes de susceptibilidade a antifúngicos avaliam cepas de fungos que são considerados possíveis causadores de falhas nos tratamentos, fornecendo importantes índices que apontam mudanças na susceptibilidade ou novos mecanismos de resistência às drogas utilizadas nos tratamentos.

Usualmente não se faz avaliação da susceptibilidade dos fungos aos antimicrobianos quando existem falhas nos tratamentos, por não conhecer a dimensão da resistência desses patógenos às drogas antimicóticas. Esse fato pode interferir na efetividade dos protocolos terapêuticos, refletindo também na saúde coletiva, pois esses patógenos estão associados com afecções em seres humanos, o que aumenta mais a necessidade de se estudar sobre seus mecanismos de defesa e perfil de susceptibilidade desses indivíduos a fim de fundamentar tratamentos que possam ser efetivos, diminuindo assim os casos de resistência desses indivíduos. (CASTRO, NOGUEIRA DE; ALEXANDRE DE VASCONCELOS JÚNIOR; CUNHA, 2016).

De acordo com HECTOR (2005), a maioria dos agentes antifúngicos possui ação fungicida em ensaios de susceptibilidade *in vitro*, embora a faixa de concentração eficaz seja muito ampla para certos medicamentos e certas espécies de fungos testadas. Além disso, ressalta em seu estudo que, para atingir uma boa eficácia no tratamento clínico da maioria das infecções, o profissional deve escolher o agente antifúngico correto, utilizar a posologia adequada. Além disto, ressalta a importância da resposta imunológica do hospedeiro para eliminar a infecção. O autor salienta que cada antifúngico possui propriedades únicas que afetam sua farmacodinâmica, cada medicamento possui um espectro de efeitos colaterais e o potencial para interações com outros medicamentos que devem ser considerados na escolha do melhor antifúngico a ser utilizado.

A interferência dos fatores supracitados foram demonstrados em um ensaio de avaliação pré-clínica de dois antifúngicos que são comumente utilizados, fluconazol e

itraconazol, em um modelo murino de candidíase sistêmica por YOTSUJI *et al.*, (1997). O resultado desse experimento mostrou que uma cepa de *C. albicans* apresentou uma CIM de 0,125 g/mL para fluconazol e de 0,0156 g/mL para itraconazol. Para os medicamentos administrados via oral em seu modelo murino com este mesmo isolado foi de 0,392 e 320 mg/kg, respectivamente. Concluiu-se que sob essas condições experimentais, embora o itraconazol fosse bem mais potente *in vitro*, se mostrou muito pouco ativo *in vivo*.

2.7 Mecanismos de ação dos antifúngicos

As classes de antifúngicos incluem os polienos, azóis, flucitosina e equinocandinas (KATHIRAVAN *et al.*, 2012). Dentre elas, as duas classes consideradas mais utilizadas na terapia de primeira linha são as equinocandinas e azóis. Os compostos azólicos têm como alvo para ataque a enzima esterol 14 α -desmetilase do citocromo P450-enzima dependente do lanosterol, responsável por converter lanosterol em ergosterol e é codificado por *erg11* em leveduras e por *cyp51A* nos bolores. Em suma, os compostos azólicos, tais como o fluconazol, posaconazol, voriconazol e ravuconazol, bloqueiam a síntese do ergosterol, importante componente da membrana da célula fúngica. Tal inibição é considerada fungistática em leveduras e fungicida em bolores.

Os triazóis são comumente recomendados para o tratamento de aspergiloses e amplamente utilizados no tratamento de candidíase (PAPPAS *et al.*, 2015). Apesar do potencial de mutações pontuais no gene *erg11*, é relatado que possui maior impacto em organismos haplóides (por exemplo, *Candida glabrata*) em comparação a diplóides (por exemplo, *C. albicans*).

A resistência aos azóis no gênero *Candida* compreende diversos mecanismos de ação bem definidos, como por exemplo a regulação dos transportadores de drogas, superexpressão ou alteração do alvo da droga e alterações celulares causadas, em alguns casos, por efeitos não-alvo induzidos por respostas de estresse, sendo esses mecanismos de ocorrência individual ou simultânea em um único isolado, podendo produzir efeitos aditivos ou até mesmo provocar uma resistência cruzada entre drogas azólicas (COWEN *et al.*, 2014). Um dos mecanismos mais comuns identificados na resistência aos antimicrobianos é a indução de bombas de efluxo, permitindo a diminuição da concentração do fármaco dentro da célula alvo. Essas bombas de efluxo são codificadas

por genes da superfamília do cassete de ligação do ATP (ABC) ou do facilitador principal (MFS). Além disso existem fatores de transcrição responsáveis por regular a expressão dessas bombas, como por exemplo Tac136 e Mrr137 em *C. albicans* e CgPdr1 em *C. glabrata*, sendo bem caracterizados (VERMITSKY *et al.*, 2006). O aumento do efluxo de drogas é o mecanismo de resistência mais comum também na *C. glabrata* (BORST *et al.*, 2005; SANGUINETTI *et al.*, 2005)

Em *Saccharomyces cerevisiae* um mecanismo de resistência é a substituição de aminoácidos, o que modifica estruturas no sítio ativo da desmetilase, o que causa redução da afinidade pelo e, portanto, resistência aos azóis (SAGATOVA *et al.*, 2015). Outro mecanismo de resistência *in vitro* aos antifúngicos azóis descrito para *C. albicans* em seres humanos se dá pela inativação do *erg3*, gene que codifica o esteroide 5,6-desaturase, que possui função essencial para a biossíntese do ergosterol (VALE-SILVA *et al.*, 2012). As leveduras apresentam em sua composição uma alta plasticidade genômica, principalmente entre *Cryptococcus neoformans* e *C. albicans*, resultando em perda de plasticidade, aumento no número de cópias cromossômicas, formação de isocromossomos, que afetam a expressão das bombas e a expressão do alvo azólico, ou até ambos, gerando a resistência aos azóis (JONATHAN POSNER AND BRADLEY S. PETERSON, 2008).

A formação de biofilme em superfícies epiteliais, superfícies bióticas (como por exemplo gengivas e dentes) e abióticas (como instrumentos cirúrgicos, catéteres) é exemplo de outro comum e importante mecanismo de resistência aos antimicrobianos, sendo capaz de reduzir a penetração de medicamentos, fazendo com que os mesmos diminuam a concentração da droga ao aprisioná-la em um polímero de matriz rica em glucano, resultando em falhas frequentes na terapia antifúngica onde na maioria das vezes a intervenção cirúrgica torna-se necessária (RAMAGE *et al.*, 2012).

3 HIPÓTESE

Amostras de leveduras isoladas de infecções intramamárias de bovinos apresentam resistência a diferentes antifúngicos.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Determinar o perfil de suscetibilidade de leveduras isoladas de IIM de bovinos aos antifúngicos.

4.2 Específicos

- 1) Determinar o perfil de susceptibilidade de leveduras isoladas de mastite bovina aos antifúngicos: anfotericina B, fluconazol, flucitosina, itraconazol, posaconazol, ravuconazol e voriconazol por meio da técnica de concentração inibitória mínima (CIM).
- 2) Determinar os valores de MIC50 e MIC90 para os antifúngicos: anfotericina B, fluconazol, flucitosina, itraconazol, posaconazol, ravuconazol e voriconazol.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Microrganismos estudados

Foram utilizados 56 isolados de leveduras pertencentes ao banco de Culturas Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras, oriundos de animais com mastite bovina. As leveduras foram isoladas a partir de amostras de leite de animais acometidos pela mastite clínica ou subclínica, enviadas por proprietários e veterinários de campo ao Laboratório supracitado, no período entre (2004 e 2018), para fins de diagnóstico microbiológico. Os isolados foram previamente identificados por testes fenotípicos, segundo YARROW (1998), usando-se as chaves descritas por (KURTZMAN; FELL, 1998) e pela técnica de MALDI TOF (REIS, 2019). Estes encontram-se relacionados na Tabela 1.

Tabela 1 — Identificação de leveduras isoladas de infecções intramamárias de bovinos por meio da técnica de MALDI-TOF MS e testes bioquímicos.

Espécie	Número de isolados	Frequência percentual
<i>Issatchenkia orientalis</i>	21	37,5%
<i>Candida rugosa</i>	13	23,21%
<i>Candida albicans</i>	5	8,92%
<i>Candida parapsilosis</i>	5	8,92%
<i>Candida pararugosa</i>	4	7,14%
<i>Candida tropicalis</i>	3	5,35%
<i>Candida glabrata</i>	2	3,57%
<i>Candida metapsilosis</i>	1	1,78%
<i>Candida sp.</i>	1	1,78%
<i>Magnusiomyces capitatus</i>	1	1,78%

Fonte: REIS (2019).

5.2 Testes de suscetibilidade a antifúngicos

Os ensaios de susceptibilidade a antifúngicos foram realizados por meio da técnica de concentração inibitória mínima (CIM), microdiluição em caldo RPMI de acordo com os documentos M27-A2 padronizados pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2002 e EUCAST antifungal MIC method for yeasts de 2020, adaptado. Os ensaios foram realizados em microplacas estéreis de 96 poços, sendo os antifúngicos testados em diferentes faixas de concentração, conforme descrito na tabela 2.

A solução-estoque dos antifúngicos foi preparada em água para os antifúngicos fluconazol e flucitosina, e dimetilsulfóxido (DMSO) para os demais antifúngicos testados. A partir das diluições iniciais, foram realizadas diluições no meio RPMI-1640 tamponado com [ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico] (MOPS), com concentração final de 0,165 mol/L e pH 7,0, suplementado com glicose a 2% para obtenção das concentrações desejadas.

Para a avaliação da concentração inibitória mínima (CIM), as cepas em estoque foram descongeladas e semeadas em placas contendo meio ágar Sabouraud e incubadas em condições de aerobiose, em estufa a 37°C por 48 horas. Após o crescimento, foi avaliada a pureza das cepas por meio de esfregaços corados pela técnica de Gram (MENEZES E.A; DOS SANTOS OLIVEIRA CUNHA; M. D. C. CUNHA, F.A, 2012;

MENEZES, E. A MENDES, L.G, 2009).

O ensaio foi realizado em placas estéreis de 96 poços com fundo em U, onde foram adicionados na primeira coluna, 20 μ L de cada antifúngico a ser testado, diluídos em 180 μ L de RPMI. Todos os testes foram realizados em duplicata, e para controle dos testes foram utilizada a amostra de referência de *C.parapsilosis* ATCC 22019. As concentrações inibitórias mínimas verificadas para a cepa controle ATCC 22019 estavam dentro dos limites permitidos para todos os antimicrobianos testados. Os inóculos foram produzidos em solução salina esterilizada 0,85%, utilizando-se como padrão para os inóculos a turbidez 0,5 da escala de Mc Farland que equivale a $1,5 \times 10^8$ (UFC/mL) e rediluída em solução salina (1:1). Foram incluídos nos ensaios o controle de crescimento (meio RPMI + inóculo, sem o antifúngico) e um controle de esterilidade (somente o meio RPMI, sem microrganismos e sem os antimicrobianos). As microplacas foram incubadas a 37°C por 48h para posterior leitura dos resultados.

Após o período de incubação, a CIM foi determinada visualmente por comparação com o crescimento do controle livre de fármaco. Na avaliação dos resultados foram utilizados os pontos de corte disponíveis para os antifúngicos testados. Não existem pontos de corte definidos para todos os antifúngicos que foram testados no presente trabalho. Nestes casos foram determinadas a CIM50 e CIM90, sendo a CIM50 equivalente a concentração do antifúngico na qual houve inibição de crescimento de 50% dos isolados e a CIM90 é equivalente à concentração na qual houve inibição de crescimento de 90% dos mesmos.

Tabela 2 — Antifúngicos utilizados nos testes de suscetibilidade de leveduras isoladas de mastite bovina, faixas de concentrações testadas e respectivos pontos de cortes utilizados.

Antifúngicos testados	Fabricante	Potência	Faixas de concentrações testadas (mcg/mL)	Breakpoints			
				S	S-DD	I	R
Anfotericina B ^a	Sigma-Aldrich	100%	8 – 0,312 µg/mL	< 1	–	–	> 1
Flucitosina ^c	Sigma-Aldrich	100 %	4 – 0,0156 µg/mL	≤ 4	–	8 - 16	≥ 32
Fluconazol ^c	Sigma-Aldrich	≥98%	128 – 0,5 µg/mL	≤ 8	16 - 32	–	≥ 64
Itraconazol ^c	Sigma-Aldrich	≥98%	2 – 0,0078 µg/mL	≤ 0,125	0,25 – 0,5	–	≥ 1
Posaconazol ^b	Sigma-Aldrich	≥ 98%	4 – 0,0156 µg/mL	≤ 1	2	–	≥ 4
Ravuconazol	Sigma-Aldrich	≥98%	4 – 0,0156 µg/mL	< 1	–	–	≥ 1
Voriconazol ^b	Sigma-Aldrich	≥98%	4 – 0,0156 µg/mL	≤ 1	2	–	≥ 4

S: sensível; S-DD: Sensibilidade Dose – Dependente; I: Sensibilidade Intermediária; R: Resistente.

Fonte: Do autor (2021)

^a Adaptado de CLSI, (2008) e MORALEZ *et al.* (2014).

^b Adaptado de PFALLER *et al.*, (2006).

^c Clinical and Laboratory Standards Institute, M27-A2 (2002).

5.3 Estatística

Os resultados dos testes de CIM obtidos foram organizados em planilhas do Software Microsoft Excel 2010 e determinados os parâmetros de MIC50 e MIC90 para os diferentes antifúngicos, para as diferentes espécies discriminadas. Os índices de MIC50 e MIC90 para cada antifúngico foram calculados de acordo com RUANGPAN; TENDENCIA (2004).

Adicionalmente, foi analisada a associação entre as variáveis “espécies” e “susceptibilidade aos diferentes antimicrobianos”, utilizando-se o teste do qui-quadrado e o teste exato de Fisher por meio do Programa Epi Info versão 7. Determinou-se como nível significância de 0,05 (5%) para rejeição da hipótese nula.

6 RESULTADOS

Os índices globais de resistência verificados foram: anfotericina B (89,28%), itraconazol (76,78%), ravuconazol (67,85%), fluconazol (51,78%), posaconazol (41,07%), fluocitocina (37,5%), e voriconazol (28,57%). Os índices de múltipla resistência foram avaliados, utilizando-se como critério resistência a três ou mais antimicrobianos de grupos diferentes, isto é a resistência simultânea à fluocitocina, anfotericina B e a um ou mais antimicrobianos do grupo dos triazóis. Ao todo, 56 isolados foram analisados, verificando-se que 12 (21,42%) foram multirresistentes.

Adicionalmente, foram mensurados os valores de MIC50 e MIC90 para os isolados, ou seja, a concentração do antifúngico capaz de inibir 50% e 90% do crescimento da população fúngica testada (Gráficos 1-5).

A Tabela 3 demonstra os valores de referência de MIC, segundo a Clinical Laboratory and Standard Institute, (2002, 2008) e valores adaptados por PFALLER *et al.*, (2006) para os antimicrobianos testados, bem como o MIC 50 e MIC 90 das cepas analisadas. A tabela 4 demonstra os valores obtidos no teste de susceptibilidade de leveduras isoladas de amostras de leite de vacas com mastite em rebanhos bovinos do sul de Minas Gerais no período entre 2004 – 2018.

Tabela 3 – Pontos de Corte de acordo com CLSI (2012 e 2008) e MIC 50 e MIC 90 dos antifúngicos frente às cepas estudadas.

Antifúngicos testados	Breakpoints		MIC ($\mu\text{g/mL}$)	
	Sensível	Resistente	50	90
Anfotericina B ^a	< 1	> 1	—	50,5
Flucitosina ^c	≤ 4	≥ 32	28,04	—
Fluconazol ^c	≤ 8	≥ 64	33,33	—
Itraconazol ^c	$\leq 0,125$	≥ 1	27,88	—
Posaconazol ^b	≤ 1	≥ 4	27,85	—
Ravuconazol	< 1	≥ 1	28,15	—
Voriconazol ^b	≤ 1	≥ 4	28,02	—

^a Adaptado de CLSI (2008) e MORALEZ *et al.* (2014).

Fonte: Do autor (2021)

^b Adaptado de PFALLER *et al.*, (2006).

^c Clinical and Laboratory Standards Institute, M27-A2 (2002).

Representação gráfica dos valores de MIC50 e MIC90.

Gráfico 1 – Resultado dos testes de MIC50 e MIC90 para o antifúngico anfotericina B frente a leveduras isoladas da mastite bovina

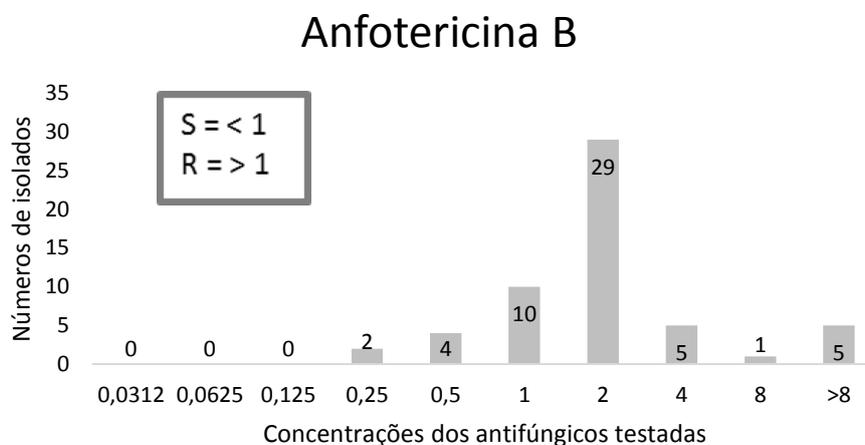


Gráfico 2 – Resultado dos testes de MIC50 e MIC90 para o antifúngico anfotericina B frente a leveduras isoladas da mastite bovina

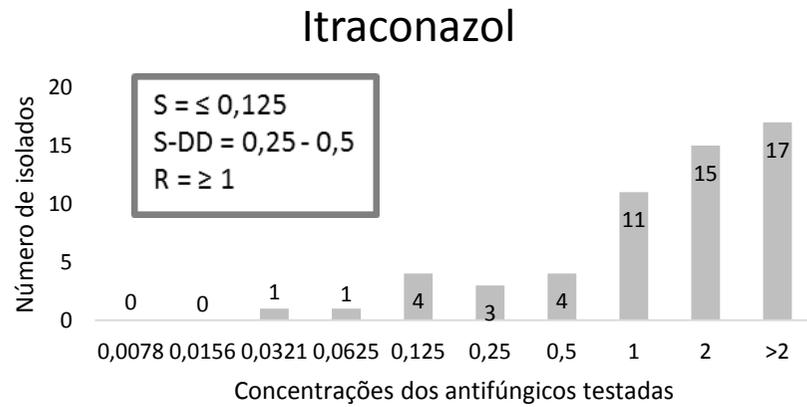


Gráfico 3 – Resultado dos testes de MIC50 e MIC90 para o antifúngico ravuconazol frente a leveduras isoladas da mastite bovina

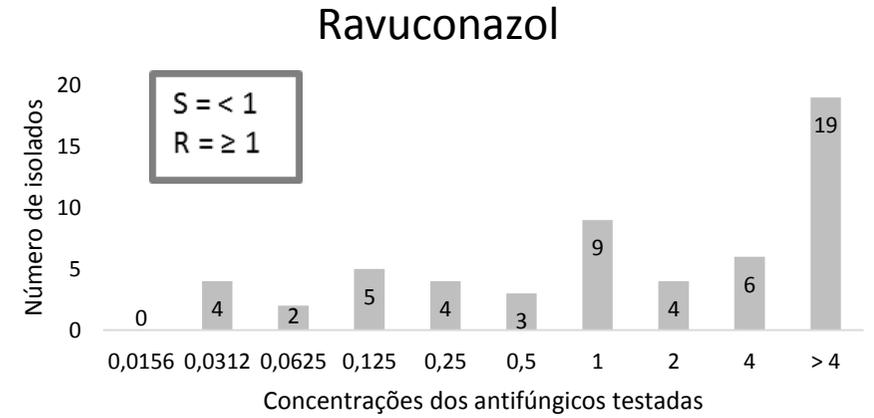


Gráfico 5 – Resultado dos testes de MIC50 e MIC90 para o antifúngico fluconazol frente a leveduras isoladas da mastite bovina

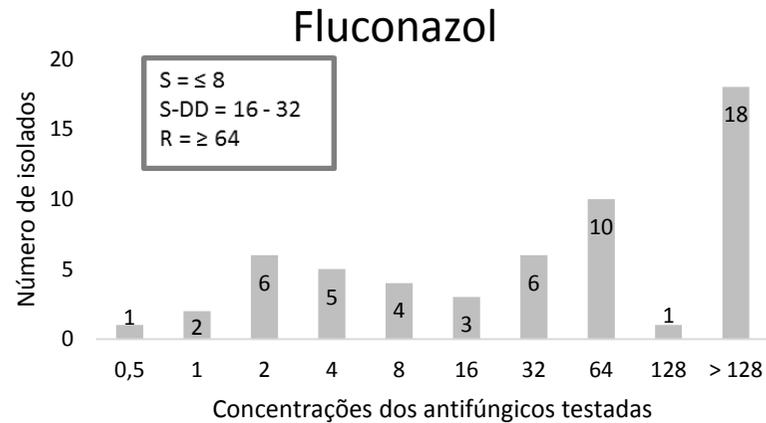


Gráfico 4 – Resultado dos testes de MIC50 e MIC90 para o antifúngico posaconazol frente a leveduras isoladas da mastite

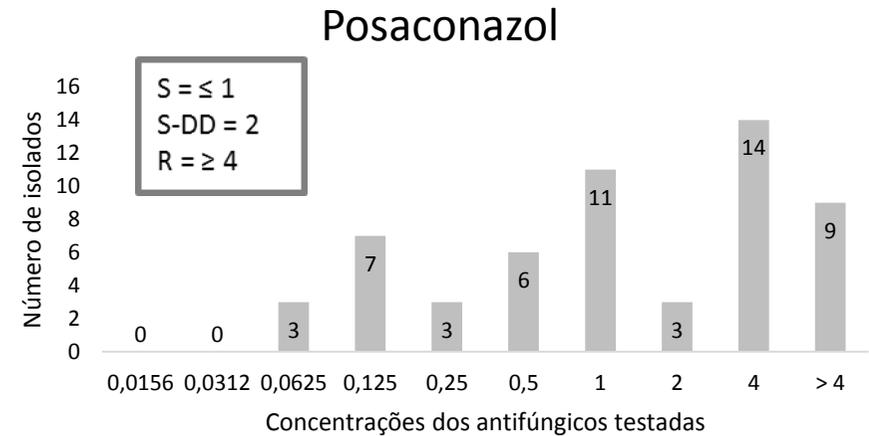


Gráfico 7 – Resultado dos testes de MIC50 e MIC90 para o antifúngico flucitosina frente a leveduras isoladas da mastite bovina

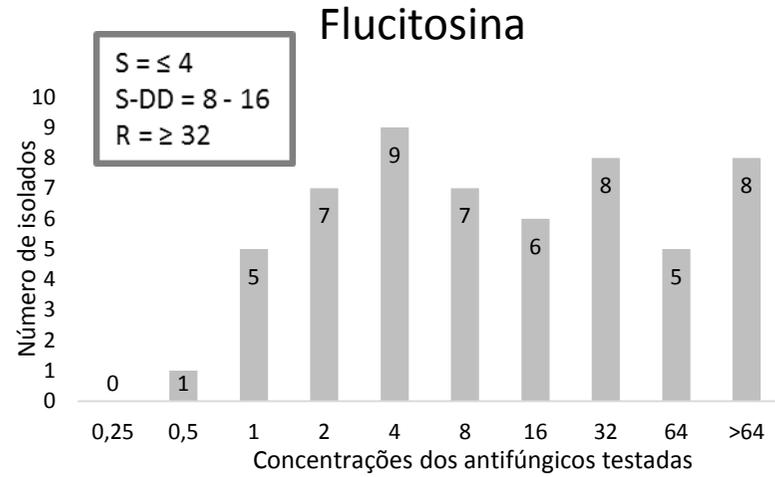


Gráfico 6 – Resultado dos testes de MIC50 e MIC90 para o antifúngico voriconazol frente a leveduras isoladas da mastite bovina

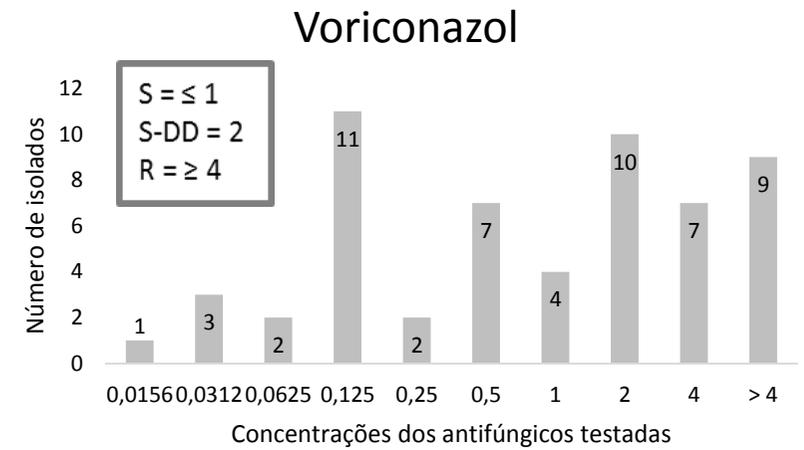


Tabela 4. Suscetibilidade de leveduras isoladas de amostras de leite de vacas com mastite em rebanhos bovinos do sul de Minas Gerais no período entre 2004 - 2018, para anfotericina B, flucitosina, fluconazol, itraconazol, posaconazol, ravuconazol e voriconazol.

		NÚMEROS DE ISOLADOS SUSCEPTÍVEIS NAS CONCENTRAÇÕES TESTADAS																			
		CONCENTRAÇÕES TESTADAS (µg/mL)																			
		>128	128	>64	64	32	16	>8	8	>4	4	>2	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0312	0,0156	0,0078
ANTIFÚNICOS	AnfotericinaB	NT	NT	NT	NT	NT	NT	5	1	-	5	-	29	10	4	2	0	0	0	NT	NT
	Flucitosina	NT	NT	8	5	8	6	NT	7	-	9	-	7	5	1	0	NT	NT	NT	NT	NT
	Fluconazol	18	1	-	10	6	3	-	4	-	5	-	6	2	1	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	Itraconazol	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	17	15	11	4	3	4	1	1	0	0
	Posaconazol	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	9	14	-	3	11	6	3	7	3	0	0	NT
	Ravuconazol	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	19	6	-	4	9	3	4	5	2	4	0	NT
	Voriconazol	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	9	7	-	10	4	7	2	11	2	3	1	NT

NT – NÃO TESTADO

Fonte: Do autor (2021)

7 DISCUSSÃO

A mastite micótica, uma enfermidade emergente em rebanhos tecnificados em todo o mundo, tem *Candida* spp. como os agentes mais prevalentes em sua etiologia, sendo relatada como consequência do uso exacerbado de compostos antifúngicos (ARENDRUP, 2014). Esta enfermidade pode ocorrer na forma de surtos localizados e/ou após tratamentos de longa duração com antimicrobianos (CHAHOTA *et al.*, 2001; COSTA *et al.*, 2012).

Uma das principais limitações para o tratamento e controle da mastite micótica é a falta de estudos sobre a suscetibilidade dos agentes causais aos antimicrobianos, o que impede a implementação de protocolos terapêuticos efetivos. Como consequência direta, existem poucos fármacos disponíveis para o tratamento destas enfermidades no mercado, fenômeno agravado pelo fenômeno multirresistência (COUTINHO *et al.*, 2007).

Diversos estudos focando a resistência de patógenos micóticos isolados de seres humanos, principalmente *Candida* spp., podem ser encontrados na literatura científica, contudo, são raros os estudos focando a resistência entre os patógenos causadores de mastite em bovinos. No presente estudo foi avaliada a ação antimicrobiana de sete agentes antifúngicos diferentes, pertencentes a diferentes classes frente a amostras de leveduras isoladas de mastite bovina. Níveis elevados de resistência foram observados para todos os agentes antifúngicos testados, sendo o maior índice de resistência verificado para a anfotericina B (89,28%) e o menor índice para o voriconazol (28,57%).

Os índices elevados de resistência verificados para drogas pertencentes à classe dos azóis como o itraconazol (76,78%) e fluconazol (51,78%), bem como os altos valores encontrados para triazóis como o ravuconazol (67,85%) e seus respectivos valores de MIC₅₀ para estes antimicrobianos, evidenciam as restrições ao uso destes antimicrobianos para o tratamento da mastite bovina.

Foram observados altos valores para os índices de MIC₅₀ e MIC₉₀ para todos os antimicrobianos. Esses valores nos permitem comparar a potência dos antifúngicos, pois, quanto menor a concentração necessária para inibir o crescimento do microrganismo, maior a potência do antifúngico testado e, em geral, quanto maior a potência, menores as doses para o combate a infecção. Desta forma, é possível identificar e comparar o MIC₅₀ e MIC₉₀ de cada um dos antifúngicos testados com os pontos de corte. Pode se observar nos gráficos (1, 2, 3 e 4) que maioria dos isolados apresentaram altos valores de MIC₅₀,

o que caracteriza que muitas cepas submetidas ao teste de sensibilidade são resistentes.

Esses resultados são corroborados por um estudo envolvendo isolados de *Candida* spp. obtidos de casos humanos entre 2002 e 2003 na Espanha. Neste estudo, que envolveu 351 espécies de *Candida* spp., foi determinado o MIC para seis antifúngicos para cepas de *C. albicans* e não *C. albicans*, tendo sido verificado a baixa sensibilidade ao fluconazol (CUENCA-ESTRELLA *et al.*, 2005). Essa baixa ação antimicótica do fluconazol também foi verificada em um estudo feito no Ceará, para *Candida* spp. isoladas de casos humanos (CASTRO, NOGUEIRA DE, I. M; ALEXANDRE DE VASCONCELOS JÚNIOR, A.; CUNHA, F.A, 2016). Estudos mais recentes feitos por MAHMOUD; FARAAG; ABU EL-WAFA, (2021), no Egito, também, em seres humanos, mostraram que 94,12% (32/34) das amostras testadas apresentaram resistência a pelo menos duas drogas azólicas diferentes, incluindo o fluconazol e itraconazol, enquanto 8,82% (3/34) desses isolados eram resistentes e 5,88% (2/34) eram sensíveis a todas as drogas testadas.

Alguns estudos recentes apontam um aumento significativo da resistência devido ao uso incorreto de drogas azólicas e terapias de longa duração, favorecendo o aumento de isolados de *Candida* resistentes aos azóis (BHATTACHARYA; SAE-TIA; FRIES, 2020; TAN *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2020). Um estudo testou a susceptibilidade de 3.895 cepas de *C. albicans* ao itraconazol. Nesse estudo, 99% das cepas apresentaram CIM de 4 µg/mL e 46% CIM de 0,03 µg/mL para o itraconazol (PFALLER *et al.*, 2005). Além disso, 86% das cepas de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* resistentes ao fluconazol foram inibidas por uma concentração ≤ 1 µg/mL de itraconazol (PFALLER *et al.*, 2007).

Em si tratando do posaconazol, não foi atribuído pontos de corte interpretativos pelo CLSI. Para fins de comparação, PFALLER *et al.*, (2008) aplicaram os pontos de corte de MIC de voriconazol ao posaconazol, ou seja, suscetível, ≤ 1 µg / ml; suscetível dependente da dose, 2 µg / ml; resistente, ≥ 4 µg / ml. Utilizando-se destes critérios de interpretação, os autores verificaram que na população testada, 10.472 isolados (96,9%) foram sensíveis, 205 (1,9%) foram sensível dose-dependente, e 130 (1,2%) foram resistentes para posaconazol. Um estudo recente, realizado nos Estados Unidos, realizado por KORDALEWSKA *et al.*, (2021), foram testados 17 isolados de *C. albicans* coletados de pacientes com COVID-19, tendo sido verificados baixos valores de MIC para posaconazol $< 0,03$ mg / L.

Estudos recentes apontam alta susceptibilidade à anfotericina B, divergindo do

nostros resultados, pois no presente estudo o maior valor de CIM verificou-se para anfotericina B nas amostras testadas. Segundo o estudo realizado por ANH *et al.*, (2021) entre setembro de 2019 e outubro de 2020, foram feitas coletas de amostras de secreção vaginal de 462 mulheres em idade reprodutiva no Vietnã, dentre as amostras coletadas, a prevalência de colonização de levedura vaginal em mulheres não grávidas foi de 51,3% de 462 participantes. Como resultados, encontraram susceptibilidade de 95,65% (42) para anfotericina B, e encontraram poucos isolados resistentes 4,35%.

Infecções invasivas estão cada vez mais comuns, com crescimento exponencial nas últimas décadas e são observadas principalmente em pacientes imunossuprimidos. Doenças fúngicas matam cerca de 1,5 milhões de pessoas por ano e acometem mais de um bilhão de pessoas em todos o mundo, porém estas enfermidades são negligenciadas pelas autoridades da saúde pública, mesmo sendo a maioria das mortes evitáveis (BONGOMIN *et al.*, 2017). Como consequência, tem-se um maior consumo de antifúngicos sistêmicos como por exemplo os triazóis, polienos, equinocandinas e flucitosina para tratamento e prevenção de infecções fúngicas invasivas (SANTOS *et al.*, 2018). Ademais, a introdução de drogas menos tóxicas, com uma maior aceitação, como no caso dos triazóis e equinocandinas, tem sido utilizados em estratégias profiláticas, gerando uma pressão seletiva mais intensa sobre os fungos (BAILLY *et al.*, 2016).

Além disso, atualmente, tem sido observado com maior frequência o surgimento de cepas resistentes ou mesmo multirresistentes, como é o caso da *C. auris*, patógeno multirresistente emergente, usualmente identificado de forma errônea. Esta espécie atualmente é uma grande preocupação por apresentar resistência a diversas drogas utilizadas na clínica. Os casos recentemente relatados desse microrganismo aumentaram 318% entre 2015 e 2018 (BHATTACHARYA; SAE-TIA; FRIES, 2020). Essa multirresistência é caracterizada pela resistência de um microrganismo a três ou mais antimicrobianos que possuem alvos moleculares diferentes, sendo os isolados de *Candida* spp. os fungos considerados de maior resistência aos agentes antifúngicos tidos como tradicionais (COSTA-DE-OLIVEIRA; RODRIGUES, 2020; TAN *et al.*, 2021; TANWAR *et al.*, 2014). A multirresistência evidencia a importância de se fazer o teste de susceptibilidade para o monitoramento dos pacientes e de seus prognósticos e adaptação à terapia proposta (EGGIMANN *et al.*, 2015; IOANNIDIS *et al.*, 2020).

Os resultados do presente estudo demonstram um aparente paradoxo: os níveis de resistência entre leveduras isoladas de mastite bovina são mais altos que para os isolados

de origem humana, conforme apontaram os estudos supracitados. Era de se esperar níveis mais elevados de resistência para os patógenos micóticos de origem humana, geralmente submetidos a uma pressão de seleção maior, devido ao maior uso de antimicóticos, em relação à atividade pecuária.

O incremento da resistência aos antimicrobianos entre os patógenos causadores de mastite é geralmente associado ao uso indiscriminado e empírico dos fármacos, sem conhecimento prévio dos protocolos, sem identificação dos microrganismos envolvido na etiologia da doença, aumentando assim a pressão de seleção de microrganismos resultando em elevados índices de resistência. Contudo este aspectos geralmente não se aplicam aos fungos envolvidos na etiologia da mastite, uma vez que o tratamento desta afecção geralmente tem como foco os agentes bacterianos.

Em função dos resultados obtidos neste estudo e de outros poucos estudos relacionados à mastite micótica, salienta-se a necessidade de realização de mais estudos, especialmente ensaios focando a avaliação da sensibilidade *in vitro* e *in vivo*. Ainda há poucos relatos que correlacionam a atividade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo*, o que pode comprometer o resultado dos tratamentos, pois *in vivo* a resposta terapêutica é afetada por diversos fatores inerentes ao animal, ao ambiente em que ele vive, pela natureza da infecção, além de interações patógeno-hospedeiro, bem como pela farmacocinética e farmacodinâmica das drogas utilizadas.

8 CONCLUSÕES

Altos níveis de resistência foi observado para os diferentes fármacos avaliados, inclusive com a presença de isolados multidroga-resistentes.

De acordo com os resultados do presente estudo, o uso de antimicóticos para a o tratamento da mastite fúngica mostrou ser bastante limitado, face o alto nível de resistência aos fármacos aqui avaliados

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANH, D. N. *et al.* Prevalence, species distribution and antifungal susceptibility of *Candida albicans* causing vaginal discharge among symptomatic non-pregnant women of reproductive age at a tertiary care hospital, Vietnam. **BMC Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 1–10, 2021.

ARENDRUP, M. C. **Epidemiology of invasive candidiasis** *Current Opinion in Critical Care*, 2010.

ARENDRUP, M. C. Update on antifungal resistance in *Aspergillus* and *Candida*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 6, p. 42–48, 2014.

BAILLY, S. *et al.* Impact of antifungal prescription on relative distribution and susceptibility of *Candida* spp. - Trends over 10 years. **Journal of Infection**, v. 72, n. 1, p. 103–111, 2016.

BHATTACHARYA, S.; SAE-TIA, S.; FRIES, B. C. Candidiasis and mechanisms of antifungal resistance. **Antibiotics**, v. 9, n. 6, p. 1–19, 2020.

BONGOMIN, F. *et al.* Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 4, 2017.

BORST, A. *et al.* Rapid acquisition of stable azole resistance by *Candida glabrata* isolates obtained before the clinical introduction of fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 783–787, 2005.

CARVALHO-CASTRO, G. A. *et al.* Molecular epidemiology of *Streptococcus agalactiae* isolated from mastitis in Brazilian dairy herds. **Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 48, n. 3, p. 551–559, 2017.

CASTRO, NOGUEIRA DE, I. M.; ALEXANDRE DE VASCONCELOS JÚNIOR, A.; CUNHA, F. A. Activity comparison of imidazole and triazole antifungals against *Candida albicans*. v. 48, n. 3, p. 216–238, 2016.

CHAHOTA, R. *et al.* Clinical bovine mastitis caused by *Geotrichum candidum*. **Veterinarski Arhiv**, v. 71, n. 4, p. 197–201, 2001.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference method for broth dilution. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard, 3th ed.**, v. 28, n. 14, p. 0–13, 2008.

COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; RODRIGUES, A. G. *Candida albicans* antifungal resistance and tolerance in bloodstream infections: The triad yeast-host-antifungal. **Microorganisms**, v. 8, n. 2, 2020.

COSTA, GERALDO MÁRCIO DA; DA SILVA, NIVALDO; ROSA, CARLOS AUGUSTO; FIGUEIREDO, HENRIQUE CÉSAR PEREIRA; PEREIRA, U. DE P. Mastite por leveduras em bovinos leiteiros do Sul do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 38, n. 7, p. 1938–1942, 2008.

COWEN, L. E. *et al.* Mechanisms of Antifungal Drug Resistance. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 5, n. 7, p. a019752–a019752, 10 nov. 2014.

CUENCA-ESTRELLA, M. *et al.* *In vitro* susceptibilities of bloodstream isolates of

Candida species to six antifungal agents: Results from a population-based active surveillance programme, Barcelona, Spain, 2002-2003. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, n. 2, p. 194–199, 2005.

DA COSTA, G. M. *et al.* Yeast mastitis outbreak in a Brazilian dairy herd. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 49, n. 3, p. 239–243, 2012.

DE CASIA DOS SANTOS, R.; MARIN, J. M. Isolation of *Candida* spp. from mastitic bovine milk in Brazil. **Mycopathologia**, v. 159, n. 2, p. 251–253, 2005.

DWORECKA-KASZAK, B. *et al.* High prevalence of *Candida* yeast in milk samples from cows suffering from mastitis in Poland. **The Scientific World Journal**, v. 2012, 2012.

EGGIMANN, P. *et al.* Preventing invasive candida infections. Where could we do better? **Journal of Hospital Infection**, v. 89, n. 4, p. 302–308, 2015.

GALIZA, G. J. N. *et al.* Ocorrência de micoses e pitiose em animais domésticos: 230 casos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 3, p. 224–232, 2014.

HECTOR, R. F. An overview of antifungal drugs and their use for treatment of deep and superficial mycoses in animals. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 20, n. 4, p. 240–249, 2005.

IOANNIDIS, K. *et al.* Do we need to adopt antifungal stewardship programmes? **European Journal of Hospital Pharmacy**, v. 27, n. 1, p. 14–18, 2020.

JONATHAN POSNER AND BRADLEY S. PETERSON, J. A. R. 基因的改变NIH Public Access. **Bone**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2008.

KATHIRAVAN, M. K. *et al.* The biology and chemistry of antifungal agents: A review. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 19, p. 5678–5698, 2012.

KORDALEWSKA, M. *et al.* Antifungal drug susceptibility and genetic characterization of fungi recovered from covid-19 patients. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 7, 2021.

KRUKOWSKI, H., SABA, L. THE MECHANICAL TRANSMISSION OF *Trypanosoma evansi* BY *Haematobia minuta* (DIPTERA: *Muscidae*) AND *Hippobosca camelina* (DIPTERA: *Hippoboscidae*) FROM AN INFECTED CAMEL TO A MOUSE AND THE SURVIVAL OF TRYPANOSOMES IN FLY MOUTHPARTS AND GUT (A. **Folia Veterinaria**, v. 47, n. 1, p. 38–41, 2003.

KRUKOWSKI, H. *et al.* Yeasts and algae isolated from cows with mastitis in the south-eastern part of Poland. **Polish journal of veterinary sciences**, v. 9, n. 3, p. 181–184, 2006.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. B. T. Use of this book. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. B. T.-T. Y. (FOURTH E. (Eds.). . **The yeasts, a taxonomic study**. Amsterdam: Elsevier, 1998. p. xvii–xviii.

LASSA, H.; MALINOWSKI, E. Resistance of yeasts and algae isolated from cow mastitic milk to antimicrobial agents. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 51, p. 575–578, 1 jan. 2007.

MAHMOUD, D. E.; FARAAG, A. H. I.; ABU EL-WAFA, W. M. *In vitro* study on the potential fungicidal effects of atorvastatin in combination with some azole drugs against multidrug resistant *Candida albicans*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 11, p. 1–13, 2021.

- MONARDES, H. *et al.* Reflexões sobre a qualidade do leite. **O compromisso com a qualidade do leite no Brasil. Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo**, p. 11–37, 2004.
- NOBRE, P.; OLIVEIRA, M. DE. Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. p. 175–184, 2002.
- PAPPAS, P. G. *et al.* Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, n. 4, p. e1–e50, 2015.
- PFALLER, M. A. *et al.* *In vitro* susceptibilities of clinical isolates of *Candida* species, *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus* species to itraconazole: Global survey of 9,359 isolates tested by Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 8, p. 3807–3810, 2005.
- PFALLER, M. A. *et al.* Use of fluconazole as a surrogate marker to predict susceptibility and resistance to voriconazole among 13,338 clinical isolates of *Candida* spp. tested by clinical and laboratory standards institute-recommended broth microdilution methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 70–75, 2007.
- PFALLER, M. A. *et al.* Selection of a surrogate agent (fluconazole or voriconazole) for initial susceptibility testing of posaconazole against *Candida* spp.: Results from a global antifungal surveillance program. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 551–559, 2008.
- RAMAGE, G. *et al.* Fungal biofilm resistance. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, 2012.
- RUANGPAN, L.; TENDENCIA, E. A. **Laboratory Manual of Standardized Methods for Antimicrobial Sensitivity Tests for Bacteria Isolated from Aquatic Animals and Environment**. [s.l: s.n.].
- RUEGG, P. L. A 100-Year Review : Mastitis detection , management , and prevention 1. p. 10381–10397, 2017.
- SAGATOVA, A. A. *et al.* Structural insights into binding of the antifungal drug fluconazole to *Saccharomyces cerevisiae* lanosterol 14 α -demethylase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 8, p. 4982–4989, 2015.
- SANGUINETTI, M. *et al.* Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 668–679, 2005.
- SANTOS, M. V. DOS; FONSECA, L. F. L. DA P. P.-S. P. **Controle da mastite e qualidade do leite: desafios e soluções** Edição dos autores, , 2019.
- SANTOS, M. *et al.* Triazole - chalcones : Lack of Antibacterial , Anti - candida , and Anti - dengue Virus Activities. **Journal of Pharmaceutical Negative Results**, v. 9, n. 1, p. 39–43, 2018.
- SANTOS, R. D. C.; MARIN, J. M. Isolation of *Candida* spp. from mastitic bovine milk in Brazil. **Mycopathologia**, v. 159, n. 2, p. 251–253, 2005.
- SPANAMBERG, A. *et al.* Mastite micótica em ruminantes causada por leveduras. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, p. 282–290, 2008a.
- SPANAMBERG, A. *et al.* Diversity of yeasts from bovine mastitis in Southern Brazil.

Revista Iberoamericana de Micología, v. 25, n. 3, p. 154–156, 2008b.

TAN, J. *et al.* Antifungal Activity of Minocycline and Azoles Against Fluconazole-Resistant *Candida* Species. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. May, 2021.

TANWAR, J. *et al.* Multidrug resistance: An emerging crisis. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2014, 2014.

VALE-SILVA, L. A. *et al.* Azole resistance by loss of function of the sterol Δ 5,6-desaturase gene (ERG3) in *Candida albicans* does not necessarily decrease virulence. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 4, p. 1960–1968, 2012.

VERMITSKY, J. P. *et al.* Pdr1 regulates multidrug resistance in *Candida glabrata*: Gene disruption and genome-wide expression studies. **Molecular Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 704–722, 2006.

YOTSUJI, A. *et al.* T-8581, a new orally and parenterally active triazole antifungal agent: *In vitro* and *in vivo* evaluations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 1, p. 30–34, 1997.

ZARAGOZA, C. S. *et al.* Yeasts isolation from bovine mammary glands under different mastitis status in the Mexican High Plateau. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 28, n. 2, p. 79–82, 2011.

ZHANG, M. R. *et al.* Molecular mechanism of azoles resistant *Candida albicans* in a patient with chronic mucocutaneous candidiasis. **BMC Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 1–6, 2020.