



**ESTEFFANY FRANCISCA REIS**

**ALGAS E LEVEDURAS ISOLADAS DE MASTITE BOVINA:  
IDENTIFICAÇÃO E PERFIL DE SENSIBILIDADE A  
ANTISSÉPTICOS E ANTIMICROBIANOS**

**LAVRAS – MG**

**2019**

**ESTEFFANY FRANCISCA REIS**

**ALGAS E LEVEDURAS ISOLADAS DE MASTITE BOVINA: IDENTIFICAÇÃO E  
PERFIL DE SENSIBILIDADE A ANTISSÉPTICOS E 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  
2019**

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

Reis, Esteffany Francisca.

Algas e leveduras isoladas de mastite bovina: Identificação e perfil de sensibilidade a antissépticos e antimicrobianos / Esteffany Francisca Reis. - 2019.

52 p.

Orientador(a): Geraldo Márcio Costa.

Coorientador(a): Gláucia Frasnelli Mian, Elaine Maria Seles Dorneles.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Infecção intramamária. 2. Suscetibilidade a antimicrobianos. 3. MALDI-TOF. I. Costa, Geraldo Márcio. II. Mian, Gláucia Frasnelli. III. Seles Dorneles, Elaine Maria. IV. Título.

**ESTEFFANY FRANCISCA REIS**

**ALGAS E LEVEDURAS ISOLADAS DE MASTITE BOVINA: IDENTIFICAÇÃO E  
PERFIL DE SENSIBILIDADE A ANTISSEPTICOS E ANTIMICROBIANOS**

**ALGAE AND YEAST ISOLATED BOVINE MASTITIS: IDENTIFICATION AND  
PROFILE OF ANTISSEPTICAL AND ANTIMICROBIAL SENSITIVITY**

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 21 de fevereiro de 2019.

Dr Geraldo Márcio da Costa

UFLA

Dr<sup>a</sup> Elaine Maria Seles Dorneles

UFLA

Dr<sup>a</sup> Roberta Hilsdorf Piccoli

UFLA

Dr<sup>a</sup> Ana Carolina Alves

UNESP/Botucatu

Prof. Dr. Geraldo Márcio da Costa  
Orientador

**LAVRAS – MG  
2019**

*À minha mãe, por estar ao meu lado todo esse tempo.*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por tornar este meu sonho uma realidade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – UFLA, pela oportunidade de realizar este curso.

Ao meu orientador Prof. Geraldo Márcio da Costa, pela orientação, ensinamentos, lições, conselhos e por ser meu exemplo.

Aos professores da UFLA, pelos ensinamentos e amizade.

Agradeço às minhas coorientadoras Prof<sup>a</sup> Elaine Maria Seles Dorneles e Prof<sup>a</sup> Gláucia Frasnelli Mian, por estarem presentes quando precisei.

Aos amigos da UFLA conquistados ao longo destes anos.

Agradeço aos meus pais, por toda a ajuda, compreensão, conselhos e apoio infinito. Sem vocês, não alcançaria mais esta vitória!

À minha irmã Nicolý, por estar presente em todos os momentos fazendo sempre a diferença.

Ao meu padrinho José, por estar sempre presente em minha vida.

Agradeço meu marido Luciano, pela ajuda, paciência, conselhos, companheirismo e por não me deixar desistir.

Agradeço ao meu querido filho João Lucas, por me mostrar a melhor forma de amar e o que realmente é importante em nossas vidas, pela sua compreensão em minhas ausências e por esperar a minha chegada todos os dias.

*“O sucesso é a soma de pequenos esforços repetidos dia após dia.” (Robert Collier)*

## RESUMO

A mastite bovina é uma das doenças mais prevalentes e impactantes na pecuária leiteira. Diferentes microrganismos estão envolvidos em sua etiologia, sendo classificados como contagiosos, quando adaptados ao interior da glândula mamária, ou ambientais, presentes normalmente no ambiente de criação dos animais. Entre os agentes ambientais, as algas e as leveduras são agentes incomuns, mas considerados emergentes. Neste trabalho, 149 cepas de leveduras e 62 de algas isoladas de casos de mastite em rebanhos bovinos de São Paulo, Minas Gerais e Paraná foram avaliadas quanto aos perfis de suscetibilidade a antimicrobianos e antissépticos, utilizando-se a técnica de concentração inibitória mínima (CIM). Adicionalmente, os isolados de leveduras foram caracterizados por meio da técnica de MALDI-TOF. Por teste de concentração inibitória mínima (CIM) não houve crescimento das algas na concentração de 4% da gentamicina, 16% amicacina e 8% polimixina B. Foram encontrados diferentes índices de inibição de crescimento das algas aos antissépticos: para o triclosano 0,25%, amônio quaternário <0,01%, peróxido de hidrogênio <0,002%, iodo 0,015, ácido peracético 0,25%, hipoclorito de sódio 0,125% e clorexina <0,018%, houve crescimento das algas nas maiores concentrações de ácido láctico e glutaraldeído. Os resultados de CIM para as leveduras foram: <0,0015% para triclosano, amônio quaternário <0,02%, peróxido de hidrogênio <0,007%, iodo 0,125%, ácido peracético 0,125%, clorexidina <0,0018 e hipoclorito de sódio na concentração de 0,125%. Estes resultados permitem confirmar a eficácia destes agentes como mecanismo de assepsia em fazendas leiteiras. Houve crescimento das leveduras nas maiores concentrações do ácido láctico e o glutaraldeído. Com a técnica de identificação proteica foi traçado o perfil dos isolados identificando 6 espécies de leveduras predominando a *Issatchenkia orientalis*, se tratando de rebanho houve a identificação de mais de um isolado mas com predominância de espécie. Testes “in vivo” devem ser realizados para a comprovação da sensibilidade dos isolados aos antibióticos testados, de acordo com este estudo os resultados endossam a utilização dos antissépticos para a antissepsia de tetos (pré e pós-dipping), visando o controle e prevenção da mastite causada por estes agentes ambientais da mastite bovina. As espécies de leveduras identificadas neste estudo se assemelha a espécies já identificadas na literatura.

**Palavras-chave:** Infecção intramamária. Suscetibilidade a antimicrobianos. Biocidas. Desinfetantes. MALDI-TOF.



## ABSTRACT

Bovine mastitis is one of the most prevalent and impacting diseases in dairy cattle. Different microorganisms are involved in their etiology, being classified as contagious, when adapted to the interior of the mammary gland, or environmental, normally present in the environment of animal husbandry. Among environmental agents, algae and yeasts are unusual agents, but considered emerging. In the present study, 149 yeast strains and 62 strains of algae isolated from cases of mastitis in bovine herds of São Paulo, Minas Gerais and Paraná were evaluated for the antimicrobial and antiseptic susceptibility profile, using the minimum inhibitory concentration. In addition, isolated yeasts were characterized by the MALDI-TOF technique. A minimum inhibitory concentration (MIC) test did not show growth of algae at the concentration of 4% gentamicin, 16% amikacin and 8% polymyxin B. Different rates of algae growth inhibition were observed for antiseptics: for triclosan 0.25%, quaternary ammonia <0.01%, hydrogen peroxide <0.002%, iodine 0.015, peracetic acid 0.25%, sodium hypochlorite 0.125% and chlorhexine <0.018%, there was growth of algae at the highest acid concentrations lactic acid and glutaraldehyde. The MIC results for yeast were: <0.0015% for triclosan, quaternary ammonia <0.02%, hydrogen peroxide <0.007%, iodine 0.125%, peracetic acid 0.125%, chlorhexidine <0.0018 and sodium hypochlorite in concentration of 0.125%. These results confirm the efficacy of these agents as an asepsis mechanism in dairy farms. There was growth of yeasts in the highest concentrations of lactic acid and glutaraldehyde. With the protein identification technique, the profile of the isolates was traced, identifying 6 yeast species with predominance of *Issatchenkia orientalis*, if in a herd there was identification of more than one isolate, but with a predominance of species. In vivo tests should be performed to confirm the sensitivity of the isolates to the antibiotics tested. According to this study, the results endorse the use of antiseptics for roof antiseptics (pre and post-immersion), aiming at the control and prevention of mastitis caused by these environmental agents of bovine mastitis. The yeast species identified in this study resemble species already identified in the literature.

**Keywords:** Algae. Intramammary infection. Susceptibility to antimicrobials. Biocides. Disinfectants. MALDI-TOF.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Antibióticos utilizados nos testes de suscetibilidade de algas e concentrações testadas.....	29
Tabela 2 - Antissépticos utilizados nos testes de suscetibilidade de algas e leveduras e concentrações testadas .....	29
Tabela 3 - Concentração Inibitória Mínima (CIM50/CIM90) dos antibióticos frente a algas isoladas de infecções intramamárias de bovinos .....	32
Tabela 4 - Resultados dos testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM50/CIM90) dos antissépticos frente a algas isoladas de infecções intramamárias de bovinos .....	33
Tabela 5 - Avaliação da ação algicida ou algistática dos antissépticos frente os isolados de algas nas concentrações referente à CIM.....	34
Tabela 6 - Resultados dos testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM50/CIM90) dos antissépticos frente a leveduras isoladas de infecções intramamárias de bovinos	34
Tabela 7 - Ação fungicida, fungistática dos antissépticos perante os isolados de leveduras nas concentrações referente à CIM .....	35
Tabela 8 - Resultados da identificação de leveduras isoladas de infecções intramamárias de bovinos por meio da técnica de MALDI-TOF MS.....	37
Tabela 9 - Posição dos isolados de levedura no dendrograma 1, gerado com base nos perfis protéicos obtidos no MALDI-TOF MS, pelo programa Biotyper 3.0 (Bruker) ....	40
Tabela 10 - Posição dos isolados de levedura no dendrograma 2, gerado com base nos perfis protéicos obtidos no MALDI-TOF MS, pelo programa Biotyper 3.0 (Bruker) ....	42

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Dendrograma obtido por meio dos perfis protéicos obtidos no MALDI-TOF MS identificação de leveduras isoladas de casos de mastite bovina..... 39
- Figura 2 - Dendrograma obtido por meio dos perfis protéicos obtidos no MALDI-TOF MS para de leveduras isoladas de um surto de mastite bovina em Minas Gerais .....41

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
2	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	15
2.1	<b>Mastite bovina e sua relevância econômica</b> .....	15
2.2	<b>Etiologia da mastite bovina</b> .....	16
2.2.1	<b>Algas como agentes da mastite bovina</b> .....	17
2.2.2	<b>Leveduras como agentes da mastite bovina</b> .....	18
2.3	<b>Riscos à saúde pública associados a algas e fungos isolados de mastite bovina</b> .	18
2.4	<b>Controle químico do crescimento microbiano</b> .....	19
2.4.1	<b>Mecanismos de ação dos antimicrobianos</b> .....	20
2.4.2	<b>Mecanismos de ação dos antissépticos</b> .....	21
2.5	<b>Suscetibilidade de algas isoladas de mastite a antimicrobianos e antissépticos</b> .	22
2.6	<b>Suscetibilidade de leveduras isoladas de mastite a antimicrobianos e antissépticos</b> .....	23
2.7	<b>Caracterização das algas do gênero <i>Prototheca</i></b> .....	24
2.8	<b>Caracterização de leveduras</b> .....	25
2.9	<b>Espectrometria de Massa, MALDI-TOF MS</b> .....	26
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	27
3.1	<b>Objetivo geral</b> .....	27
3.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	27
4	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	27
4.1	<b>Microrganismos estudados</b> .....	27
4.2	<b>Caracterização morfológica dos isolados de algas e leveduras</b> .....	27
4.3	<b>Testes de resistência a antissépticos e antibacterianos</b> .....	28
4.3.1	<b>Ação algicida, algistática e fungicida, fungistática dos antissépticos</b> .....	30
4.4	<b>Identificação das leveduras por MALDI-TOF MS</b> .....	30
4.4.1	<b>Obtenção dos estratos proteicos</b> .....	30
4.4.2	<b>Obtenção de espectros de massas</b> .....	31
4.4.3	<b>Construção do dendrograma de espectros gerados no MALDI-TOF</b> .....	31
4.5	<b>Análise Estatística</b> .....	31
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	31
5.1	<b>Resultados dos testes de CIM dos antibacterianos e antissépticos para algas</b> ....	31
5.1.1	<b>Resultados dos testes de CIM para as leveduras</b> .....	34

<b>5.2</b>	<b>Resultados parciais da caracterização de leveduras pelo MALDI-TOF MS.....</b>	<b>37</b>
<b>5.3</b>	<b>Dendrograma confeccionado por meio dos perfis protéicos obtidos no MALDI-TOF MS.....</b>	<b>38</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>43</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>44</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A pecuária leiteira ocupa posição de destaque na economia brasileira. Em 2016, o Brasil alcançou produção anual de 34.650 bilhões de litros de leite, ocupando assim a quinta posição, ficando atrás apenas da União Europeia, Estados Unidos, Índia e China. Neste contexto, Minas Gerais é o principal Estado produtor de leite do país, representando 76,8% da produção da região Sudeste e 26,1% da produção nacional (FAO, 2016; IBGE, 2015).

Um dos principais entraves à pecuária leiteira nacional é a mastite bovina, uma doença que gera expressivos problemas econômicos e de saúde pública. Esta enfermidade é considerada a de maior prevalência e a que causa os maiores agravos no sistema de produção de leite em âmbito mundial (ZARAGOZA et al., 2011, KEEFE, 2012). A maioria dos casos da doença é de origem infecciosa, sendo as bactérias os agentes mais relevantes, entretanto outros microrganismos, tais como vírus, algas e leveduras, podem estar envolvidos em sua etiologia.

Leveduras e algas são consideradas agentes incomuns da mastite bovina, sendo isolados facilmente a partir de equipamentos de ordenha, epitélio de tetos dos animais e do ambiente da sala de ordenha e de locais úmidos e ricos em matéria orgânica (RANJAN et al., 2006; ZHAO; LACASSE, 2008; KUMAR et al., 2016). Esses agentes podem ocasionar surtos de mastite, sobretudo em rebanhos intensivamente manejados, nos quais existem falhas na higiene ambiental ou naqueles em que o tratamento local de casos clínicos de mastite é feito sem a observância dos princípios básicos de assepsia e antissepsia (KUMAR et al., 2016; RANJAN et al., 2006).

Os protocolos terapêuticos convencionais são geralmente ineficazes quando se trata de infecções intramamárias (IIM) ocasionadas por algas e leveduras, verificando-se que as infecções ocasionadas por estes agentes geralmente tendem à cronicidade. Tais fatos geralmente culminam com a perda de quartos afetados e com o descarte de animais acometidos.

Considerando-se a importância crescente que algas e leveduras na epidemiologia das IIM de bovinos, o presente estudo tem como objetivos caracterizar as espécies de leveduras isoladas de casos de mastite, determinar o perfil de suscetibilidade de algas e leveduras aos antibacterianos e antissépticos, buscando aprofundar o conhecimento da epidemiologia das mastites ocasionadas por estes agentes e de novas alternativas para o seu tratamento e controle.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Mastite bovina e sua relevância econômica

A mastite é um processo inflamatório geralmente ocasionado pela invasão microbiana da glândula mamária. A infecção ocorre após a invasão do microrganismo no tecido glandular, com a estimulação do sistema imune que pode eliminar o patógeno. Caso a resposta imune não seja efetiva, poderá ocorrer a multiplicação do patógeno na glândula mamária com a ampliação e geração de novos estímulos ao sistema imune. O processo inflamatório estimula a migração dos neutrófilos polimorfonucleares para o parênquima secretório. Estas células, após a fagocitose, sofrerão apoptose e serão fagocitadas pelos macrófagos ou serão secretadas no leite juntamente com as células epiteliais mamárias, resultando em aumento das contagens de células somáticas do leite (CCS) (RODHA; PANTOJA, 2012; THOMAS et al., 2016).

A mastite é classificada de acordo com sua origem em contagiosa ou ambiental. Na mastite contagiosa, os patógenos são transmitidos geralmente durante a ordenha, enquanto que na mastite ambiental a infecção da glândula se dá no intervalo de ordenhas, sendo ocasionada por patógenos oportunistas presentes no próprio ambiente de criação dos animais, tais como camas, áreas de sombreamento, água utilizada na limpeza de equipamentos e instalações, etc (AIRES, 2010; REYES et al., 2016).

De acordo com a intensidade dos sinais inflamatórios, a mastite pode ser classificada em clínica ou subclínica. Na mastite subclínica, não há alterações macroscópicas do leite, entretanto há alterações físico-químicas e microbiológicas. Na mastite clínica, a inflamação do úbere é perceptível e surgem alterações macroscópicas no leite (pus, sangue), além dos demais sinais cardeais da inflamação (dor, calor, rubor, perda de função). Dependendo dos agentes envolvidos, a mastite clínica pode desencadear sinais sistêmicos como febre, hipotensão, dispneia, dentre outros, que podem culminar com a morte do animal (RODHA; PANTOJA, 2012).

A mastite é considerada uma das doenças mais relevantes para bovinos leiteiros, sendo responsável por perdas econômicas significativas apesar de medidas preventivas já bem estabelecidas (KEEFE, 2012). Esta doença gera inúmeros prejuízos econômicos para o produtor e para a indústria por comprometer a qualidade do leite. O ônus decorrente desta doença decorre dos gastos com o tratamento de casos clínicos, descarte de leite de animais em tratamento, gastos com mão de obra e serviços veterinários e custos decorrentes de óbitos que

eventualmente ocorrem e com a reposição de animais (LOPES et al., 2012; AZEVEDO et al., 2016). No entanto, o maior impacto da mastite se deve à diminuição da capacidade de produção do tecido secretor mamário afetado. Esta perda de capacidade secretória do quarto afetado é geralmente irreversível, o que conseqüentemente reduz a média de produção de leite do animal durante o episódio da doença e nas lactações subsequentes, e em casos mais graves ocasiona o descarte involuntário de animais (HOGEVEEN et al., 2011).

O leite proveniente de quartos mamários afetados pela mastite apresenta alteração em seus componentes, como valores de proteína, lactose, gordura e seus demais nutrientes, o que influencia as características sensoriais, vida de prateleira e rendimento dos produtos (CINAR et al., 2015). A CCS, um dos parâmetros indicadores de qualidade do leite pela indústria, está diretamente relacionada com o rendimento industrial e com a vida de prateleira do leite e seus derivados (SANTOS; FONSECA, 2007).

Além das perdas econômicas, a mastite gera riscos para a saúde pública devido à veiculação pelo leite de agentes com potencial zoonótico que podem ocasionar sérios agravos à saúde dos consumidores. Além disto, a mastite é a doença que mais demanda a utilização de antimicrobianos no gado leiteiro, o que gera riscos de resíduos de antibióticos que contribuem para o incremento dos índices de resistência, bem como riscos decorrentes da presença de bactérias resistentes aos antimicrobianos que podem ser propagadas na comunidade (DE VLIEGHER et al.; 2012; COSTA et al.; 2012).

## **2.2 Etiologia da mastite bovina**

Entre os microrganismos envolvidos na etiologia da mastite bovina, as bactérias são responsáveis por 80 a 90% dos casos. Os principais patógenos contagiosos causadores de mastite em bovinos são *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*. Os patógenos ambientais são aqueles presentes em fezes, solo e estalagem dos bovinos, os mais comuns são *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp. As bactérias *S. aureus*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* e *S. uberis* normalmente causam maiores danos ao úbere que outros patógenos causadores de mastite, e por isto são denominados patógenos principais ou maiores (SANTOS; FONSECA, 2007). Algas e leveduras são considerados agentes ambientais, sendo amplamente encontrados no ambiente de ordenha, água não potável e matéria orgânica (REYHER et al., 2012; COSTA et al., 2012).



### 2.2.1 Algas como agentes da mastite bovina

Embora as algas do gênero *Prototheca* ocorram como saprófitas ambientais, podem causar doenças nos seres humanos e em animais. As algas envolvidas na etiologia da mastite bovina geralmente pertencem ao gênero *Prototheca*, sendo agentes comumente relacionados com a mastite ambiental. Estas podem ser isoladas em diversas fontes ambientais com alta umidade, que incluem plantas, solo, água potável, lama, matéria orgânica, piso. Condições inadequadas de higiene nas instalações e da ordenha são fatores predisponentes relevantes para as IIM ocasionadas por estes microrganismos (RICCHI et al., 2010; WAWRON, 2013; BRANKO et al., 2017).

O gênero *Prototheca* foi descrito pela primeira vez por Krueger, no ano de 1894, congregando algas aclorofiladas com afinidade filogenética à *Chlorella* spp. São descritas as espécies: *P. zopffi*, *P. moriformes*, *P. wickerhamii*, *P. stagnora* e *P. wickerhamii* (KAPLAN, 1977; McDONALD et al., 1984). Masuda et al. (2006) identificaram as espécies *P. ulmea*, *P. cutis*, *P. miyajii*. Na Coreia, Park et al. (2019) isolaram os genótipos 1 e 2 de *P. zopffii* e a espécie *P. blaschkeae* associada com um episódio de mastite clínica. Estudos recentes comprovam a ocorrência de mastite por *Prototheca* na Polônia (JAGIELSKI et al., 2019). Atualmente são conhecidas sete espécies de algas dentro deste gênero: *P. wickerhamii*, *P. zopffii*, *P. blaschkeae*, *P. cutis*, *P. stagnora*, *P. ulmea* e *P. miyajii* (MASUDA et al., 2016; MORANDI et al., 2017).

A ocorrência de casos de mastite por *Prototheca* tem sido descrita em vários países. Além do Brasil (MORANDI et al., 2017), há relatos em países Europeus (JAGIELSKI et al., 2012), na China e Japão (SHAHID et al., 2015). As infecções intramamárias causadas por *Prototheca* são refratárias ao tratamento antimicrobiano e podem resultar em surtos, infecções crônicas, perda do quarto infectado e descarte precoce dos animais (WAWRON et al., 2013).

No Brasil, a mastite em bovinos ocasionada por algas foi primeiramente relatada em 1989, no Estado do Mato Grosso do Sul. Desde então foram relatados surtos no estado de São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Pernambuco, Goiás e Rio Grande do Sul (COSTA, 1989; LANGONI et al., 1992; CRISPIM et al., 1996; GOMES et al., 1997). *Prototheca blaschkeae* subsp. *brasiliensis* foi identificada recentemente em um rebanho leiteiro de Minas Gerais (MORANDI et al., 2017).

As mastites bovinas ocasionadas por *Prototheca* spp. geralmente ocasionam queda drástica na produção de leite, aumento significativo na contagem de células somáticas (CCS), secreção anormal na forma de coágulos, flocos ou leite aquoso, inchaço e perdas de leite do

quarto infectado, geralmente resultando em infecções crônicas (JANÓSI et al, 2001; JAGIELSKI et al., 2011).

A mastite por alga é um problema terapêutico sério, pois a *Prototheca* spp. não responde aos protocolos terapêuticos usuais. Os estudos prévios referentes à susceptibilidade *in vitro* e *in vivo* de algas apontam alta resistência a antibióticos e antifúngicos (WAWRON, 2013), o que geralmente implica em infecções crônicas e no descarte dos animais afetados.

### **2.2.2 Leveduras como agentes da mastite bovina**

Entre os agentes causadores da mastite ambiental, as leveduras tem sido relacionadas como patógenos emergentes. A mastite por fungos geralmente é de baixa prevalência, variando entre 0,1% a 17,3% (COSTA et al.; 2008; SANTOS; MARIN, 2005). Os principais gêneros de leveduras envolvidos na mastite micótica são *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* e *Candida*. As leveduras do gênero *Candida* são responsáveis por cerca de 80% de todos os casos de mastite micótica em bovinos (KRUKOWSKI et al., 2003; SANTOS; MARIN, 2005; COSTA et al., 2008; COSTA et al.; 2012; MENDES et al., 2018).

A principal fonte de infecção nos casos de mastite fúngica é o ambiente. Os agentes também podem ser transmitidos pela mão do ordenhador, ordenhadeiras mecânicas e outros equipamentos, sobretudo em condições inadequadas de higiene da ordenha. As lesões nos tetos também são outro fator predisponente a infecção (DWORECKA-KASZAK et al., 2012; HAYASHI et al., 2013). A utilização intramamária de alguns antibióticos, tais como a penicilina e tetraciclina, constitui fator de risco para a mastite micótica, uma vez que estes antimicrobianos constituem fontes de nitrogênio para as leveduras (YAMAMURA et al., 2007).

Surtos de mastite causados por leveduras foram particularmente relatados em rebanhos intensivamente manejados, nos quais houve falhas na higiene ambiental ou em associação com o tratamento intramamário repetitivo (COSTA et al.; 2008; COSTA et al., 2012).

### **2.3 Riscos à saúde pública associados a algas e fungos isolados de mastite bovina**

Tanto as algas quanto os fungos envolvidos na etiologia da mastite bovina podem ocasionar doenças em seres humanos. A prototecose pode apresentar diversas formas de apresentação, variando desde infecções localizadas a sistêmicas, como gastroenterite, bursite, peritonite e lesões cutâneas, com curso agudo ou crônico. As infecções podem se estabelecer

em indivíduos imunocomprometidos que ficam mais propensos à infecção generalizada (LASSA et al., 2011, LASS-FLORL; MAYR, 2007). As lesões têm desenvolvimento lento e não se curam espontaneamente; acometem a pele e tecido subcutâneo, principalmente de locais expostos como cabeça, pescoço e extremidades. Podem ocorrer variações no aspecto da lesão, incluindo placas eritematosas, pápulas, crostas, nódulos, úlceras, granulomas cutâneos e erupções eczematosas (THIELE, BERGMANN, 2002). A forma sistêmica é tipicamente oportunista, ocorrendo em pacientes com imunossupressão ou doenças crônicas. Os principais órgãos afetados são pele, tecido subcutâneo, intestino, sangue e baço (LASS-FLORL; MAYR, 2007).

Alguns fungos que estão presentes no ambiente leiteiro podem ocasionar infecções cutâneas e sistêmicas em seres humanos que podem levar o paciente a óbito. Infecções oculares também podem ocorrer (VASCONCELOS; ITO, 2011).

## **2.4 Controle químico do crescimento microbiano**

O tratamento de doenças utilizando substâncias químicas é chamado de quimioterapia. A busca por substâncias que auxiliem na eliminação de microrganismos patogênicos sem causar danos à saúde animal e do ser humano é de grande importância. As substâncias produzidas naturalmente por fungos e bactérias que agem contra os microrganismos são chamadas de antibióticos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Desde o advento da penicilina, na década de 1940, os antimicrobianos são amplamente utilizados no controle das doenças bacterianas, tanto na medicina humana quanto para a promoção da saúde e bem-estar animal. O uso de antimicrobianos para o controle da mastite é rotineiro nas fazendas de leite, sendo esta a doença que mais demanda a utilização de antimicrobianos na pecuária leiteira (BARLOW, 2011). A eficiência destes produtos é comprometida quando surge a resistência dos patógenos aos antimicrobianos, sendo influenciada por fatores como pressão seletiva, tipo de antimicrobiano administrado e frequência de mutação de genes de resistência nos microrganismos, o que compromete a eficácia do produto utilizado para o tratamento (GOODMAN; GILMAN'S, 2011).

A limpeza e desinfecção dos utensílios de ordenha são fundamentais para o controle da mastite e preservar a qualidade do leite; para isso o uso de produtos químicos, desinfetantes e antissépticos, é imprescindível. O agente deve apresentar toxicidade seletiva e conter características fundamentais como: ausência de toxicidade para seres humanos e animais; não irritar a pele e mucosa; ter ação germicida em baixas concentrações; ter baixo

efeito corrosivo e preservar a ação antimicrobiana na presença de matéria orgânica (DOMINGUES; LANGONI, 2001).

Existem muitos produtos no mercado para fins de desinfecção e antissepsia, os quais são compostos por princípios ativos variados, incluindo fenóis, álcoois, aldeídos, detergentes, agentes oxidantes, derivados de metais pesados, corantes, álcalis, ácido e compostos orgânicos naturais (DOMINGUES; LANGONI, 2001).

#### **2.4.1 Mecanismos de ação dos antimicrobianos**

Os antibióticos são classificados de acordo com seu mecanismo de ação (GOODMAN; GILMAN'S, 2011). Antibióticos que agem sobre a síntese da parede celular são chamados de seletivos, pois atuam apenas sobre a bactéria e não sobre o hospedeiro. Os glicopeptídeos,  $\beta$ -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenems, monobactâmicos e alguns inibidores das  $\beta$ -lactamases) e a bacitracina são alguns exemplos de antibióticos que agem ao nível da síntese de peptidoglicanos (GOODMAN; GILMAN'S, 2011).

A membrana celular é uma estrutura lipoprotéica, situa-se no interior da parede celular e recobre o citoplasma de toda a célula, controlando as trocas de substâncias. Os antibióticos que agem nesse local envolvem-se no processo de respiração celular, inibindo a fosforilação oxidativa e causam desorganização da membrana celular. A ação destes se restringe às bactérias Gram-negativas (GOODMAN; GILMAN'S, 2011; KATZUNG, 2014).

As bactérias contêm no seu cromossomo toda a informação genética necessária para a produção de proteínas e enzimas nos ribossomos. A perda da capacidade de síntese protéica interrompe o seu crescimento. Diferentes classes de antibióticos podem inibir estes mecanismos, tais como os aminoglicosídeos (gentamicina, tobramicina e amicacina), cloranfenicol, tetraciclina, macrolídeos (eritromicina, claritromicina e azitromicina) e clindamicina (GOODMAN; GILMAN'S, 2011; KATZUNG, 2014).

Alguns antibióticos atuam inibindo diretamente a síntese dos ácidos nucleicos. Fazem parte deste grupo as quinolonas (ciprofloxacina, norfloxacina e ofloxacina) que geralmente são dotadas de ampla atividade antimicrobiana (GOODMAN; GILMAN'S, 2011; KATZUNG, 2014).

O tratamento com antibióticos é uma das medidas importantes dentro de um programa de controle para a mastite bovina. No entanto, nota-se um problema crescente com relação à resistência dos patógenos causadores de mastite (DZIDIC, SUSKOVIC, KOS, 2008). A velocidade com que o fenômeno de resistência desenvolve é oposta àquela com que novas

drogas são descobertas ou desenvolvidas. A resistência pode ser uma propriedade particular das bactérias ou adquirida proveniente da obtenção de genes de resistência ou mutação cromossômica (DZIDIC; SUSKOVIC; KOS, 2008).

#### **2.4.2 Mecanismos de ação dos antissépticos**

Desinfecção é definida como o procedimento que visa eliminar os microrganismos presentes em superfícies inanimadas, enquanto antissepsia tem o mesmo objetivo, mas é o procedimento adotado sobre tecidos vivos. Alguns fatores podem afetar a eficácia da desinfecção/antissepsia, tais como: limpeza prévia da superfície; carga orgânica presente; tipo e nível de contaminação microbiana; as características dos microrganismos; a concentração do desinfetante/antisséptico; o tempo de exposição ao produto; presença de biofilmes; temperatura e pH da solução. Do mesmo modo que ocorre a resistência microbiana aos antibióticos o uso indiscriminado dos antissépticos pode desencadear a resistência dos microrganismos aos mesmos e a resistência cruzada a antimicrobianos (RUTALA; WEBER, 2008; CAMPOS et al., 2016).

Segundo McDonnell; Russell (1999), os antissépticos desnaturam as proteínas e enzimas que constituem a estrutura básica dos microrganismos, além de alterarem a membrana celular ou induzirem ação deletéria nos ácidos nucleicos.

A clorexidina é um antisséptico muito utilizado na antissepsia de tetos. Trata-se de um composto polibisguanida que apresenta potente ação antimicrobiana e de ação prolongada, permanecendo na pele do teto do animal por até seis horas sem causar reação tecidual (COUTINHO et al., 2012). Este biocida adsorve à parede celular dos microrganismos, causando lise e extravasamento do conteúdo citosólico (HUSSNE, et al., 2011).

Os compostos fenólicos sintéticos compreendem o hidroxidifenileter, triclorodifenileter, cresóis, fenilfenol, triclosano e outros. Estes compostos promovem a ruptura da parede bacteriana e precipitam as proteínas celulares. Em baixas concentrações inativam as enzimas, interferindo no metabolismo da parede celular (ANVISA, 2012). O triclosano é um antisséptico sintético cuja ação antimicrobiana está relacionada com a sua capacidade de bloquear a síntese de ácidos graxos por meio de inibição enzimática, impedindo a multiplicação de bactérias, fungos filamentosos e leveduras (CHEREDNICHENKO et al., 2012).

O peróxido de hidrogênio a 3% é considerado um desinfetante de alto nível, principalmente para materiais termo sensíveis. Este biocida causa a desnaturação das

proteínas e a ruptura da permeabilidade da membrana celular bacteriana, não tendo ação corrosiva sobre superfícies e materiais (ANVISA, 2012).

A utilização dos ácidos orgânicos como desinfetante/antisséptico é rotineira. Estes são amplamente empregados na antissepsia de tetos *pré e pós-dipping*. Quando estão na forma não dissociada, são lipofílicos e podem difundir-se facilmente através da membrana da bactéria para o citoplasma da célula. Uma vez dentro da célula, onde o pH é próximo do neutro, eles são dissociados e liberam prótons que acidificam o citoplasma, o que resulta na dissipação da força protomotora, suprimindo o sistema enzimático, o transporte de nutrientes, o metabolismo de aminoácidos e a síntese de DNA (GAUTHIER, 2005). A eficiência antimicrobiana do ácido depende da sua constante de dissociação (pKa). Quanto maior o pKa de um ácido, mais eficiente ele será como antimicrobiano (VIOLA; VIEIRA, 2007).

Compostos alógenos como iodo e cloro apresentam ação antibiótica no sentido indireto, atuando como fungistáticos ao modificar as condições locais, por isso, são constituintes de inúmeros produtos utilizados na rotina da fazenda, como uso de *pré e pós-dipping* e na limpeza de utensílios de ordenha. (COUTINHO et al., 2012).

Os compostos quaternários de amônia tem o seu espectro de ação dependente da concentração e tipo de composto, o tempo de exposição e do pH. Atuam inativando enzimas envolvidas na produção de energia, promovendo a desnaturação de proteínas e a ruptura da membrana celular dos microrganismos (ANVISA, 2012).

O ácido peracético tem potente ação biocida, promovendo a desnaturação das proteínas, alterando a permeabilidade da parede celular e oxidando as ligações sulfidril e sulfúricas em proteínas e enzimas. Tem uma ação bastante rápida sobre os microrganismos, inclusive sobre os esporos bacterianos em baixas concentrações (0,001 a 0,2%), conservando sua ação antimicrobiana mesmo na presença de matéria orgânica (ANVISA, 2012).

## **2.5 Suscetibilidade de algas isoladas de mastite a antimicrobianos e antissépticos**

As algas são geralmente resistentes aos fármacos utilizados no tratamento de mastite, como os agentes antifúngicos e antibacterianos, sendo também resistentes a tratamentos térmicos, como a pasteurização. Um aspecto importante relacionado à mastite por algas é a inexistência de tratamento eficaz, sendo recomendada a esterilização de quartos afetados ou o descarte de animais acometidos (GRZESIAK et al., 2016).

Estudos sobre a suscetibilidade de algas a antimicrobianos tem apontado altos índices de resistência. Malinowsky et al. (2002) avaliaram a sensibilidade *in vitro* de 28 estirpes de *P.*

*zopfii* isoladas de mastite clínica e subclínica, tendo verificado resistência dos isolados a diversos antimicrobianos, incluindo itraconazol, fluconazol, cetoconazol, clotrimazol, miconazol e tioconazol. Níveis intermediários de suscetibilidade foram verificados para a anfotericina B (35,7%) e nistatina (21,4%). Resultados semelhantes foram relatados por Wawron et al. (2013) que verificaram 100% de resistência para isolados de algas recuperados de mastite bovina para os antimicóticos clotrimazol, fluconazol, econazol e flucitosina.

No que se refere aos antibacterianos, as algas também se mostram resistentes. Milanov et al. (2006) relataram resistência de algas isoladas de casos de mastite aos antibacterianos cefoperazona, cefalexina, enrofloxacin, lincomicina e oxitetraciclina.

Diferentes antissépticos tem sido utilizados na antisepsia de tetos, incluindo iodo, ácido láctico, hipoclorito de sódio, clorexidina, dentre outros. A utilização de antissépticos antes da ordenha *pré-dipping* em baixas concentrações, tem sido preconizada como medida de prevenção da infecção da glândula mamária ocasionada por microrganismos de origem ambiental, visto que diminuem a carga microbiana dos tetos devido a contaminação por fezes, terra e matéria orgânica. Já o *pós-dipping*, que consiste na imersão imediata dos tetos após a ordenha, utiliza antissépticos em concentração superior ao *pré-dipping*, e possui ação predominante no controle de microrganismos de mastite contagiosa (SALERNO, 2007).

Salerno (2009) avaliou *in vitro* a eficiência do hipoclorito de sódio e do iodo frente a *P. zopfii*. O efeito algicida foi verificado em baixas concentrações para ambos os biocidas nas faixas de concentração que variaram de 0,62% a 0,15%. Alves et al. (2017) demonstraram alta suscetibilidade *in vitro* de isolados de *Prototheca* spp. há guanidina nas faixas de concentração de 0,001% a 0,035%.

## **2.6 Suscetibilidade de leveduras isoladas de mastite a antimicrobianos e antissépticos**

Lassa e Malinowski (2007) avaliaram o perfil de suscetibilidade de leveduras isoladas de mastite bovina a antimicóticos e verificaram resistência à anfotericina B, fluconazol, pimaricina, itraconazol, e sensibilidade a tioconazol, clotrimazole e 5-Fluorocitosina.

A ação de antissépticos frente a leveduras isoladas de casos de mastite bovina foi avaliada em diferentes estudos. Pedrini; Margatho (2003) verificaram uma significativa atividade *in vitro* do iodo a 1% e 2%. Coutinho et al. (2012) demonstraram eficácia no uso do amônio quaternário quando os agentes foram expostos por mais de 60 segundos. Neste mesmo estudo, o cloro apresentou resultados insatisfatórios, com mais de 80% cepas testadas resistentes para o biocida.

Coutinho et al. (2012) relataram 100% de suscetibilidade de leveduras isoladas de casos de mastite frente a clorexidina. Segundo estes autores, devido às características antimicrobianas deste antisséptico, o mesmo pode ser uma boa opção para o *pré* e o *pós-dipping*.

## 2.7 Caracterização das algas do gênero *Prototheca*

Os microrganismos do gênero *Prototheca* são algas unicelulares, aeróbias e imóveis, dotados de parede celular hialina com aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$  de espessura. De acordo com a espécie, estágio de desenvolvimento e meio de cultura, apresentam morfologia esféricas a ovaladas, com diâmetro entre 3 a 30  $\mu\text{m}$ . Possuem citoplasma basófilo granular, contendo um ou mais vacúolos, núcleo central pequeno com nucléolo, mitocôndrias, corpúsculos lipídicos, Complexo de Golgi e retículo endoplasmático (ACHA; SZYFRES, 2001).

*Prototheca* spp. se reproduz assexuadamente; o citoplasma passa por uma clivagem ou septação formando endósporos ou esporangiosporos. Dentro do esporângio ocorre uma divisão múltipla dentro do esporângio gerando formação do endósporo, que se desenvolvem e rompem a parede da célula mãe, liberando as estruturas ou células filhas (RIBEIRO et al., 2016).

Em função de estudos genotípicos conduzidos por pesquisadores alemães, foi sugerida a classificação de *P. zopfii* em três biótipos: I, II e III. O biótipo I que predomina nas fezes, contaminando estábulos de bovinos (variantes RZI-1, RZI-2 e RZI-3); o biótipo II isolado de mastite bovina (variantes RZII-1, RZII-2 e RZII-3) e o biótipo III isolado do ambiente de criatórios de suínos (variantes RZIII-1 e RZIII-2) e de casos humanos de onicoprototecose (variante RZIII-3) (ROESLER et al., 2003; MOLER et al., 2006). A *P. zopfii* biótipo III encontra-se filogeneticamente distante de outros biótipos, sendo atualmente denominada *Prototheca blaschkeae*. Os biótipos I e II foram classificados como genótipos 1 e 2 (ROESLER et al., 2006). O genótipo 1 predomina nas fezes dos animais e no ambiente, o genótipo 2 em mastite bovina (RIBEIRO et al., 2009).

Aouay et al. (2008), na Bélgica, pesquisaram o perfil molecular de 30 isolados de *Prototheca* spp. obtidos do leite de vacas com mastite e identificaram 27 isolados como *P. zopfii* genótipo 2 e três *P. blaschkeae*.

Jagielski et al. (2011), em estudo realizado na Polônia, identificaram pela primeira vez casos de mastite bovina por *P. blaschkeae* no país. Entre 44 isolados de *Prototheca* ssp. 43 (98%) foram identificados como *P. zopfii* genótipo 2 e um isolado como *P. blaschkeae*.



Salerno et al. (2010) descreveram pela primeira vez no Brasil a presença do genótipo 2 entre 22 cepas de *P. zopfii* isoladas de vacas com mastite, provenientes dos estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Goiás.

Marques et al. (2008), por meio da amplificação (PCR) das subunidades 18S do DNA ribossomal, realizaram análises de restrição do rDNA e análises filogenéticas em 41 cepas de *P. zopfii* isoladas de casos de mastite em rebanhos do norte de Portugal e identificaram 37 isolados como *P. zopfii* subsp. *hydrocarbonea* e 4 isolados da espécie *P. blaschkeae* (genótipo 3), demonstrando pela primeira vez o envolvimento desta espécie em infecções de glândula mamária bovina.

## 2.8 Caracterização de leveduras

Os fungos filamentosos estão aleatoriamente distribuídos na natureza, mas as leveduras são frequentemente relacionadas às infecções da glândula mamária (COSTA et al., 2008). Elas constituem um grupo de microrganismos eucariotos unicelulares; são fungos ascomicetos ou basidiomicetos unicelulares, produzem células simples, arredondadas, ovais ou alongadas, com multiplicação sexual ou assexual (KURTZMAN et al., 2011).

Ao microscópio, as leveduras se diferenciam de bactérias pela maior dimensão das suas células, podendo variar de 5 a 8 µm de diâmetro. Multiplicam-se em uma ampla faixa de pH ácido, em até 18% de etanol e em presença de 55% a 60% de sacarose. As colônias de leveduras são geralmente de consistência cremosa, brilhantes ou opacas, de diferentes cores, variando de marfim ao rosa e até vermelho (JAY, 2005).

Usualmente a identificação fenotípica dos isolados de leveduras é realizada por meio de testes bioquímicos convencionais que incluem a fermentação de diferentes carboidratos (QUINN et al., 1994) ou por meio de testes bioquímicos empregando-se kits miniaturizados (Kit API 20 AUX®), mas estes além de trabalhosos fornecem resultados pouco confiáveis.

A identificação por meio da amplificação e sequenciamento do gene rDNA 18S é estratégia comum, uma vez que este gene está presente em todos os eucariotos e, por ser uma região muito conservada no genoma, seu sequenciamento permite a caracterização da espécie. A região D1/D2 da subunidade ribossomal 26S e ITS tem sido utilizadas para diferenciar as espécies de leveduras (SCORZETTI et al., 2002).

## 2.9 Espectrometria de Massa, MALDI-TOF MS

A espectrometria de massas é uma técnica analítica que permite a identificação de compostos químicos de um determinado composto isolado. A técnica de ionização MALDI (sigla em inglês para *matrix-assisted laser desorption ionization*) baseia-se na dessorção a laser das moléculas. O analisador de massa TOF (sigla em inglês para *time-of-flight*) lança as moléculas ionizadas e aceleradas em um tubo sob vácuo e sem campo elétrico para medida do seu tempo de “vôo” até um detector. Esse tempo de “vôo” é proporcional à massa molar da molécula; sendo assim, esse caráter pode ter significado evolutivo e conseqüentemente possibilidade de emprego na filogenia dos grupos. Um espectrômetro de massa é formado basicamente de duas partes: o sistema de ionização das moléculas, responsável por vaporizá-las e carregá-las eletricamente, e o analisador de massa – o espectrômetro de massa propriamente dito – que separa os íons resultantes de acordo com a massa (CROXATTO; PROD’HOM; GREUB, 2012).

A técnica de espectrometria de massas é considerada uma das mais precisas da atualidade e serve para analisar as moléculas de maneira quantitativa e qualitativa. Quando se compara a tecnologia MALDI-TOF com outras técnicas laboratoriais para identificação de microrganismos, a principal vantagem dessa tecnologia é a agilidade para obtenção dos resultados. Entre o preparo do depósito e a leitura final, um resultado isolado pode ser obtido em menos de 30 minutos (CROXATTO; PROD’HOM; GREUB, 2012).

MALDI-TOF para identificação de espécies/gêneros, além de ser uma técnica rápida, simples e confiável, tem também um ótimo custo-benefício se comparada a outras técnicas de identificação proteica (KAUFMANN et al., 2011). A utilização do MALDI-TOF para identificação de táxons resolveria problemas básicos da taxonomia, como exemplares degradados pelo tempo e características taxonômicas muito subjetivas ou de difícil interpretação (CARPENTER et al., 2008; MEISWINKEL et al., 2008; KAUFMANN et al., 2011).

A técnica apresenta resultados satisfatórios na área de microbiologia veterinária, possibilitando a identificação de patógenos causadores de mastite, como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* (BARREIRO et al., 2010); e espécies de *Staphylococcus coagulase negativa* (TOMAZI et al., 2014) e *Corynebacterium spp.* (GONÇALVES et al., 2014).

Nonnemann et al. (2019) utilizaram a técnica de MALDI TOF MS para a caracterização uma grande variedade de patógenos causadores de mastite bovina entre eles,

*Corynebacterium bovis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Caracterizar o perfil de suscetibilidade a antissépticos e antimicrobianos em algas e leveduras isoladas de casos de mastite em bovinos.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Identificar os isolados de leveduras utilizando a técnica de MALDI-TOF.
- Determinar o perfil de suscetibilidade a antissépticos e antimicrobianos das algas e leveduras isoladas de mastite em rebanhos bovinos de Minas Gerais, São Paulo, Paraná.

### **4 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1 Microrganismos estudados**

Foram utilizados no estudo 150 isolados de leveduras e 64 isolados de algas obtidos de animais acometidos por mastite de rebanhos leiteiros dos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná. Todos os isolados foram mantidos congelados à -70°C em caldo BHI contendo 10% de glicerol até a utilização.

#### **4.2 Caracterização morfológica dos isolados de algas e leveduras**

Para a identificação morfológicas das algas e leveduras foi realizada a observação da morfologia colonial dos isolados semeados em Ágar Sabouraud. Neste meio, as leveduras produzem colônias de coloração creme, cremosa, brilhantes ou opacas, de diferentes cores,

variando de marfim ao rosa e até vermelho. A visualização da morfologia microscópica das leveduras foi realizada por meio de esfregaços corados pela técnica de Gram. Nestes, foi possível visualizar células que variam de 5 a 8  $\mu\text{m}$ , arredondadas, ovais ou alongadas e a presença de brotamentos (JAY, 2005; KURTZMAN et al., 2011).

As algas crescem de forma expressiva em Ágar Sabouraud, formando colônias grandes de coloração variando de branco a creme. A observação da morfologia microscópica foi realizada em esfregaços corados pelo azul de lactofenol, observando-se formas esféricas a ovaladas, com diâmetro entre 3 a 30  $\mu\text{m}$  (ACHA; SZYFRES, 2001).

### **4.3 Testes de resistência a antissépticos e antibacterianos**

Os testes de suscetibilidade foram determinados pela concentração inibitória mínima (CIM), utilizando-se a técnica de microdiluição em caldo Muller Hinton.

Todos os antibióticos foram solubilizados e diluídos de acordo com o indicado pelo CLSI (2013). Os antissépticos foram diluídos também em caldo MH, adaptando-se a técnica de microdiluição preconizada para obtenção da CIM para leveduras (NCCLS, 2002).

Resumidamente, para a avaliação da CIM, os microrganismos foram descongelados e semeados em meio ágar Sabouraud que foi incubado em condições de aerobiose, em estufa a 37°C por 48 horas. As culturas foram padronizadas utilizando-se a turbidez 1,0 da escala de Mac Farland que equivale a  $1,5 \times 10^8$  (UFC/mL). Os testes foram realizados utilizando-se microplacas estéreis com diluições seriadas dos antimicrobianos em 100 microlitros do caldo Muller-Hinton (Himedia®, Índia). Em cada poço contendo as concentrações do antimicrobiano, foram adicionados 10 microlitros de inóculo do microrganismo. Foram utilizados controles positivo e negativo em cada um dos ensaios. O controle positivo contendo o caldo e 10 microlitros de suspensão do microrganismo e o controle negativo apenas o caldo MH. As placas foram agitadas em vórtex e posteriormente incubadas por 48 horas a 37°C. Os testes foram realizados em duplicata. Após o período de incubação, a CIM foi obtida, correspondendo à menor concentração de cada antimicrobiano na qual não foi possível a detecção visual do crescimento microbiano. A CIM50 e CIM90 foram estabelecidas para cada isolado. A CIM50 equivale a concentração do antisséptico 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.

Os antimicrobianos e antissépticos e faixas de concentrações que foram utilizadas nos testes de suscetibilidade estão relacionados nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Antibióticos utilizados nos testes de suscetibilidade de algas e concentrações testadas

<b>Antibióticos testados</b>	<b>Concentrações testadas (%)</b>									
Cefalotina	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	
Ceftiofur	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	
Amicacina	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	
Sulfonamida	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	
Novobiocina	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	
Penicilina G	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	
Gentamicina	250	125	63	31	15,3	16	7,8	3,9	1,95	
Estreptomicina	256	128	64	32	16	8	4	2	1	
Polimixina B	256	128	64	32	16	8	4	2	1	
Lincomicina	256	128	64	32	16	8	4	2	1	
Neomicina	256	128	64	32	16	8	4	2	1	
Tetraciclina	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	

Fonte: Do autor (2019).

Tabela 2 - Antissépticos utilizados nos testes de suscetibilidade de algas e leveduras e concentrações testadas

<b>Antissépticos testados</b>	<b>Concentrações testadas (%)</b>									
Ácido Lático	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,015	0,007	0,003	0,001	
Triclosano	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,015	0,007	0,003	0,001	
Clorexidina	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,015	0,007	0,003	0,001	
Iodo	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,015	0,007	0,003	0,001	
Hipoclorito de sódio	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,015	0,007	0,003	
Peróxido de hidrogênio	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,015	0,007	
Glutaraldeído	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,015	0,007	
Ácido peracético	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,015	0,007	
Amônio quaternário	3	1,5	0,75	0,375	0,187	0,093	0,046	0,023	0,011	

Fonte: Do autor (2019).

#### **4.3.1 Ação algicida, algistática e fungicida, fungistática dos antissépticos**

Após a determinação da CIM, foi retirada uma alíquota de 10 µL do *well* da diluição correspondente à mesma que semeada em Ágar Sabouraud, seguindo-se período de incubação a 37°C por 24-48 horas. A presença de crescimento era indicativa de ação fungistática (fungos) ou algistática (algas) e a ausência de crescimento interpretada como ação fungicida e algicida, respectivamente.

#### **4.4 Identificação das leveduras por MALDI-TOF MS**

A identificação de espécies das leveduras por meio da ferramenta MALDI-TOF foi realizada no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA.

##### **4.4.1 Obtenção dos estratos proteicos**

A extração das proteínas dos isolados foi realizada pelo método de extração com ácido fórmico, de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante do equipamento de MALDI-TOF, sumarizado a seguir:

1-Uma porção de células cultivadas (de uma colônia única, uma alça de inoculação de 10 uL é o suficiente) foi transferida para um tubete esterilizado ao qual se acrescentou-se 300 µL de água deionizada e 900 µL de etanol puro;

2-A suspensão foi homogeneizada em agitador tipo vórtex por 30 segundos e, em seguida, foi realizada a centrifugação por 2 minutos a 13.000 rpm.

3-O resíduo de etanol foi removido e o sobrenadante foi recuperado com auxílio de uma micropipeta.

4-Foram adicionados 50 µL de ácido fórmico a 70% ao pellet, seguindo-se a homogeneização em agitador tipo vórtex por 30 segundos.

5-Foram adicionados 50 µL de acetonitrila à suspensão, seguido de centrifugação por 2 minutos a 13.000 rpm.

6-O sobrenadante foi coletado e estocado em microtubos, em freezer (-20°C).

#### **4.4.2 Obtenção de espectros de massas**

O volume de 1,0 µL do extrato protéico da levedura foi colocado em placa (mtp 384 Target Polished Steel; Bruker Daltonik), seguindo-se de secagem ao ambiente. Sobre o sobrenadante seco, foi acrescentado 1,0 uL de solução de matriz, composta de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) diluída em acetonitrila 50% e de ácido trifluoroacético 2,5%. Em seguida, as placas foram levadas ao aparelho de MALDI-TOF, onde os espectros de massas foram coletados na faixa de massas de 2.000-20.000m/z. Os espectros obtidos foram analisados pelo Programa MALDI Biotyper 3.0 (Bruker Daltonik) com as configurações padrão para obtenção da identificação de leveduras. O algoritmo usado pelo MALDI Biotyper 3.0 confronta os espectros da amostra desconhecida com amostras de referência contidas em um banco de dados. O procedimento de análise leva em consideração as massas e as intensidades relativas dos espectros desconhecidos (LARTIGUE et al., 2009).

#### **4.4.3 Construção do dendrograma de espectros gerados no MALDI-TOF**

Os resultados obtidos na análise realizada no MALDI-TOF foram transportados para o Programa Maldi-Biotyper 3.0 que gera dendrogramas baseados na similaridade dos perfis protéicos dos isolados.

#### **4.5 Análise Estatística**

Os resultados foram submetidos a análise estatística descritiva, utilizando-se o software SISVAR (versão 5.6).

### **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **5.1. Resultados dos testes de CIM dos antibacterianos e antissépticos para algas**

Os resultados obtidos nos testes de concentração inibitória mínima (CIM) para avaliar a suscetibilidade das algas aos antibióticos e antissépticos estão relacionados nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3 - Concentração Inibitória Mínima (CIM50/CIM90) dos antibióticos frente a algas isoladas de infecções intramamárias de bovinos

<b>Antibióticos</b>	<b>CIM50 (µg/mL)</b>	<b>CIM90 (µg/mL)</b>
<b>Gentamicina</b>	0,25	4
<b>Amicacina</b>	8	16
<b>Polimixina B</b>	8	8
<b>Cefalotina</b>	Indeterminado*	Indeterminado*
<b>Lincomicina</b>	Indeterminado*	Indeterminado*
<b>Neomicina</b>	Indeterminado*	Indeterminado*
<b>Penicilina G</b>	Indeterminado*	Indeterminado*
<b>Novobiocina</b>	Indeterminado*	Indeterminado*
<b>Ceftiofur</b>	Indeterminado*	Indeterminado*
<b>Sulfonamida</b>	Indeterminado*	Indeterminado*
<b>Tetraciclina</b>	Indeterminado*	Indeterminado*
<b>Estreptomicina</b>	Indeterminado*	Indeterminado*

\*- Houve crescimento em todas as concentrações

Fonte: Do autor (2019).

Nos testes de suscetibilidade das algas aos antibióticos as algas, somente os aminoglicosídeos e a polimixina B demonstraram ação inibitória, com CIM de 4µg, 16µg e 8µg, respectivamente para gentamicina, amicacina e polimixina B. Quanto aos demais antimicrobianos, não se observou ação inibitória, mesmo nas maiores concentrações testadas. Nossos resultados são corroborados por aqueles obtidos por Sobukawa et al. (2011), Morandi et al. (2016) e Shahid et al. (2016) em cujos trabalhos demonstraram altos índices de resistência das algas aos antibióticos testados. Nossos resultados, em concordância com os trabalhos supracitados, demonstram a alta resistência das algas aos antibacterianos que constituem a base dos medicamentos utilizados no tratamento da mastite, o que justifica a ineficácia dos protocolos terapêuticos e a tendência à cronicidade das infecções ocasionadas por estes agentes.

Estudos devem ser conduzidos com o intuito de explicar a ação dos aminoglicosídeos e da polimixina B sobre os isolados de algas, uma vez que se estes medicamentos tem ação direcionada para procariotos, não sendo esperada ação antimicrobiana contra eucariotos, conforme normalmente se observa para fungos.



Tabela 4 - Resultados dos testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM50/CIM90) dos antissépticos frente a algas isoladas de infecções intramamárias de bovinos

<b>Antibióticos</b>	<b>CIM50 (µg/mL)</b>	<b>CIM90 (µg/mL)</b>
<b>Ácido láctico</b>	Indeterminado*	Indeterminado*
<b>Glutaraldeído</b>	Indeterminado*	Indeterminado*
<b>Triclosano</b>	0,25	-
<b>Hipoclorito de sódio</b>	0,06	0,06
<b>Amônia quaternária</b>	0,01	0,01
<b>Peróxido de hidrogênio</b>	0,002	-
<b>Clorexidina</b>	0,0018	0,0018
<b>Iodo</b>	0,015	0,015
<b>Ácido peracético</b>	0,25	0,25

\*- Houve crescimento em todas as concentrações

Fonte: Do autor (2019).

Quanto aos testes de suscetibilidade aos antissépticos, verificou-se que 100% dos isolados de algas cresceram nas maiores concentrações de ácido láctico e glutaraldeído. Neste estudo, 55% dos isolados de algas foram inibidos na concentração de 0,25% de triclosano. A CIM do iodo foi de 0,015% para 86% dos isolados, enquanto o ácido peracético a 0,25% inibiu 80% dos isolados. Todos os isolados de algas foram inibidos nas menores concentrações de amônio quaternário, peróxido de hidrogênio e de clorexidina testadas.

Estudos prévios realizados com algas isoladas de mastite bovina demonstraram resultados similares aos obtidos no presente trabalho, com relatos de sensibilidade à clorexidina, iodo, amônio quaternário e ao ácido peracético (KRUKOWSKI et al., 2013; SALERNO et al, 2010; PEDRINI; MARGATHO, 2003; LASSA et al., 2011; GONÇALVES et al. 2015). A clorexidina age ao nível de parede celular, o que pode explicar a sua eficácia, já que as algas possuem parede celular espessa (HUSSNE, et al., 2011). A efetividade antimicrobiana do amônio quaternário e do peróxido de hidrogênio pode estar vinculada ao sua ação de desnaturação de proteínas. Estes biocidas apresentam um alto espectro de ação viabiliza o uso destes antissépticos no *pré-dipping* e *pós-dipping* como medida profiláticas para a mastite ocasionada por estes agentes infecciosos (ANVISA, 2012).

O ácido láctico apresentou efeito estimulante sobre o crescimento das algas, verificando-se aumento das contagens à medida que se incrementava a concentração do biocida. Tal fato sugere que as algas possam utilizar este antisséptico como substrato, o que

limitaria sua aplicabilidade como antisséptico no controle e na prevenção das IIM ocasionadas por estes agentes.

Na Tabela 5, encontram-se relacionados os resultados da avaliação da ação algicida ou algística dos antissépticos nas concentrações referentes à CIM frente aos isolados de algas. Este teste possibilita determinar se na concentração correspondente a CIM o antisséptico inativa ou se apenas inibe a multiplicação do agente. De acordo com os resultados obtidos, todas as concentrações referentes à CIM para os antissépticos tiveram ação algicida sobre os isolados.

Tabela 5 - Avaliação da ação algicida ou algística dos antissépticos frente os isolados de algas nas concentrações referente à CIM

<b>Antissépticos</b>	<b>Ação verificada</b>
Peroxido de hidrogênio	Algicida
Amônio quaternário	Algicida
Triclosano	Algicida
Clorexidina	Algicida
Iodo	Algicida
Ácido peracético	Algicida
Hipoclorito de sódio	Algicida
Ácido láctico	Estimulou o crescimento

Fonte: Do autor (2019).

### 5.1.1 Resultados dos testes de CIM para as leveduras

Tabela 6 - Resultados dos testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM50/CIM90) dos antissépticos frente a leveduras isoladas de infecções intramamárias de bovinos

<b>Antissépticos</b>	<b>CIM50</b>	<b>CIM90</b>
<b>Ácido láctico</b>	Indeterminado*	Indeterminado*
<b>Glutaraldeído</b>	Indeterminado*	Indeterminado*
<b>Triclosano</b>	0,0015	-
<b>Hipoclorito de sódio</b>	0,25	0,25
<b>Amônia quaternária</b>	0,02	0,02
<b>Peróxido de hidrogênio</b>	0,007	0,007
<b>Clorexidina</b>	0,0018	0,0018
<b>Iodo</b>	0,125	-
<b>Ácido peracético</b>	0,125	-

\*- Houve crescimento em todas as concentrações

Fonte: Do autor (2019).

Neste estudo, verificou-se quanto aos testes de suscetibilidade de leveduras aos antissépticos que o hipoclorito de sódio a 0,25% apresentou ação inibitória sobre 90% dos isolados. O iodo a 0,125% inibiu o crescimento de 41% das cepas e o ácido peracético também na concentração de 0,125% inibiu 70% dos isolados. Não houve crescimento nas menores concentrações de amônio quaternário, peróxido de hidrogênio, clorexidina e triclosano. Por outro lado, 100% dos isolados cresceram nas maiores concentrações testadas do ácido láctico (0,5%) e de glutaraldeído (2%). Nossos resultados são corroborados por estudos prévios (PEDRINI & MARGATHO, 2003; LASSA et al., 2007; COUTINHO et al. 2012; REDÜ, 2014) que também apontaram a sensibilidade de leveduras isoladas de mastite bovina frente à clorexidina, iodo, amônio quaternário e ao ácido peracético.

Como resultados deste estudo, os antissépticos que agem ao nível de parede celular (clorexidina, triclosano e amônio quaternário) foram mais eficazes na inibição do crescimento das leveduras, o que pode ser explicado pelo fato de as mesmas possuírem uma densa parede celular. Também houve inibição de crescimento frente aos antissépticos que tem ação na desnaturação de proteínas celular (peróxido de hidrogênio e ácido peracético). De modo análogo ao verificado nos testes de CIM para as algas, estes biocidas apresentam um alto espectro de ação, o que viabiliza o uso destes antissépticos no *pré-dipping* e *pós-dipping* como medida profiláticas para a mastite ocasionada por estes agentes infecciosos.

A Tabela 6 aponta os resultados da avaliação da ação fungicida ou fungistática dos antissépticos nas concentrações referentes à CIM frente aos isolados de leveduras. De forma semelhante ao descrito anteriormente nos testes de suscetibilidade das algas aos antimicrobianos, este aponta se a ação dos antissépticos na diluição correspondente à CIM elimina ou apenas inibe o crescimento do isolado. De acordo com estes testes, todas as concentrações referentes à CIM para os antissépticos tiveram ação fungicida sobre os isolados testados.

Tabela 7 - Ação fungicida, fungistática dos antissépticos perante os isolados de leveduras nas concentrações referente à CIM

<b>Antissépticos</b>	<b>Ação observada</b>
Peroxido de hidrogênio	Fungicida
Amônio quaternário	Fungicida
Triclosano	Fungicida
Clorexidina	Fungicida
Iodo	Fungicida
Ácido peracético	Fungicida
Hipoclorito de sódio	Fungicida

Em se tratando de isolados de leveduras e de algas não há um ponto de corte para se determinar a concentração inibitória mínima de antibióticos ou de antissépticos, o que impede a caracterização dos mesmos como resistentes ou suscetíveis frente aos diferentes antimicrobianos avaliados.

Há um grande número de desinfetantes de tetos no mercado a serem utilizados, tendo em suas formulações o iodo, compostos aniônicos ácidos, compostos de amônio quaternário, clorexidina, ácido láctico, hipoclorito de sódio, entre outros. A atividade bactericida, fungicida e algicida de vários destes biocidas foram bem documentadas na literatura (LASSA et al., 2011; COUTINHO et al., 2012; GONÇALVES et al., 2015). É decisão do produtor escolher o melhor produto que deve exibir alta atividade germicida e baixa toxicidade para o tecido animal.

Jagielski et al. (2012) relataram que variações nos valores encontrados de CIM podem estar relacionadas com a origem geográfica dos isolados, fatores ambientais, tecnológicos, protocolos terapêuticos utilizados anteriormente nos rebanhos, condições de profilaxia entre outros fatores que podem ocasionar mudanças genotípicas que refletem nos fenótipos de suscetibilidade dos isolados.

O uso indiscriminado de drogas terapêuticas é uma preocupação emergente na saúde coletiva. Estudos apontam que não somente o fenômeno da resistência dos microrganismos não se restringe apenas aos antibacterianos e que o uso continuado e indiscriminado de antissépticos, mesmo em baixas concentrações, pode estimular a resistência cruzada aos mesmos. Jutkina et al. (2018) demonstraram que baixas concentrações de triclosano e de clorexidina estimulam a transferência horizontal de genes de resistência, contribuindo para o desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos. Kampf (2018), relatou que concentrações subinibitórias de cloreto de benzalcônio foram associadas a uma maior frequência de resistência frente à ampicilina, cefotaxima e sulfametoxazol em bactérias Gram-negativas e que concentrações subinibitórias de clorexidina desencadeou aumento da resistência à ceftazidima, sulfametoxazol, imipenem, cefotaxima e tetraciclina. Estes autores relataram o aumento da resistência aos antimicrobianos e a resistência cruzada aos mesmos em subconcentrações de triclosano, octenidina, hipoclorito de sódio e cloreto de didecildimetilamônio.

## 5.2 Resultados parciais da caracterização de leveduras pelo MALDI-TOF MS

Por meio da técnica de MALDI-TOF foram identificadas 100% de 37 cepas de leveduras submetidas ao teste (Tabela 8).

Tabela 8 - Resultados da identificação de leveduras isoladas de infecções intramamárias de bovinos por meio da técnica de MALDI-TOF MS

<b>Espécie</b>	<b>Número de isolados</b>	<b>Frequência percentual</b>
<i>Candida parapsilosis</i>	3	8,1%
<i>Candida rugosa</i>	3	8,1%
<i>Candida pararugosa</i>	7	18,91%
<i>Candida glabrata</i>	1	2,70%
<i>Issatchenkia orientalis</i>	22	59,45%
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	1	2,70%

Fonte: Do autor (2019).

Os resultados da técnica de MALDI-TOF apontaram seis espécies diferentes, entre os 37 isolados submetidos ao teste: *Candida parapsilosis*, *Candida rugosa*, *Candida pararugosa*, *Candida glabrata*, *Kluyveromyces marxianus* (*Candida kefir*) e *Issatchenkia orientalis* (*Candida krusei*). Esta última foi a espécie predominante entre os isolados.

Os resultados de caracterização das espécies das leveduras obtidos no presente estudo demonstraram a predominância de algumas espécies entre os isolados de mastite bovina, em concordância com estudos prévios citados na literatura. Du et al. (2018), na China, identificaram pela técnica de espectrometria de massa as espécies *C. krusei* e *C. parapsilosis* como causadoras da mastite em bovinos. Seker (2010), na Turquia, isolou 207 espécies de *Candida* de casos de mastite clínica e subclínica de bovinos, dentre elas *C. krusei* (34,8%), *C. rugosa* (16,4%), *C. kefir* (12,6%), *C. albicans* (10,1%) e *C. tropicalis* (9,2%). Dworecka-Kaszak et al.(2012) identificaram, na Polônia, *C. parapsilosis* (25 cepas) e *C. krusei* (15 cepas) entre 44 isolados de origem bovina estudados. Por outro lado, nossos resultados, embora sejam parciais, estão em desacordo com os resultados relatados por Mendes et al. (2018), segundo os quais *Candida albicans* foi a espécie predominante em isolados de mastite fúngica, representando cerca de 50% dos isolados, seguida de *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* presentes em torno de 10 a 25%, respectivamente.

Estudos apontam aumento no número de IIM ocasionadas por leveduras, o que pode estar relacionado ao uso repetitivo de antibióticos intramamários (COSTA et al., 2008;

COSTA et al., 2012) e influências sazonais que podem contribuir para o desenvolvimento dos fungos (GAUDIE et al., 2009, RANJAN et al., 2011 e ZARAOZA et al., 2011; KUMAR et al 2016).

Nossos resultados parciais apontaram a predominância *Issatchenkia orientalis* (*Candida kruzei*) como agente principal das IIM fúngicas no presente estudo. Segundo Seker (2010), as espécies de *Candida* são patógenos comumente isolados de infecções na glândula mamaria de bovinos, em associação com condições de baixa higiene na rotina da fazenda, o que deprime o sistema imune e facilita a colonização dos tetos por patógenos ambientais, aumentando o risco da mastite. Costa et al. (2008) e Costa et al. (2012) relataram que embora as más condições de ambiente possam estar envolvidas na ocorrência de IIM por estes agentes, a terapia intramamária repetitiva é um fator de risco também muito importante.

### **5.3 Dendrograma confeccionado por meio dos perfis protéicos obtidos no MALDI-TOF MS**

Dois dendrogramas, baseados nos perfis protéicos obtidos no MALDI-TOF MS foram gerados pelo programa Biotyper 3.0 (Bruker) (Figuras 1 e 2).

A Figura 1 se refere ao dendrograma formado pelos 37 isolados, ilustrando a relação filogenética entre estes. Em se tratando de isolados oriundos de diferentes espécies e procedentes de locais variados, o espectro proteico é muito semelhante, com nível de distância 1,5, sugerindo que estes possuem perfil proteico muito semelhante, principalmente dentro da espécie.

O espectro de massas gerado fornece um perfil proteômico do microrganismo, sendo este perfil único para cada espécie de microrganismo, sendo possível inclusive distinguir picos específicos para os gêneros e espécies. Na análise por MALDI Biotyper, cada perfil pode ser automaticamente comparado a uma biblioteca de espectros de referência, gerando a lista dos microrganismos mais estreitamente relacionados (ANGELETTI, 2016).

Figura 1 - Dendrograma obtido por meio dos perfis protéicos obtidos no MALDI-TOF MS identificação de leveduras isoladas de casos de mastite bovina

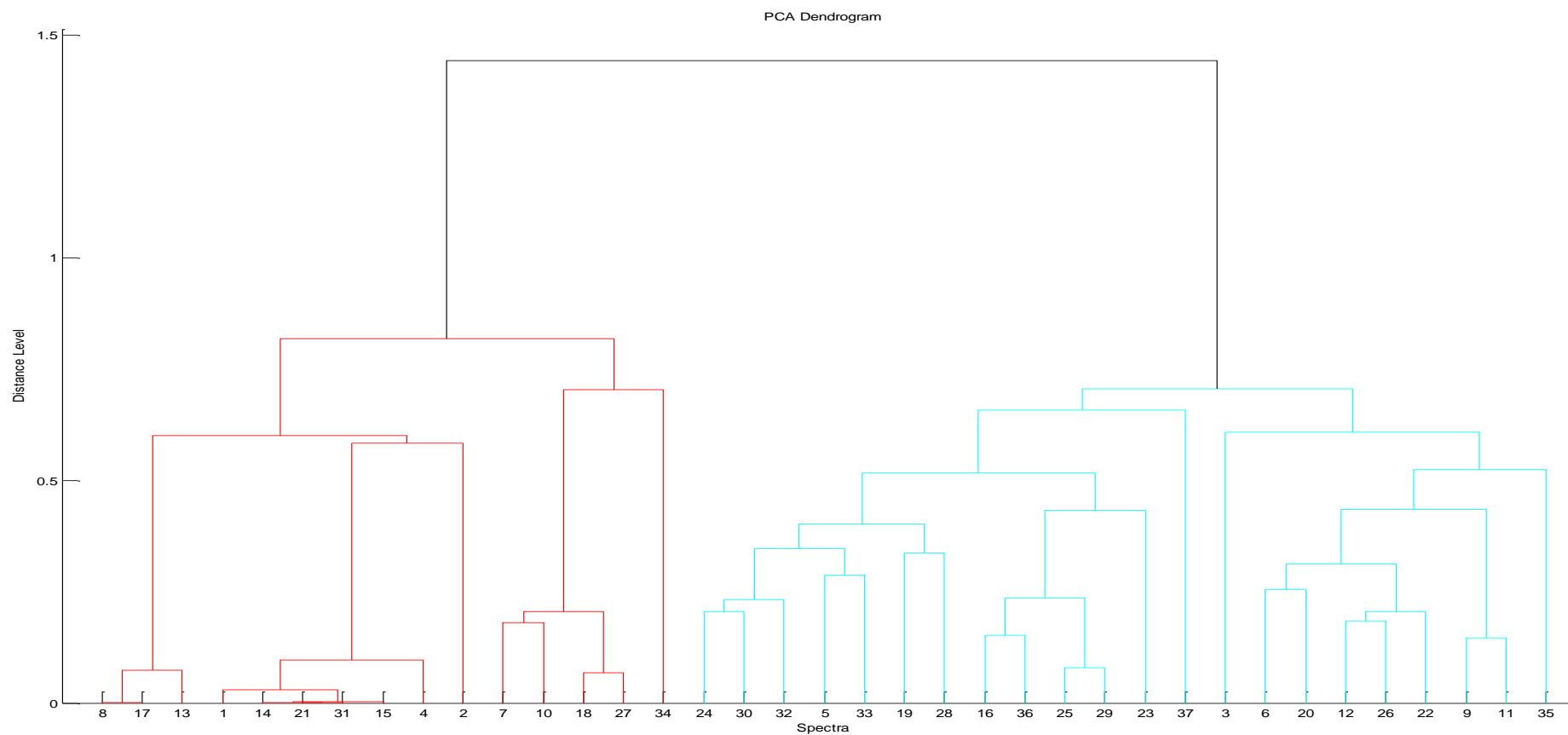


Tabela 9 - Posição dos isolados de levedura no dendrograma 1, gerado com base nos perfis protéicos obtidos no MALDI-TOF MS, pelo programa Biotyper 3.0 (Bruker)

Posição no cluster	Espécie de Levedura	Posição no cluster	Espécie de Levedura
8	<i>Candida parapsilosis</i>	5	<i>Issatchenkia orientalis</i>
17	<i>Candida parapsilosis</i>	33	<i>Issatchenkia orientalis</i>
13	<i>Candida parapsilosis</i>	19	<i>Issatchenkia orientalis</i>
1	<i>Candida pararugosa</i>	28	<i>Issatchenkia orientalis</i>
14	<i>Candida pararugosa</i>	16	<i>Issatchenkia orientalis</i>
21	<i>Candida pararugosa</i>	36	<i>Issatchenkia orientalis</i>
31	<i>Candida pararugosa</i>	25	<i>Issatchenkia orientalis</i>
15	<i>Candida pararugosa</i>	29	<i>Issatchenkia orientalis</i>
4	<i>Candida pararugosa</i>	23	<i>Issatchenkia orientalis</i>
2	<i>Candida glabrata</i>	37	<i>Issatchenkia orientalis</i>
7	<i>Candida rugosa</i>	3	<i>Issatchenkia orientalis</i>
10	<i>Candida parapsilosis</i>	6	<i>Issatchenkia orientalis</i>
18	<i>Candida rugosa</i>	20	<i>Issatchenkia orientalis</i>
27	<i>Candida rugosa</i>	12	<i>Issatchenkia orientalis</i>
34	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	26	<i>Issatchenkia orientalis</i>
24	<i>Issatchenkia orientalis</i>	22	<i>Issatchenkia orientalis</i>
30	<i>Issatchenkia orientalis</i>	9	<i>Issatchenkia orientalis</i>
32	<i>Issatchenkia orientalis</i>	11	<i>Issatchenkia orientalis</i>
--	--	35	<i>Issatchenkia orientalis</i>

Fonte: Do autor (2019).

Nota-se no dendrograma 1 o agrupamento dos isolados em dois grandes clusters. O primeiro (em vermelho) congrega levedura de espécies diferentes. As três primeiras posições do dendrograma 1 correspondem à uma única espécie: *Candida parapsilosis*. Da quarta posição até a nona foram alocados os isolados de *Candida pararugosa* e, em seguida, *Candida glabrata*, *Candida rugosa*, *Candida parapsilosis*, e novamente *Candida rugosa*. No final deste cluster foi alocado um único isolado de *Kluyveromyces marxianus*. O segundo grande cluster (em azul) congregou apenas isolados de *Issatchenkia orientalis* (*Candida kruzei*), demonstrando a similaridade proteica entre estes isolados.

A Figura 2 também apresenta um dendrograma obtido a partir do perfil proteico de isolados oriundos de um mesmo rebanho do sul de Minas Gerais no qual houve um surto de mastite bovina por leveduras. Nota-se, em conformidade com o dendrograma da Figura 1, grande similaridade protéica entre isolados, com nível de distância de 1,4. Entretanto, esperava-se neste caso, maior nível de similaridade em função da origem comum dos isolados. O dendrograma foi dividido em dois grandes clusters. No primeiro cluster (em



vermelho), onde foram congregados 5 isolados: em primeira e segunda posição *Candida pararugosa*, em seguida *Candida rugosa* e *Kluyveromyces marxianus* e por último um isolado de *Issatchenkia orientalis* que se destaca dos dois clusters formados, supondo um perfil proteico diferente até mesmo dos isolados de sua espécie. O segundo grande cluster é formado apenas por isolados de *Issatchenkia orientalis*, constituindo um cluster que denota perfis protéicos muito semelhantes entre os isolados deste cluster.

A análise dos dendrogramas 1 e 2, aponta grande similaridade nos perfis protéicos dos isolados de levedura estudados, ainda que oriundos de espécies diferentes que diferem também espacial e temporalmente em termos de origem.

Figura 2 - Dendrograma obtido por meio dos perfis protéicos obtidos no MALDI-TOF MS para de leveduras isoladas de um surto de mastite bovina em Minas Gerais

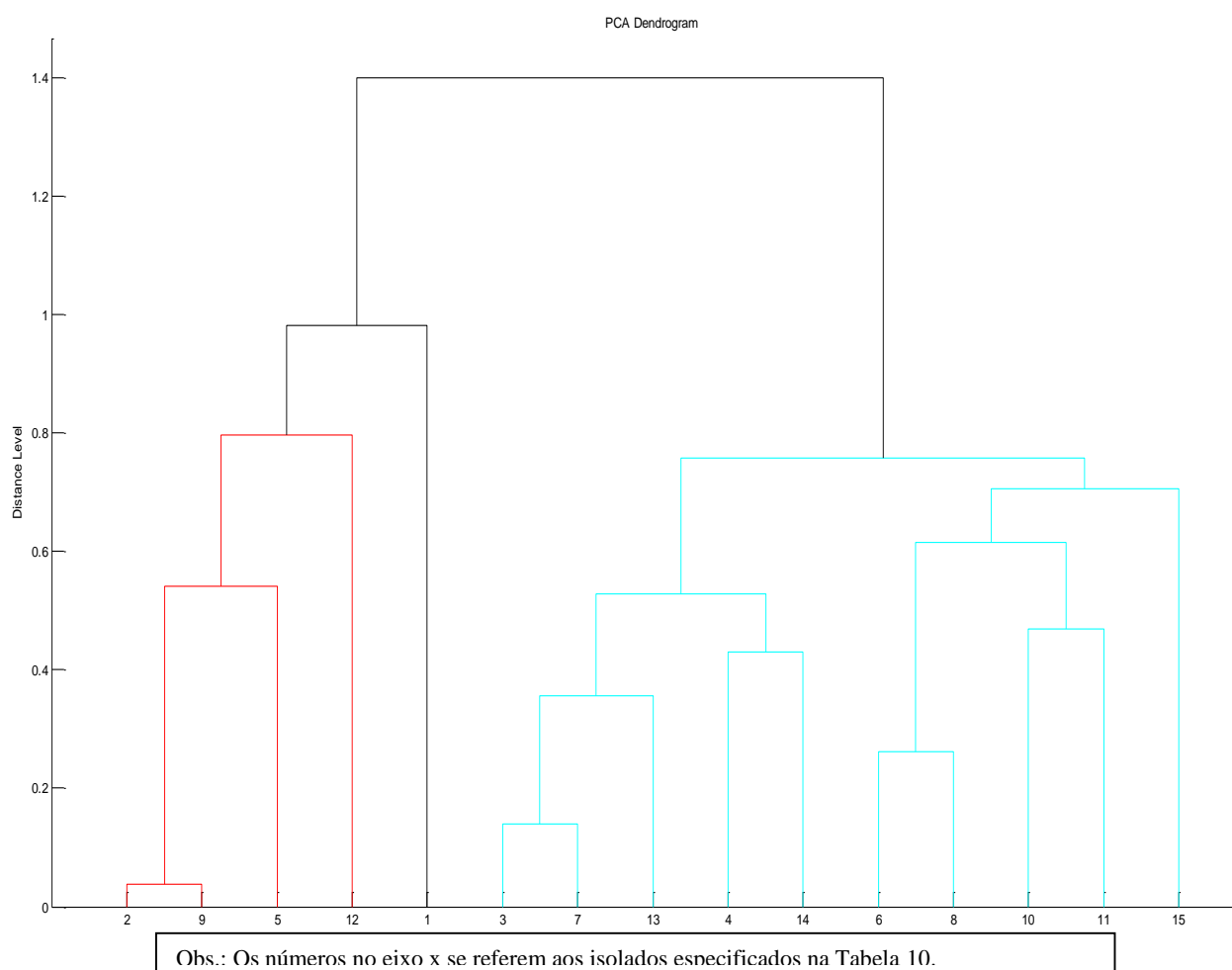


Tabela 10 - Posição dos isolados de levedura no dendrograma 2, gerado com base nos perfis protéicos obtidos no MALDI-TOF MS, pelo programa Biotyper 3.0 (Bruker)

<b>Posição no cluster</b>	<b>Espécie de Levedura</b>
2	<i>Candida pararugosa</i>
9	<i>Candida pararugosa</i>
5	<i>Candida rugosa</i>
12	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
1	<i>Issatchenkia orientalis</i>
3	<i>Issatchenkia orientalis</i>
7	<i>Issatchenkia orientalis</i>
13	<i>Issatchenkia orientalis</i>
4	<i>Issatchenkia orientalis</i>
14	<i>Issatchenkia orientalis</i>
6	<i>Issatchenkia orientalis</i>
8	<i>Issatchenkia orientalis</i>
10	<i>Issatchenkia orientalis</i>
11	<i>Issatchenkia orientalis</i>
15	<i>Issatchenkia orientalis</i>

Fonte: Do autor (2019).

Neste estudo foi possível fazer uma identificação precisa dos controles dentro da biblioteca, constatando a confiabilidade da técnica na identificação de espécies de leveduras. Vários estudos já foram realizados comprovando a eficácia do MALDI-TOF na identificação de uma grande variedade de espécies de microrganismos (BARREIRO et al., 2017; NONNEMANN et al., 2019).

Este estudo possibilitou a identificação de espécies de isolados de leveduras pela técnica de MALDI-TOF MS e a avaliação dos perfis de suscetibilidade de algas e leveduras a antimicrobianos e antissépticos *in vitro*, fornecendo conhecimentos que poderão ser úteis no controle e na prevenção das infecções intramamárias ocasionadas por estes agentes.

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos *in vitro* apontaram resistência das algas aos antibacterianos, exceção para gentamicina, amicacina e polimixina B, o que sugere potencial de uso destes medicamentos no tratamento da mastite ocasionada por estes agentes. Testes complementares deverão ser posteriormente realizados para a avaliar a efetividade destes antibióticos *in vivo*.

Os isolados de algas apresentaram suscetibilidade para a maioria dos antissépticos testados, exceção para glutaraldeído. O antisséptico ácido láctico incrementou o crescimento das algas, sugerindo que estas possam utilizá-lo como substrato para o crescimento.

Todos os antissépticos testados apresentaram ação inibitória em baixas concentrações contra as leveduras, sugerindo seu possível uso na rotina de fazendas leiteiras como *pré* e *pós-dipping*, exceção para o ácido láctico e glutaraldeído que demonstraram baixa efetividade.

A espectrometria de massa, MALDI-TOF MS, permitiu identificar os isolados de leveduras, apontando a predominância da *Issatchenkia orientalis* anteriormente denominada *Candida krusei* entre os isolados testados. A análise dos dendrogramas obtidos por meio do programa Biotyper 3.0 (Bruker) apontou grande similaridade nos perfis protéicos dos isolados estudados, indicando similaridade filogenética entre os mesmos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. Washington: Organizacion Panamericana de La Salud, 3.ed. 398, 2001.
- ANGELETTI, S. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. **Journal of Microbiological Methods**. 2016, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2016.09.003>
- ANVISA. Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria ANVISA – Segurança do Paciente em Serviço de Saúde: **Limpeza e Desinfecção de Superfícies**, Brasília 2012.
- ALVES, A. C., CAPRA, E., MORANDI, S., CREMONESI, P., PANTOJA, J. C. F., LANGONI, H., et al. In vitro algicidal effect of guanidine on *Prototheca zopfii* genotype 2 strains isolated from clinical and subclinical bovine mastitis. **Lett. Appl. Microbiol.** 64, 419–423. 2017.
- AOUAY, A.; COPPÉE, F.; CLOET, S.; CUVELIER, P.; BELAYEW, A.; LAGNEAU, P.E.; MULLENDER, C. Molecular characterization of *Prototheca* strains isolated from bovine mastitis. **Journal of Medical Mycology**, v. 18, p. 224-227, 2008.
- AZEVEDO, C.; PACHECO, D.; SOARES, L.; ROMÃO, R.; MOITOSO, M.; MALDONADO, J.; GUIX, R.; SIMÕES, J. Prevalence of contagious and enviromental mastites-causing bactéria in bulk tank milk and its relationships with milking pratices of dairy cattle herds in São Miguel Island (Azores). **Tro Anim Health Prod.** 48 (2): 451-9. 2016.
- BARREIRO, J. R.; FERREIRA, C. R.; KOSTRZEWA, M.; MAIER, T.; WEGEMANN, B.; BÖETTCHE, V.; EBERLIN, M. N.; SANTOS, M. V. Rapid and comprehensive identification of subclinical cow mastitis pathogens in milk by MALDI-TOF mass spectrometry. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 5661-5667, 2010.
- BARREIRO, J.R.; GONÇALVES, J.L.; BRAGA, P.A.; DIBBERN, A.G.; EBERLIN, M.N.; VEIGA DOS SANTOS, M. Non-culture-based identification of mastitis-causing bacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. **Journal of Dairy Science** , 100 , 2928 – 2934, 2017.
- BOZENA, D.K.; ALICJA, K.; DANIEL, S.; MIROSLAW, K.; MALGORZATA, B. High Prevalence of Candida Yeast inMilk Samples from Cows Suffering fromMastitis in Poland. **The ScientificWorld Journal** Volume 2012, Article ID 196347, p.5, 2012.
- BRADLEY, A. J. Bovine mastitis: An evolving disease. **The Veterinary Journal**, v. 164, n. 2, p. 116- 128, 2002.
- BRANKO, S., D. VASILEV, N. KARABASIL, I. VUČUROVIĆ, N. ČOBANOVIĆ, M.BABIĆ, AND V. KATIĆ. Molecular identification of *Prototheca zopfii* genotype 2 mastitis isolates and their influence on the milk somatic cell count. **Vet. Arh.** 87:249–258. 2017.
- CAMPOS, F,L; VALENTE, P; AVANCINI, C, M. Activity of iodophor and quaternary ammonium compound disinfectants on *Candida* standard and clinical isolates of bovine

mastites. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**. v.10, n.4. p. 716–725, out -dez 2016.

CAPRA, E.; CREMONESI, P.; CORTIMIGLIA, C.; BIGNOLI, G.; RICCHI, M.; MORONI, P.; PESCE, A.; LUINI, M.; CASTIGLIONI, B. Simultaneous identification by multiplex PCR of major *Prototheca* spp. isolated from bovine and buffalo intramammary infection and bulk tank. **Letters in Applied Microbiology**, v. 59, p. 642-664, 2014.

CARPENTER, S.; MELLOR, P.S.; TORR, S.J. Control techniques for Culicoides biting midges and their application in the U.K. and northwestern Palaeartic. **Medical and Veterinary Entomology**. 22: 175–87, 2008.

CHEREDNICHENKO, G.; ZHANG, R.; BANNISTER, R. A.; TIMOFEYEV, V.; LI, N.; FRITSCH, E. B.; FENG, W.; BARRIENTOS, G. C.; SCHEBB, N. H.; HAMMOCK, B. D.; BEAM, K. G.; CHIAMVIMONVAT, N.; PESSAH, I. N. Triclosan impairs excitation–contraction coupling and Ca<sup>2+</sup> dynamics in striated muscle. **Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)**. 2012.

CINAR, M.; SERBESTER, U.; CEYHAN, A.; GORGULU, M. Effect of somatic cell count on milk yield and composition of first and second lactation dairy cows. **Italian Journal of Animal Science**, v.14, n.1, p.105-108, 2015.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. CLSI document M07- A9. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**; 2012a. Disponível em <<http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/03-CLSI-M07-A9-2012.pdf>>

COSTA G.M., PEREIRA U.P., SOUZA-DIAS M.A.G. & SILVA N. Yeast mastitis outbreak in a Brazilian dairy herd. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** São Paulo, v. 49, n. 3, 239-243, 2012.

COSTA, G. M.; BARROS, R.A.; CUSTÓDIO, D. A.C. et al. Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite em bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.80, n.3, p.297-302, Jul/set., 2013.

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

CONAB – **Companhia Nacional de Abastecimento**. Leite e Derivados. Conjuntura Mensal Especial. Abril 2017. <[Http://www.conab.gov.br](http://www.conab.gov.br)> Acesso em: 02 fevereiro 2018.

COUTINHO, L.C.A., MEDEIROS, E.S., SILVEIRA, N.S.S., SILVA, L.B.G. & MOTA, R.A. Eficácia in vitro de desinfetantes utilizados na anti-sepsia dos tetos frente a leveduras isoladas do leite de vaca com mastite. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 32, n. 1, p. 61-65, 2012

CROXATTO, A.; PROD'HOM, G.; GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS Microbiol. Rev.** 36:380 – 407, 2012.

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

DE VliegHer, S. et al. Invited review: Mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 3, p. 1025–40, mar. 2012.

DWORECKA-KASZAK, B.; KRUTKIEWICZ, A.; SZOPA, D.; KLECZKOWSKI, M.; BIEGAŃSKA, M. High prevalence of *Candida* yeast in milk samples from cows suffering from mastitis in Poland. **Scientific World Journal**. 2012: 1-5, 2012.

DZIDIC, S., SUSKOVIC, J., KOS, B. Antibiotic resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. **Food Technology Biotechnology**, Zagreb -Croácia, v. 46, n. 11, 11-21, Nov. 2008.

DOMINGUES, P.F.; LANGONI, H. – **Manejo sanitário animal**. Rio de Janeiro: EPUB, 2001.

ESRA SEKER. Identification of *Candida* Species Isolated from Bovine Mastitic Milk and Their In Vitro Hemolytic Activity in Western Turkey. **Mycopathologia** 169:303–308, 2010.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Dairy Production and Products – Milk Production**. Disponível em <<http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/milk-production/en/#.V3AZwbgrLIV>> Acesso em 24 jun. 2016.

GAO, J., H. ZHANG, J. HE, Y. HE, S. LI, R. HOU, Q. WU, Y. GAO, AND B. HAN. Characterization of *Prototheca zopfii* associated with outbreak of bovine clinical mastitis in herd of Beijing, China. **Mycopathologia** 173:275–281, 2012.

GAUTHIER, R. Modo de ação dos acidificantes e interesse que geram na fase de crescimento e terminação. **Revista Pork World**, Paulínia, ano 5, n. 28, p. 52-58, set/out, 2005.

GONÇALVES, J. L.; TOMAZI, T.; BARREIRO, J. R.; BRAGA, P. A. C.; FERREIRA, C. R.; ARAÚJO JÚNIOR, J. P.; EBERLIN, M. N.; SANTOS, M. V. Identification of *Corynebacterium* spp. isolated from bovine intramammary infections by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Veterinary Microbiology**, v. 173, p. 147-151, 2014.

GONÇALVES, J.L., LEE, S.H.I., ARRUDA, E.P., GALLES, D.P., CAETANO, V.C., OLIVEIRA, C.A.F., FERNANDES, A.M. AND SANTOS, M.V. Biofilm-producing ability and efficiency of sanitizing agents against *Prototheca zopfii* isolates from bovine subclinical mastitis. **J Dairy Sci** 98, 3613–362, 2015.

GRZESIASK, B.; GLOWACKA, A.; KRUKOWSKI, H.; LISOWSKI, A.; LASSA, H.; SIENKIEWICZ, M. The In Vitro Efficacy of Essential Oils and Antifungal Drugs Against *Prototheca zopfii*. **Mycopathologia**, Published online: Springer Science+Business Media Dordrecht, 2016.

GOODMAN & GILMAN'S. **The Pharmacological basis of Therapeutics**. 12<sup>a</sup> ed. Nova Iorque: McGraw Hill, 2011. 2109

GÜNTER, K. Biocidal Agents Used for Disinfection Can Enhance Antibiotic Resistance in Gram-Negative Species. **Antibiotics** 7, 110; 2018. doi:10.3390/antibiotics7040110

HAYASHI, T. et al. Molecular-based identification of yeasts isolated from bovine clinical mastitis in Japan. **J Vet Med Sci.**; 75 (3): 387-90, 2013.

HOGVEEN, H.; HUIJPS, K.; LAM, T.J.G.M. Economic aspects of mastitis: new developments. **N.Z. Vet. J.** 59(1):16-23. 2011.

HO-SUNG, P.; DONG, C.M.; BANG-HUN, H.; SUK-KYUNG, L. Short communication: Occurrence and persistence of *Prototheca zopfii* in dairy herds of Korea. **Journal of Dairy Science** Vol. 102 No. 3, 2019.

HUSSNE, R.P.; BATISTA, A.U.D.; BONAN, R.F. Comparação do uso do Hipoclorito de sódio e da Clorexidina como solução irrigadora de tratamento endodôntico: revisão de literatura. **Revista brasileira de ciências da saúde**.15(2): 237-44. 2011.

JAGIELSKI, T., LASSA, H., AHRHOLDT, J., MALINOWSKI, E., ROESLER, U. Genotipagem de bovinos *Prototheca* mastite isolados de Poland. **Veterinario. Microbiol.** 149: 283-287, 2011.

JAGIELSKI, T. et al. A survey on the incidence of *Prototheca* mastitis in dairy herds in Lublin province, Poland. **Journal of Dairy Science** Vol. 102 No. 1, 2019.

JAGIELSKI, T., P. et al. Multicentre E-test evaluation of *in vitro* activity of conventional antifungal drugs against European bovine mastitis *Prototheca* spp. isolates. **J. Antimicrob. Chemother.** 67:1945–1947, 2012.

JÁNOSI, S. et al. *Prototheca zopfii* mastitis in dairy herds under continental climatic conditions. **Veterinary Quarterly**, 23:80–83, 2001.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. São Paulo: Artmed, 2005.

JUN. D.U.; XIAOYU. W.; HUIXIA, L.U.O.; YUJIONG, W.; XIAOMING, L.; XUEZHANG, Z. Epidemiological investigation of non-albicans *Candida* species recovered from mycotic mastitis of cows in Yinchuan, Ningxia of China. **BMC Veterinary Research**. 14:251, 2018.

JUTKINA, J., MARATHE, N.P., FLACH, C.-F., LARSSON, D.G.J. Antibiotics and common antibacterial biocides stimulate horizontal transfer of resistance at low concentrations. **Science of the Total Environment**. 616–617, p.172–178. 2018.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T. The yeasts, a taxonomic study. 5th ed. Amsterdam: **Elsevier Science**, v.2, 1062p, 2011.

KATZUNG, B. **Farmacologia Básica e Clínica**. 12<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2014. 1228 p.

KAUFMANN, C., ZIEGLER, D., SCHAFFNER, F., CARPENTER, S., PFLÜGER, V., MATHIS, A. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry for characterization of *Culicoides nubeculosus* biting midges. **Medical and Veterinary Entomology**. 25(1): 32-8, 2011.

KEEFE, G. Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. **The Veterinary clinics of North America**. Food animal practice, v. 28, n. 2, p. 203–16, jul. 2012

KRUKOSWKI, H. et al. 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

KRUKOWSKI, H., LISOWSKI, A., ROZANSKI, P. AND SKORKA, A. Yeasts and algae isolated from cows with mastitis in the south-eastern part of Poland. Polish. **J. Vet. Sci.**, 9: 181–184, 2006.

KRUKOWSKI, H., LISOWSKI, A., NOWAKOWICZ-DE BEK, B., WLAZŁO, Ł. Susceptibility of *Prototheca zopfii* strains isolated from cows with mastitis to chlorhexidine and iodine. **Turk J Vet Anim Sci**;37:106–8, 2013.

KUMAR, N. et al. Episodes of clinical mastitis and its relationship with duration of treatment and seasonality in crossbred cows maintained in organized dairy farm. **Vet. World**. 9 (1): 75–79, 2016.

KURTZMAN, C.P. Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of *Saccharomycetaceae* and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Naumovia*, *Vanderwaltzzyma* and *Zygorulaspora*. **FEMS Yeast Research**, v.4, p.233-245, 2003.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. Yeast systematics and phylogeny: implications of molecular identification methods for studies in ecology. New York: Springer, 695p, 2006.

KURTZMAN, C. P., FELL, J. W., & BOEKHOUT, T. Summary of species characteristics. In C. P. KURTZMAN, J. W. FELL, & T. BOEKHOUT (Eds.), *The yeasts: a taxonomic study* New York: Elsevier, p. 223-277. 2011.

LARTIGUE, M. F. et al. Identification of *Streptococcus agalactiae* isolates from various phylogenetic lineages by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, p. 2284-2287, 2009.

LASSA, H & MALINOWSKI, E. Resistance of Yeasts and Algae Isolated from Cow Mastitic Milk to Antimicrobial Agents. **Bull Vet Inst Pulawy** 51, 575-578, 2007.

LASSA, H., JAGIELSKI, T. AND MALINOWSKI, E. Effect of different heat treatments and disinfectants on the survival of *Prototheca zopfii*. **Mycopathologia** 171, 177–182, 2011.



- LASS-FLORL C. & MAYR A. Human protothecosis. **Clin. Microbiol. Rev.** 20(2):230-242, 2007
- LOPANDIC, K.; ZELGER, S.; BÁNSZKY, L. K.; ELISKASES-LECHNER, F.; PRILLINGER, H. Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. **Food Microbiology**, London, v. 23 p. 341-350, 2006.
- LOSINGER, W. C. Economic impact of reduced milk production associated with Johne's disease on dairy operations in the USA. **Journal of Dairy Research**, v. 72, n. 04, p. 425, 9 maio 2005.
- MALINOWSKY, E.; LASSA, H.; KLOSSOWSKA, A. Isolation of *Prototheca zopfii* from Inflamed Secretion of Udders. **Bull Vet Inst Pulawy**; 46: 295-299, 2002.
- MALORNY, B. et al. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, n. 1, p. 39–48, 2003.
- MARQUES, S. et al. Bovine mastitis associated with *Prototheca blaschkeae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, p.1941-1945, 2008.
- MARUTHAI, K. et al. Molecular typing and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates using Double Repetitive Element PCR and Duplex PCR. **International Journal of Mycobacteriology**, v. 4, n. 1, p. 60–66, 2015.
- MASUDA, M.; HIROSE, N.; ISHIKAWA, T.; IKAWA, Y.; KAZUKO, N. *Prototheca miyajii* sp. nov., isolated from a patient with systemic protothecosis International. **Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, p. 1510-1520, 2016.
- MCDONNELL, G.; RUSSEL, A. D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clinical and Microbiology Review**, v. 12, p. 147-179, 1999.
- MEISWINKEL, R., BALDET, T., DE DEKEN, R., TAKKEN, W., DELÉCOLLE, J.C., MELLOR, P.S. The 2006 outbreak of bluetongue in northern Europe — the entomological perspective. **Preventive Veterinary Medicine**. 87(1): 55-63, 2008.
- MELVILLE, P.A., BENITES, N.R., SINHORINI, I.L., COSTA, E.O. Susceptibility and features of the ultrastructure of *Prototheca zopfii* following exposure to copper sulphate, silver nitrate and chlorhexidine. **Mycopathologia**. 156:1–7, 2002.
- MENDESA J. F. et al. Antifungal susceptibility profile of different yeasts isolates from wild animals, cow's milk with subclinical mastitis and hospital environment. **Braz. J. Biol.**, vol. 78, no. 1, pp.68-75, 2018.
- MILANOV, D., SUVAJDZIC, L., PUSIC, I., VIDIC, B., DORDEVIC-MILIC, V.: Outbreak of endemic form of protothecal mastitis on a dairy farm. **Acta Vet (Beograd)** 56, 259–265, 2006.
- MOLLER, A.; TRUYEN, U.; ROESLER, U. *Prototheca zopfii* genotype 2. The causative agent of bovine protothecal mastitis. **Vet. Microbiol.**, v.39, p.1-7, 2006.

- MORANDI S. et al. Molecular typing and differences in biofilm formation and antibiotic susceptibilities among *Prototheca* strains isolated in Italy and Brazil. **J Dairy Sci**;99:6436–45, 2016.
- MORANDI, S. et al. *Prototheca blaschkeae* subsp. *brasiliensis* subsp. nov., isolated from cow milk. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 10, 3865-3871, 2017.
- NCCLS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada—Segunda Edição. **NCCLS document M27-A2** [ISBN 1-56238-469-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.
- NONNEMANN, B., LYHS, U., SVENNESEN, L., KRISTENSEN, K.A., KLAAS, I.C.; PEDERSEN, K. Bovine mastitis bacteria resolved by MALDI-TOF mass spectrometry. **J. Dairy Sci.** 102:1–10. 2019. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15424>.
- RANJAN, R. et al. Bovine protothecal mastitis: a review. **Perspect Agric Vet Sci Nutr Nat Res**, v.1, n.17, p.1-7, 2006.
- REYES-JARA, A., CORDERO, N., AGUIRRE, J., TRONCOSO, M., FIGUEROA, G. Antibacterial Effect of Copper on Microorganisms Isolated from Bovine Mastitis. **Front Microbiol.** 7: 1-10, 2016.
- REDÜ, J.F.M. Atividade biocida de desinfetante e fitoquímicos frente a fungos isolados de animais silvestres matidos em centro de recuperação. 94p. (**Dissertação de Mestrado**) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, 2014.
- RICCHI, M. et al. Molecular characterization of *Prototheca* strains isolated from Italian dairy herds. **Journal of Dairy Science**, 93:4625–4631, 2010.
- RIBEIRO, M. G. et al. Phenotypic and genotypic characterization of *Prototheca zopfii* in a dog with enteric signs. **Research in Veterinary Science**, v. 87, p. 479- 481, 2009.
- RODHA, A.D.; PANTOJA, J.C. Using mastitis records and somatic cell count data. **The Vet Clin North Am Food Anim Pract**, 28 (2): 347-361, 2012.
- RUTALA, W. A.; WEBER, D. J. Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities. **Centers for Disease Control (US)**, 2008.
- SABA. F, et al. Rapid and Reproducible Genomic DNA Extraction Protocol for Sequence-Based Identification of Archaea, Bacteria, Cyanobacteria, Diatoms, Fungi, and Green Algae. **J Med Bacteriol**, Vol. 5, No. 3, 4, pp.22-28, 2016.
- SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. São Paulo: Manole, 313p, 2007.
- SANTOS, R.C; MARIN, J.M. “Isolation of *Candida* spp. from mastitic bovine milk in Brazil,” **Mycopathologia**, vol. 159, no. 2, pp. 251–253, 2005

SHAHID, M., T. et al. Characterization of *Prototheca zopfii* genotypes isolated from cases of bovine mastitis and cow barns in China. **Mycopathologia** 181:185–195, 2016.

SHAHID, M. et. al. Characterization of *Prototheca zopfii* Genotypes Isolated from Cases of Bovine Mastitis and Cow Barns in China. **Mycopathologia**, DOI 10.1007/s11046-015-9951-9, 2015.

SANTOS, C. et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight intact cell mass spectrometry to detect emerging pathogenic *Candida* species. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 71, n.3, p. 304-308. 2011.

SANTOS, R.C.; MARIN, J.M. Isolation of *Candida* spp from mastitic bovine milk in Brazil. **Mycopathologia**, v.59, p.251-253, 2005

SALERNO, T. et al. *In vitro* algaeicide effect of sodium hypochlorite and iodine based antiseptics on *Prototheca zopfii* strains isolated from bovine milk. *Research Veterinary Science*, v. 88, p. 211-213, 2010.

SCORZETTI, G., FELL, J.W., FONSECA, A., STATZELL-TALLMAN, A. Systematics of basidiomycetous yeasts: A comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. **FEMS Yeast Res** 2:495–517, 2002.

SOBUKAWA, H., R. KANO, T. ITO, M. ONOZAKI, K. MAKIMURA, A. HASEGAWA, AND H. KAMATA. *In vitro* susceptibility of *Prototheca zopfii* genotypes 1 and 2. **Med. Mycol.** 49:222–224, 2011.

SZTACHAŃSKA, M., BARAŃSKI, W., JANOWSKI, T., POGORZELSKA, J., ZDUŃCZYK, S. Prevalence and etiological agents of subclinical mastitis at the end of lactation in nine dairy herds in North-East Poland. **Pol J Vet Sci.** 19 (1): 119-24, 2016.

THIELE D. & BERGMANN A. Mini-review: Protothecosis in human medicine. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 204:297-302, 2002.

THOMAS F C. et al. Mastitomics, the integrated omics of bovine milk in an experimental model of *Streptococcus uberis* astitis: 1. High abundance proteins, acute phase proteins and peptidomics. **Mol Biosyst.** 12 (9): 2735-47, 2016;

TOMAZI, T.; GONCALVES, J. L.; BARREIRO, J. R.; BRAGA, P. A. C.; SILVA, L. F. P. E.; EBERLIN, M. N.; SANTOS, M. V. Identification of coagulase-negative staphylococci from bovine intramammary infection by matrix-assisted laser desorption ionization -- time of flight mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, p. 1658-1663, 2014.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 967p

VASCONCELOS, S.A & ITO, F.H. Principais zoonoses transmitidas pelo leite. **Revta Educ. Contin. Med. Vet. Zootec.** 9(1):32-37, 2011.

VINOD KUMAR, N., SUDHEER BABU, G., LAHARI, L., RADHIKA, B., KARTHIK, A. Antibiogram of Pathogens of Mastitis from Chittoor District : Andhra Pradesh. **Indian Vet. J.**, August, 93(08):66-68, 2016.

VIOLA, E.S.; VIEIRA, S.L. Suplementação de acidificantes orgânicos e inorgânicos em dietas para frangos de corte: desempenho zootécnico e morfologia intestinal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.36, n.4, p.1097-1104, 2007.

WAWRON W, BOCHNIARZ m, PIECH T, WYSOCKI J, KOCIK M. Antimicrobial susceptibility of *Prototheca zopfii* isolated from bovine mastitis. **Bull Vet Inst Pulawy**. 57:485–8, 2013.

YAMAMURA, A.A.M. et al. Isolamento de *Prototheca* spp. de vacas com mastite, de leite de tanques de expansão e do ambiente de animais. **Semina: Ciências Agrárias**, v.28, p.105-114, 2007.

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

ZHANG, F. L. et al. An event-specific qualitative and realtime PCR detection of 98140 maize in mixed samples. **Food Control, Guildford**, v. 57, p. 1-8, 2015.

ZHAO, X.; LACASSE, P. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. **J. Anim. Sci.** 86: 57–65, 2008.