

PROTOTECOSE MAMÁRIA. UM PROBLEMA NOS REBANHOS LEITEIROS.

Helio Langoni¹
Marcella Zampoli Troncarelli²
Guido Gomes Wanderley²
Anelise Salina²

RESUMO

A mastite bovina é um grande entrave para a pecuária leiteira, pois ocasiona prejuízos sanitários, econômicos e também à saúde pública. Determina perdas na produção de leite, custos com mão-de-obra, honorários profissionais e medicamentos; além de morte ou descarte de animais; possibilidade de veiculação de patógenos causadores de toxi-infecções alimentares; e ainda redução do rendimento industrial para a fabricação de derivados lácteos. Quanto às causas infecciosas de mastites há que se considerar os micro-organismos contagiosos e ambientais, sendo que os primeiros normalmente são transmitidos para os animais durante o processo de ordenha; já os patógenos ambientais infectam os animais predominantemente após a ordenha, quando o esfíncter do teto permanece aberto. Inúmeros micro-organismos podem estar envolvidos na etiologia das mastites, como bactérias, fungos, leveduras e algas. Dentre as algas, destaca-se o gênero *Prototheca*, que determina mastite subclínica ou clínica, sob a forma de surtos, geralmente de curso crônico, que transcorre com elevação da contagem de células somáticas, alterações físico-químicas do leite, e acentuada diminuição da produção leiteira, podendo cessar abruptamente. A presente revisão tem por objetivo apresentar aspectos relacionados às mastites ocasionadas por algas aclorofiladas do gênero *Prototheca*, a importância como patógeno envolvido nas infecções intramamárias, os métodos de diagnóstico e controle.

Palavras-chave: vacas, mastite, alga, *Prototheca*, leite

MAMMARY PROTOTHECOSIS. A SERIOUS PROBLEM IN DAIRY CATTLE**ABSTRACT**

Bovine mastitis is a serious problem on dairy farms, causing sanitary and economic losses and public health damages. It determines milk production reduction, high costs with manpower, professional fees, drugs for treatment; and also animals' death or slaughter; possibility of food borne pathogens transmission; and also reduction of milk derivate production rates on industry. As infectious causes of mastitis there are contagious and environmental microorganisms, being the first ones often transmitted to cows during milking process; and the environmental pathogens normally infect animals after milking, when teat sphincters stay opened. Several microorganisms may be enrolled on bovine mastitis etiology, as bacteria, fungi, yeasts and algae. Considering alga, it is important to note the genus *Prototheca*, that determines subclinical or clinical mastitis, under outbreak cases, normally with chronicle course, that progress with high somatic cell counts, milk alterations and intensive milk production losses, with abrupt production stopping.

¹ Professor Titular e Bolsista PQ-1A-CNPq – Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, FMVZ – UNESP/Botucatu - SP

² Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Saúde Animal, Saúde Pública Veterinária e Segurança Alimentar, FMVZ – UNESP/Botucatu - SP

The aim of the present review study is to discuss *Prototheca* genus algae and its relationship with bovine mastitis; and also its pathogenicity for mammary gland; and aspects of diagnosis and control.

Keywords: cows, mastitis, algae, *Prototheca*, milk

PROTOTECCOSIS MAMARIA. UN PROBLEMA EN EL GANADO LECHERO.

RESUMEN

La mastitis bovina es un gran obstáculo para la ganadería lechera, pues ocasiona perjuicios sanitarios, económicos y también a la salud pública. La mastitis provoca pérdidas en la producción de leche, aumento de costos con mano de obra, honorarios profesionales y medicamentos así como muerte o descarte de animales. Posibilita también la transmisión de patógenos causadores de enfermedades tóxicas alimentarias y la reducción del rendimiento industrial para el preparo de productos derivados de la leche. Con relación a las causas infecciosas de mastitis se deben considerar los microorganismos contagiosos y ambientales, siendo que los primeros son normalmente transmitidos para los animales durante el proceso de ordeña; mientras que los patógenos ambientales se transmiten predominantemente después de la ordeña, cuando el esfínter de pezón está todavía abierto. Numerosos microorganismos pueden estar involucrados en la etiología de las mastitis, tales como bacterias, hongos, levaduras y algas. Entre las algas se destaca el género *Prototheca*, que provoca brotes de mastitis subclínica o clínica, generalmente de curso crónico, que se hace evidente por la elevación del conteo de células somáticas, alteraciones físico-químicas de la leche y disminución acentuada de la producción lechera, que puede cesar abruptamente. La presente revisión tiene por objetivo presentar algunos aspectos relacionados a la mastitis ocasionadas por algas aclorofílicas del género *Prototheca*, su importancia como patógeno involucrado en las infecciones intramamarias, su diagnóstico y control.

Palabras-clave: vacas, mastitis, alga, *Prototheca*, leche

INTRODUÇÃO

A mastite é a infecção mais frequente do gado destinado à produção de leite, e que mais onera a pecuária leiteira, tanto em nível de fazenda como para a indústria de laticínios. No primeiro caso, por ocasionar perdas devido à diminuição da produção de leite, custos com mão de obra, honorários profissionais, medicamentos, e morte ou descarte de animais. Referente à indústria de laticínios, há queda na qualidade do produto final e diminuição no rendimento industrial para a fabricação dos subprodutos ou derivados lácteos, devido às alterações na composição do leite.

Caracteriza-se por alterações físicas, químicas e bacteriológicas do leite, e patológicas do tecido glandular mamário. Como transformações físicas destacam-se alteração da coloração, presença de grumos, coágulos, sangue e aumento do número de leucócitos e células de descamação – células somáticas –, enquanto as químicas referem-se às variações quantitativas e/ou qualitativas dos constituintes individuais do leite, como lactose, teor de gordura, proteínas e minerais. As alterações bacteriológicas e patológicas estão relacionadas com os patógenos envolvidos no processo infeccioso.

As alterações patológicas ocorrem em dois níveis, sendo que na mastite clínica pode haver edema, endurecimento da glândula mamária, e alterações das características do leite. Na mastite subclínica não há alterações visíveis no leite, ou palpáveis na glândula mamária (1), sendo seu diagnóstico obtido por testes indiretos, que são baseados na contagem de células

somáticas (CCS) presentes no leite, que é um parâmetro de qualidade estabelecido para o monitoramento da qualidade do leite oferecido para consumo de acordo com a Instrução Normativa IN 62 (2).

Quanto à etiologia infecciosa das mastites há que se considerar os patógenos contagiosos e ambientais, considerando-se múltipla sua etiologia com a citação de 137 micro-organismos (3), destacando-se entre os contagiosos os *Staphylococcus* coagulase positivos (SCP) e os coagulase negativos (SCN), *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis*, e *Mycoplasma* spp., como também algas aclorofiladas do gênero *Prototheca*, com destaque para *Prototheca zopfii*. Os patógenos ambientais estão relacionados com as situações de grande umidade, presença de matéria orgânica nos ambientes de pré e pós-ordenha, e contaminação de soluções utilizadas como pré e pós-dipping. Neste caso, os principais patógenos envolvidos são os coliformes como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp. Ainda *Pseudomonas aeruginosa*, fungos e leveduras e não menos importantes diferentes espécies de *Prototheca* spp., que se caracteriza por quadros clínicos severos, de alta transmissibilidade nos rebanhos, e refratários aos tratamentos com antimicrobianos convencionais, devido à formação de granulomas mamários.

Outro aspecto relevante é que alguns destes patógenos, além de interferirem na qualidade do leite, representam perigo ainda maior para o consumidor por se tratarem de agentes de zoonoses pelo consumo do leite contaminado, não fervido ou pasteurizado, a exemplo de *Mycobacterium bovis* e *Brucella abortus* no Brasil (4), e em outros países por *Brucella melitensis*, ou ainda por ação de toxinas de outros micro-organismos, principalmente de *Staphylococcus aureus* e de outros SCN, ocasionando surtos de toxi-infecções alimentares. Especificamente relacionados à prototecose, a sua importância como agente de zoonose foi relatada no Brasil em 1995, a partir da ocorrência de toxi-infecção devido à ingestão de queijo contaminado por *Prototheca zopfii* (5).

A presente revisão tem por objetivo apresentar aspectos relacionados às mastites ocasionadas por algas do gênero *Prototheca*, a importância como patógeno envolvido nas infecções intramamárias, os métodos de diagnóstico e controle.

Caracterização do problema

A literatura assinala para a importância das algas do gênero *Prototheca* spp. na etiologia da mastite bovina, bem como em outros processos infecciosos em humanos e animais, denominados genericamente de prototecose. O gênero *Prototheca* spp. foi proposto por Krüger em 1894 (6) para designar grupo de micro-organismos intracelulares aclorofilados, isolados do látex das plantas. Sua reprodução é assexuada por fissão múltipla, formando endósporos em número variado, que ao atingirem a maturidade exercem pressão sobre a parede da célula-mãe, que se rompe liberando passivamente as denominadas células-filhas. Pela semelhança com leveduras, foram descritas inicialmente como fungos, entretanto, diferem das leveduras pela forma de reprodução, semelhante ao das algas do gênero *Chlorella* (7).

O primeiro autor a relacionar as prototecas com a etiologia das mastites foi Lerche em 1952 (8), na Alemanha, ao relatar surto de mastite, provavelmente por *Prototheca zopfii* e, experimentalmente reproduziu a doença a partir de infecção intramamária, via canal galactóforo. Posteriormente, obteve-se o isolamento de *Prototheca* spp. de 63 amostras de leite, provenientes de 28 vacas, em um total de 372 tetos avaliados (9).

Outros autores (10, 11) relataram a ocorrência de surtos ou casos esporádicos de mastite por *Prototheca* spp. São responsáveis por casos de mastite subclínica e clínica, com resposta inflamatória menos intensa como as ocasionadas por *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Corynebacterium* spp. (9), provocando, entretanto, queda brusca na produção do quarto afetado, com a presença de grumos nos primeiros jatos de leite, nos casos clínicos (12, 13).

Prototheca zopfii foi isolada de casos de mastites em vacas recém-paridas, 24-48 horas pós-parto, que entre dois e oito dias de evolução apresentavam o úbere com um ou mais quartos endurecidos, de difícil ordenha, cujo leite apresentava-se com coágulos brancos de pus (14). Da mesma forma, a sua ocorrência foi notificada a partir do isolamento do leite das vacas, havendo ainda a correlação com a presença de anticorpos séricos anti-*Prototheca zopfii* nos animais infectados (15). Examinando-se o leite de 79 vacas de um único rebanho, *Prototheca zopfii* foi isolada de amostras de leite de 31 animais (16). Estes mesmos pesquisadores isolaram *Prototheca* spp. em 28 (3,6%) dos 787 tanques de expansão de propriedades do leste dos Estados Unidos, sendo 22 casos de *Prototheca zopfii* e seis de *Prototheca moriformis* (16).

Há relato da identificação de *Prototheca zopfii* a partir do leite de vacas com mastite indurativa, que havia apresentado episódios de mastite crônica em lactações anteriores, submetida a tratamento com preparações de cefalosporina de longa duração. No Brasil há a comunicação pessoal do isolamento de *Prototheca zopfii* de um caso de mastite clínica bovina em Campo Grande-MS (17), entretanto, concomitantemente no Brasil, ocorreram as primeiras citações sobre a ocorrência de mastite bovina por *Prototheca* spp. sob a forma de surtos, em regiões diferentes do país, demonstrando a importância destes agentes na etiologia das mastites (19,20). Novos estudos surgiram no país, relatando casos de mastite clínica por *Prototheca* spp. (21-23), além de estudos epidemiológicos referentes a prototecose bovina (18,24).

No México, obteve-se o isolamento de *Prototheca* spp. em dez entre as 230 vacas de um rebanho. Como características marcantes, assinalaram-se a redução de tamanho e aumento da consistência da glândula mamária, sem sinais de inflamação acentuada, sendo, entretanto, marcante a diminuição da produção leiteira dos animais infectados (25).

Outros casos ou estudos referentes à prototecose bovina foram relatados no Brasil (26-37) e em outros países (38-41). Para alguns autores foram considerados como relatos de casos, ou como parte de estudos microbiológicos relacionados à etiologia das mastites, e em algumas situações considerado como patógeno emergente (17).

Aspectos etio-epidemiológicos

Micro-organismos do gênero *Prototheca* estão presentes na natureza, principalmente em ambientes ricos em matéria orgânica (42). São conhecidas cinco espécies: *P. zopfii*, *P. wickerhamii*; *P. ulmea*; *P. stagnora* e *P. blaschkeae* (43), sendo as duas primeiras patogênicas e associadas com doenças nos animais e em humanos (36, 44, 45). Há três tipos de *P. zopfii*, sendo que o tipo II predomina em relação aos demais, na etiologia das mastites (46). São algas unicelulares e se encontram distribuídas mundialmente. Já foram isoladas em água do mar, de lagos e rios; de seiva de árvores, de lama e de secreções e excreções de diferentes espécies animais (42). No seu metabolismo utiliza glicose como fonte de carbono; sais de amônia e proteínas como fonte de nitrogênio, e necessita de oxigênio e tiamina para o crescimento (47, 48).

Reproduzem-se de forma assexuada com septação interna, fenômeno conhecido por endoesporulação. A célula-mãe denomina-se esporângio, semelhante a uma mórula, e forma número variável de endósporos, denominados também de células-filhas, que permanecem no seu interior, envoltos por cápsula trilaminar de esporopolemina, liberando-os ao se romper, reiniciando-se o ciclo com a formação de novos endósporos (47, 49).

O isolamento de *Prototheca* spp. pode ser realizado em meios de ágar sangue ovino 5-8%, onde se desenvolvem colônias que são fenotipicamente pequenas, branco-acinzentadas em 48-72 horas (Figura 1).



Figura 1. Características macroscópicas de colônias de *Prothoteka* spp. isoladas em meio ágar sangue ovino 5%, após 72 horas de incubação a 37° C. Notam-se colônias pequenas, branco-acinzentadas, não hemolíticas. Núcleo de Pesquisa em Zoonoses – NUPEMAS, 2012.

Às 24 horas pode se suspeitar do seu isolamento pelo desenvolvimento de colônias diminutas translúcidas, a temperatura de 37° C em condições aeróbicas. O isolamento pode ser facilitado a partir da utilização de meios seletivos como ágar Sabouraud-dextrose (ASD) adicionado de antimicrobianos, como cloranfenicol, na concentração de 100mg/litro de meio e 0,1g/litro de meio de hidrocloreto de tiamina (42), com o desenvolvimento de colônias de coloração branco-dourada de 1-2mm de diâmetro, atingindo às 72-96 horas de incubação 3-6mm de diâmetro, com bordas irregulares e elevadas (Figura 2).

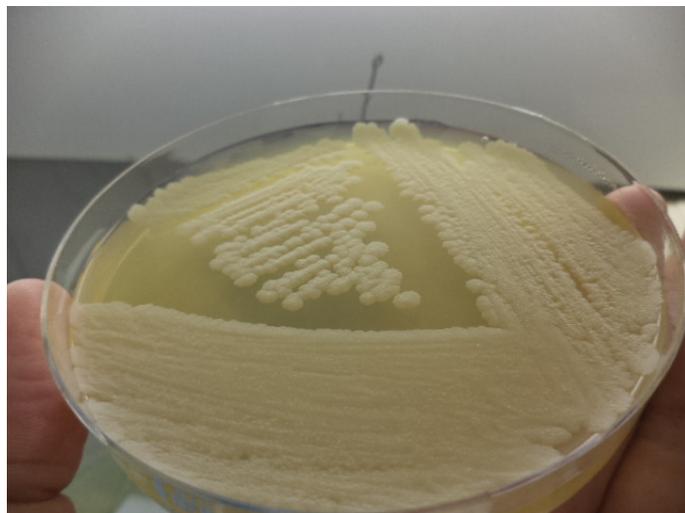


Figura 2. Características macroscópicas de colônias de *Prototheca* spp. isoladas em ágar Sabouraud-dextrose (ASD) acrescido de cloranfenicol, após 72 horas de incubação a 37°C. Notam-se as bordas irregulares e elevadas das colônias, que apresentam coloração branco-dourada. NUPEMAS, 2012.

É possível ainda a utilização de meios de enriquecimento como o meio de PIM – *Prototheca* isolation médium (42) e meio PEM – *Prototheca* isolation enrichment medium (16), com a adição de anti-fúngico 5-fluorocitosina 500mg/190 mL de meio, adicionando-se 1 mL de meio/5 mL de leite em tubos, incubando-se sob agitação a 32° C, por 96 horas, replaqueando-se em meio de ASD como descrito anteriormente, com incubação a 35-37° C por 48 horas.

Características morfológicas podem ser avaliadas pela coloração de Gram ou Panótico (50) e pelo exame a fresco de parte das colônias em 30 μ L de azul de metileno 3%, azul de algodão, tinta da China, ou cristal violeta, entre lâmina e lamínula, com observação dos esporangiósporos em número variável nos esporângios (Figura 3).

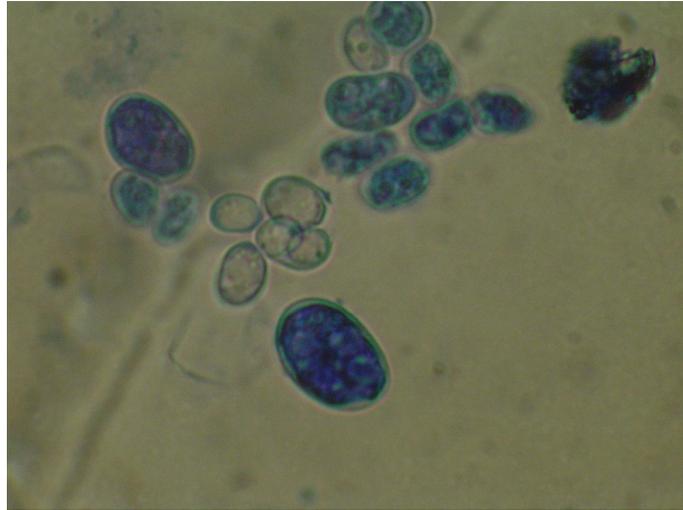


Figura 3. Exame a fresco de isolado de *Prototheca* spp. corado em azul de metileno 3%. Notam-se as células-filhas (esporangiósporos) no interior dos esporângios. Aumento de 1000x. NUPEMAS, 2012.

Os esporangiósporos de *P. wickerhamii* se distribuem centralmente, com aspecto de mórula, flor de margarida ou framboesa (Figura 4). Quando coradas por azul de metileno ou cristal violeta, aparecem sem delimitação de esporangiósporos, como estruturas ovaladas ou globosas. As células de *P. wickerhamii* são esféricas, com 2,5 a 13 μ m de diâmetro e as de *P. zopfii* são esféricas ou ovais com 4,5 a 25 μ m de diâmetro (47).

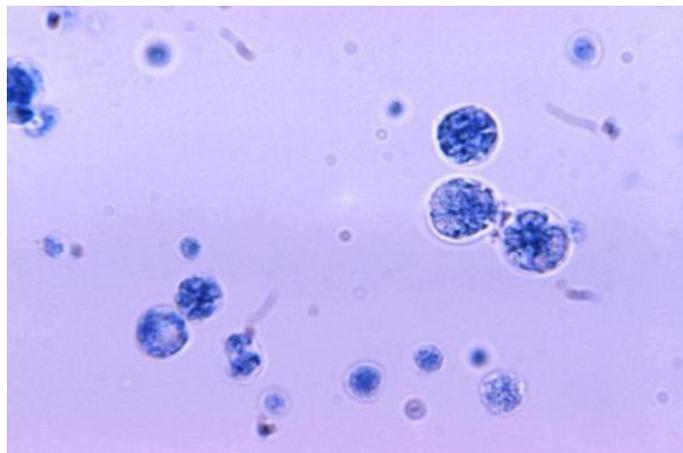


Figura 4. Características microscópicas de *Prototheca wickerhamii* coradas pelo azul de metileno 3%. Imagem de domínio público (Public Health Image Library). <http://eol.org/pages/6652484/overview>

A caracterização bioquímica pode ser realizada utilizando-se testes de assimilação de carboidratos e álcoois. Quanto à fermentação, *P. zopfii* é positiva para glicose, frutose, 2-propanol, acetato (pH 5,0) e glicerol, sendo negativa para lactose, trealose, xilose e manose. *P. wickerhamii* assimila glicose, xilose, dulcitol, rafinose, inositol, melibiose, adonitol, eritritol, propanol, salicina e amino (48).

São consideradas como patógenos ambientais, e ao serem ingeridas pelos animais se disseminam no ambiente a partir das fezes das vacas, bezerros e animais silvestres (51, 52). De maneira geral as principais fontes de disseminação em propriedades leiteiras são os bezerros, vacas em lactação, suínos, cães e gatos. Bezerros alimentados com leite de vacas com mastite por *Prototheca* spp. liberam o agente pelas fezes, pois os esporângios passam livremente pelo trato digestório (53, 54).

A maior incidência de mastites por *Prototheca* spp. ocorre nas primeiras semanas de lactação e principalmente no verão (49), podendo ocorrer em outros períodos, inclusive durante o período seco (28), sob forma de casos esporádicos ou surtos (21). Sob a forma epidêmica deve-se atentar para a correlação da presença do agente com o processo de higienização pré-ordenha, e manutenção dos animais em ambientes com umidade elevada, com acúmulo de lama e fezes (27). A não realização de pós-*dipping*, não utilização da prática de alimentar as vacas pós-ordenha, evitando-se com que se deem logo após o término da ordenha, momento em que o canal do teto e o esfíncter ainda estão dilatados e abertos, propiciando a penetração do agente presente no ambiente, bem como o alojamento em sistema de *free-stall*, estão relacionados com a ocorrência de mastite por *P. zopfii* (55).

A ocorrência de mastite por este patógeno está também associada em rebanhos nos quais o tratamento intramamário é realizado em condições precárias de higiene pré-tratamento, com falhas na ordenha, como o uso excessivo de água e ausência de um sistema de linha de ordenha, ordenhando-se primeiro animais saudáveis (34). Por outro lado, o agente pode estar ocasionando mastites da mesma forma, em rebanhos onde as condições de manejo não revelam grandes falhas na ordenha e manejo dos animais (39). Deve-se atentar no caso de reposição de animais, pois pode ocorrer a introdução do agente na propriedade a partir de casos crônicos de infecção subclínica ou de casos clínicos não curados em animais que são descartados e comprados por proprietários que não se preocupam previamente com a realização de exames microbiológicos para avaliação da sanidade da glândula mamária, aspecto relevante em um programa de controle de mastites e qualidade do leite produzido na propriedade.

Aspectos clínicos e de patologia

Quanto à apresentação, a mastite por *Prototheca* spp. pode ser subclínica ou clínica, predominantemente como casos crônicos, geralmente sem sinais sistêmicos (49), exceto pela citação de um caso de prototecose disseminada por *P. zopfii* devido à imunossupressão pelo uso prolongado de corticoide e antibióticos para tratamento de retenção placentária e mastite concomitante; havendo provavelmente escape de foco primário de infecção intramamária com disseminação hematogênica para o coração, pulmões, rins, língua e diafragma (56).

A mastite clínica aguda, principalmente sob a forma de surtos, transcorre com acentuada diminuição da produção de leite podendo cessar abruptamente. A secreção láctea se caracteriza pela formação de grumos, flocos ou aspecto seroso com pus ou aquoso (49, 57). A produção de leite reduz acentuadamente como de 20 kg diários para menos de 10 kg diários no intervalo de um mês (36). Nos animais infectados a mastite pode persistir no período seco ou ocorrer novas infecções sem que ocorra regeneração adequada da glândula mamária, o que compromete a próxima lactação (34).

Nos casos clínicos há aumento da consistência do tecido glandular e alterações do leite que se mostra com aspecto aquoso, com grumos de caseína e flocos de fibrina ou pus (21, 58). Nas apresentações subclínicas há diminuição da produção de leite com elevada contagem de células somáticas (CCS) (49), podendo, por outro lado, haver casos de vacas infectadas com CCS baixa, inferior a 200.000 CCS/mL de leite (36, 41, 59). São detectadas alterações na composição do leite com diminuição dos teores de gordura, lactose e sólidos totais,

provavelmente em função da degradação do glicerol e glicose pela lesão do tecido glandular mamário (36, 49).

Como resultado da infecção a partir da penetração do patógeno via ascendente pelo canal do teto e sua colonização, as alterações e lesões inflamatórias se encontram irregularmente distribuídas no parênquima mamário (34, 49). O tecido conjuntivo interalveolar mostra infiltração linfocitária, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos (36, 60, 61). Podem ser encontrados no lúmen alveolar neutrófilos e macrófagos com o agente fagocitado, bem como células gigantes (34). Há linfadenite serosa aguda com acentuado infiltrado eosinofílico (61). Nos casos crônicos há focos circunscritos de necrose, proliferação de fibroblastos e atrofia alveolar (34, 36, 49). Associado ao processo proliferativo há a formação de micro-granulomas no parênquima mamário (49).

Diagnóstico

Devem ser avaliados os aspectos do leite pela prova de caneca de fundo negro ou Tamis, bem como o exame físico da glândula mamária, observando-se os sinais da inflamação como calor rubor, edema, dor e textura do parênquima mamário. É imprescindível, entretanto, a cultura microbiológica para isolamento e caracterização do agente (62). Podem ser utilizados meios não seletivos como ágar sangue ovino 5-8% ou seletivos como ágar Sabouraud-dextrose adicionado de 100mg/L de meio de cloranfenicol, como impediendo do crescimento de outros patógenos. Podem ser utilizados ainda os meios de enriquecimento de *Prototheca* como descritos anteriormente.

Podem ser examinadas amostras de leite de cada quarto mamário afetado, bem como do tanque de expansão da propriedade com fins de monitorar a presença do agente na propriedade. Nestes casos é importante a utilização de meios seletivos, considerando-se a ampla variedade de micro-organismos presentes no leite. Características fenotípicas das colônias e caracterização das mesmas já foram descritas anteriormente.

Pode-se lançar mão do diagnóstico citológico, por citologia aspirativa do parênquima mamário com agulha fina, que é uma técnica de baixo custo, não agressiva para o tecido mamário (63), coradas por Giemsa, Gram, Schorr, hematoxilina-eosina, Gridley e Grocott (34), associado ainda ao exame por microscopia eletrônica de varredura (64), e também de histopatologia a partir do exame de cortes histológicos corados por ácido periódico de Schiff (PAS) (49).

Tratamento

Baseando-se nos resultados de testes de suscetibilidade *in vitro* frente a vários antimicrobianos, *P. zopfii* e *P. wickerhamii* mostram resistência à maioria deles (21, 29, 32, 39, 65, 66), de tal forma que as possibilidades de tratamento são limitadas.

A sensibilidade a antifúngicos é também moderada, com resultados na prática controversos (39, 67). Para tratamento humano de casos de prototecose, tem-se lançado mão da utilização de cetoconazol, itraconazol, fluconazol e anfotericina B com melhores resultados para a última (45). Ressalta-se que o êxito no tratamento das mastites está diretamente relacionado com a evolução do processo infeccioso, que se relaciona com o grau de destruição tecidual, e que na maioria dos casos de prototecose mamária trata-se de processo crônico, o que deve influenciar para o insucesso terapêutico.

Tratamentos alternativos foram ensaiados, como a utilização de própolis e extrato de sementes de frutas cítricas (21, 57). A própolis a 10% associada com Dimetilsulfóxido (DMSO) a 20% foi utilizada com base terapêutica para casos de mastite por *Prototheca zopfii*, obtendo-se cura clínica e microbiológica em 84,8% dos tetos tratados (20). A ação do thimerosal foi avaliada *in vitro* (68) e mostrou 100% de cura microbiológica, mas devido às

lesões no tecido secretor, não se recupera a produção de leite do quarto infectado (28, 49). Considerando-se estes aspectos, o baixo número de casos de cura espontânea, a persistência da infecção no período seco e a alta contagiosidade do agente e sua eliminação no ambiente podendo infectar outros animais, sugere-se o descarte do animal na dependência do número de quartos afetados (49, 61), ou a ablação química com produtos como nitrato de prata 0,75% (17), ou infusão intramamária de iodo a 10%, diluído em 100 mL de solução salina (0,85%) estéril (69), evitando-se assim a contaminação ambiental e possibilidade de transmissão para outros tetos do mesmo animal ou de outros animais durante o processo de ordenha.

A formulação de novos fármacos com partículas nanoestruturadas poderá ser uma alternativa para o tratamento no futuro, uma vez que o processo de nanoestruturação tende a determinar novas características físicas e químicas de antimicrobianos, que poderão apresentar melhor eficácia em casos de mastite bovina, assim como menor irritabilidade para a glândula mamária. Sendo assim, poderá ser alcançado o uso mais racional de antimicrobianos, uma vez que tanto o número de doses quanto a concentração poderão ser reduzidos durante o tratamento; além de possibilitar o “rejuvenescimento” de bases farmacêuticas já desgastadas pelo uso contínuo; e ainda menor geração de resíduos em produtos de origem animal (70).

Medidas preventivas e de controle

Tratando-se de patógeno ambiental, o controle é sempre mais difícil, portanto deve-se evitar a introdução do agente no rebanho, controlando-se por meio de exames microbiológicos amostras de leite de todos os tetos de vacas a serem introduzidas no rebanho. O ideal é que se proceda mais de um exame, pois a eliminação do patógeno pode ser intermitente. Recomendam-se três culturas de amostras de leite obtidas diariamente, mantidas sob refrigeração, e homogeneizá-las bem, obtendo-se alíquota de 0,1mL para plaqueamento e pesquisa do agente em meio de ágar Sabouraud-dextrose ou outros meios seletivos. Quando não for possível este procedimento, deve-se estabelecer contrato de compra e venda com cláusula específica (36).

No caso de rebanhos onde se detecta a presença de *Prototheca*, até o momento que se defina o destino dos animais infectados, deve-se ordenhá-los em separado, no final da ordenha, descartando-se o leite ordenhado. De maneira geral, como controle deve-se proceder de forma semelhante no caso das mastites ambientais (34), respeitando-se a ordem na linha de ordenha, ordenhando-se inicialmente vacas sem problemas de mastites e ao final aquelas em tratamento. Observar os aspectos de higiene ambiental e também no processo de ordenha, com limpeza adequada dos tetos e lavagem se necessário, secagem com papel toalha, realização de pré-*dipping* com solução desinfetante adequada e na concentração recomendada pelo fabricante, observando-se que mais de 1/3 do teto fique submerso na solução, garantindo a correta desinfecção. Para tanto, podem ser utilizadas soluções de clorexidina, cloro ou amônia quaternária. Para pós-*dipping*, recomenda-se o iodo glicerinado.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A mastite por *Prototheca* spp., apesar de ocorrer com menor frequência, ocasiona perdas econômicas significativas e pela dificuldade de tratamento, os animais na maioria das vezes devem ser descartados. O fato de ser resistente ao processo de pasteurização (71) e de ter sido isolada de queijo fresco responsável por infecção alimentar humana (72), torna este patógeno um agente relevante na etiologia das mastites e reforçam a importância de um programa de controle baseado inicialmente no cuidado quando da introdução de novos animais no rebanho, o estabelecimento de linhas de ordenha, respeitando-se os preceitos higiênicos e de manejo zoonosológico, incluindo-se a higiene ambiental, e o monitoramento da

ocorrência de mastites por meio de exames como CMT, CCS e exames microbiológicos rotineiros para conhecimento da microbiota presente na propriedade. Resumindo, o controle da prototecose mamária deve incluir a participação dos ordenhadores em atividades de educação sanitária e em saúde para que adotem medidas higiênicas adequadas para o controle, incluindo-se lavagem adequada das mãos e a utilização de luvas durante a ordenha.

REFERÊNCIAS

1. Natzke RP. Elements of mastitis control. *J Dairy Sci.* 1981;64:1431-42.
2. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.62, de 30 de dezembro de 2011. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A. *Diário Oficial da União, Brasília (DF), 2011 Dez 30. Sec I.*
3. Wats JL. Etiological agents of bovine mastitis. *Vet Microbiol.* 1988;16:41-66.
4. Guimarães FF, Langoni H. Leite: alimento imprescindível, mas com riscos para a saúde pública. *Vet Zootec.* 2009;16:38-51.
5. Bueno VFF, Mesquita AJ, Dias Filho FC. *Prototheca zopfii*: importante patógeno na etiologia da mastite bovina no Brasil. *Cienc Anim Bras.* 2006;7:273-83.
6. Krüger W. Kurz Charakteristik einiger niedern Organismen in Saftflüsse from Laubbäume. I. Über einen neuen Pild-typus repräsentiert durch die Gattung *Prototheca* (*P. Moriformis* and *P. Zopfii*). II. Über zwi aus Saftflusses rein gezuchtet Algen. *Hedwigia.* 1894;33:241-6.
7. Sudman M. Protothecosis: a critical review. *Am J Clin Pathol.* 1974;61:10-9.
8. Lerche M. Eine durch Algen (*Prototheca*) hervorgerufene Mastitis der Kuh. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 1952;65:64-9.
9. Frank N, Ferguson LC, Cross RF, Redman DR. *Prototheca*, a cause of bovine mastitis. *Am J Vet Res.* 1969;30:1785-94.
10. Goudwaard J. Protothecosis in a cow. *Tijdschr Diergeneeskd.* 1977;102:567-70.
11. Bodenhoff J, Madsen PSM. Bovine protothecosis. A brief report of ten cases. *Acta Pathol Microbiol Scand Sect B.* 1978;86:51-2.
12. McDonald JS, Richard JL, Cheville NF. Natural and experimental bovine intramammary infection with *Prototheca zopfii*. *Am J Vet Res.* 1984;45:592-5.
13. Smith KL, Todhunter PA, Schomberger PS. Environmental mastitis: cause, prevalence, prevention. *J Dairy Sci.* 1985;68:1531-53.
14. Spalton DE. Bovine mastitis caused by *Prototheca zopfii*: a case study. *Vet Res.* 1985; 116:347-9.

15. Blaschke-Hellmessen NR, Teichmann G, Schuster H, Bergmann V. Untersuchungen zum Nachweis von Antikörpern gegen *Prototheca zopfii* bei Rindern. *Monatsh Veterinärmed.* 1987;42:48-50.
16. Pore RS, Shanan TA, Pore MD, Blauwiekel R. Occurrence of *Prototheca zopfii*, a mastitis pathogen, in milk. *Vet Microbiol.* 1987;15:315-23.
17. Costa EO, Ribeiro AR, Watanabe ET, Garino Jr F, Silva JAB, Junqueira L. Controle de surto de mastite por *Prototheca zopfii* em uma propriedade leiteira. *Napagama.* 1999;2:12-6.
18. Yamamura AAM, Muller EE, Pretto-Giordano LG, Consenza M, Silva PFN, Godoy A. Isolamento de *Prototheca* spp. de vacas com mastite, de leite de tanques de expansão e do ambiente dos animais. *Semina Cienc Agrar.* 2007;28:105-14.
19. Langoni H, Domingues PF, Funari SRC, Dias HLT. Mastite bovina por *Prototheca* sp. In: *Anais do 4º Congresso de Iniciação Científica da Universidade Estadual Paulista; 1992, Araçatuba. Araçatuba: UNESP; 1992. p.92-3.*
20. Langoni H, Domingues PF, Funari SRC, Dias HLT, Mota, RA, Rocha NS, et al. *Prototheca zopfii* e mastite bovina: clínica e terapêutica. In: *Anais do 22º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária; 1992, Curitiba. Curitiba: CBMV; 1992. p.1250.*
21. Langoni H, Domingues PF, Funari SRC, Dias HLT. *Prototheca zopfii* como agente de mastite bovina: clínica terapêutica. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 1995;45:727-32.
22. Costa EO, Ribeiro AR, Watanabe ET, Pardo RB, Silva JB, Sanches RB. An increased incidence of mastitis caused by *Prototheca* species and *Nocardia* species on a farm in Sao Paulo, Brazil. *Vet Res Commun.* 1996;20:237-41.
23. Brito AF, Vianna LC, Neto BR, Filizzola WR, Ribeiro MG. Mastite bovina por *Prototheca zopfii* no oeste do Estado de São Paulo: relato de caso. In: *Anais do 3º Encontro de Pesquisadores em Mastites; 1999, Botucatu. Botucatu: FMVZ; 1999. p.162.*
24. Costa EO, Carciofi AC, Melville PA, Prada MS, Ribeiro AR, Watanabe E. Epidemiological studies on bovine protothecosis. In: *Proceedings of the 18º Congresso Mondiale di Buiatria; 1994, Bologna. Bologna: Istituto de Clinica Medica Veterinaria; 1994. p.853-5.*
25. Porras AA. Aislamiento de *Prototheca* en un brote de mastitis bovina. In: *Proceedings of the 14º Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias; 1994, Acapulco. Acapulco: Asociacion Panamericana de Ciencias Veterinarias; 1994. p.38.*
26. Langoni H, Domingues PF, Kung DC, Pardo RB, Da Silva AV, Cabral KG, et al. Participation of yeasts, algae and fungi on bovine mastitis. In: *Resumos do Congresso Panamericano de Ciencias Veterinarias; 1996, Campo Grande. Campo Grande: Associação Panamericana de Ciências Veterinárias; 1996.*
27. Costa EO, Carciofi AC, Melville PA, Prada MA, Ribeiro AR, Watanabe ET. Bovine mastitis due to algae of the genus *Prototheca* sp. *Mycopathologia.* 1996;133:85-8.

28. Costa EO, Carciofi AC, Melville PA, Prada MS, Schalch U. Prototheca sp. Outbreak of bovine mastitis. Zentralbl Veterinarmed B. 1996;43:321-4.
29. Vargas AC, Lazzari A, Santurio JM, Alves SH, Ferreira G, Kreutz LC. Isolation of Prototheca zopfii from a case of bovine mastitis in Brazil. Mycopathologia. 1998;142:135-7.
30. Motta RG, Ribeiro MG, Perroti IBM, Motta DG, Domingues PF, Lucas TO, et al. Surto de mastite bovina causada por Arcanobacterium pyogenes. Arq Bras Med Vet Zootec. 2011;63:736-40.
31. Pardo RB, Sturion DJ, Basile JR, Chaves Neto AF, Duarte DDS, Fernandes AA, et al. Levantamento dos agentes etiológicos da mastite bovina na região de Arapongas (PR). UNOPAR Cient Cienc Biol Saude. 1999;1:25-30.
32. Filippsen LF, Moreira FB, Sakashita AT, Bittencourt DR. Prevalência da mastite bovina causada por Prototheca zopfii em rebanhos leiteiros, na região norte do Paraná. Cienc Rural. 1999;29:87-9.
33. Yamamura AAM, Mettifogo E, Shimada MK. Utilização de ordenhas sucessivas como procedimento para eliminação de infecção por Prototheca spp de casos de mastite clínica bovina (relato de caso). Cienc Agrar. 2000;21:89-91.
34. Corbellini LG, Driemeier D, Cruz C, Dias MM, Ferreiro L. Bovine mastitis due to Prototheca zopfii: clinical, epidemiological and pathological aspects in a Brazilian dairy herd. Trop Anim Health Prod. 2001;33:463-70.
35. Vaz AK, Carneiro DMVF, Dick W, Luciano AM. Mastite bovina por Prototheca spp. em Santa Catarina: relato de caso. Rev Cienc Agroveter. 2005;4:72-5.
36. Bueno VFF, Mesquita AJ, Neves RBS, Souza MA, Ribeiro AR, Nicolau ES, et al. Epidemiological and clinical aspects of the first outbreak of bovine mastitis caused by Prototheca zopfii in Goiás State, Brazil. Mycopathologia. 2006;161:141-5.
37. Amorim RNL, Souza AOG, Lima PM, Bezerra FSB, Alves ND, Feijó FMC. Mastite clínica em bovino causada por Prototheca zopfii no Estado do Ceará. Acta Vet Bras. 2010;4:307-11.
38. Santos VM, Flor L. Isolamento de leveduras em leites de vaca suspeitos de mamites. Rev Port Zootec. 2000;1:79-85.
39. Bexiga R, Cavaco L, Vilela CL. Isolamento de Prototheca zopfii a partir de leite bovino. Rev Port Cienc Vet. 2003;98:33-7.
40. Bexiga R, Cavaco LM, Vilela CL. Mastites subclínicas bovinas na zona do Ribatejo-Oeste. Rev Port Cienc Vet. 2005;100:39-44.
41. Tenhagen BA, Hille A, Schmidt A, Heuwieser W. Shedding patterns and somatic cell counts in milk from quarters chronically infected with Prototheca spp. Dtsch Tierarztl Wochenschr. 2005;112:44-8.

42. Pore RS, Barnett EA, Barnes JR, Walker JD. Prototheca ecology. Mycopathologia. 1983;81:49-62.
43. Roesler U, Möller A, Hensel A, Baumann D, Truyen U. Diversity within the current algal species *Prototheca zopfii*: a proposal for two *Prototheca zopfii* genotypes and description of a novel species. *Prototheca blaschkeae* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2006;56:1419-25.
44. Siqueira AK, Ribeiro MG, Salerno T. Prototecose em animais de companhia e aspectos da doença no homem. Cienc Rural. 2008;38:1794-804.
45. Camboim EKA, Neves PB, Garino Junior F, Medeiros JM, Riet-Correa F. Prototecose: uma doença emergente. Pesqui Vet Bras. 2010;30:94-101.
46. Roesler U, Holger S, Hensel A. Emended phenotypic characterization of *Prototheca zopfii*: a proposal for three biotypes and standards for their identification. Int J Syst Evol Microbiol. 2003;53:1195-9.
47. Pore RS. *Prototheca* taxonomy. Mycopathologia. 1985;90:129-39.
48. Pore RS. *Prototheca*, a yeastlike alga. In: Kurtzman CP, Fell JW, editors. The yeasts - a taxonomic study. New York: Elsevier; 1998. p.883-7.
49. Janosi S, Ratz F, Szigeti G, Kulcsar M, Kerenyi J, Lauko T, et al. Review of the microbiological, pathological and clinical aspects of bovine mastitis caused by the alga *Prototheca zopfii*. Vet Q. 2001;23:58-61.
50. Ribeiro MG, Langoni H, Silveira AM, Ruffino SM. Mastite bovina por *Prototheca zopfii*. Relato de caso e revisão de literatura. Biologico. 1998;60:1-7.
51. Costa EO, Melville PA, Ribeiro AR, Watanabe ET, Parolari MC. Epidemiologic study of environmental sources in a *Prototheca zopfii* outbreak of bovine mastitis. Mycopathologia. 1997;137:33-6.
52. Costa EO, Garino Jr F, Ribeiro AR, Watanabe ET, Silva JB, Diniz LS. Participação de animais silvestres na cadeia epidemiológica da mastite bovina por *Prototheca zopfii*. Napgama. 2001;4:6-9.
53. Costa EO, Ribeiro AR, Watanabe ET, Garino Junior F, Silva JAB. Pesquisa de *Prototheca* sp. Em fezes de bezerros de propriedades que utilizavam o leite de animais com mastite no manejo alimentar dos mesmos em comparação com as que não utilizavam. Napgama. 2000;3:20-2.
54. Yamamura AAM, Müller EE, Freire RL, Freitas JC, Giordano LGP, Toledo RS, et al. Fatores de risco associados à mastite bovina causada por *Prototheca zopfii*. Cienc Rural. 2008;38:755-60.
55. Costa EO, Ribeiro AR, Watanabe E, Melville PA. Infectious bovine mastitis caused by environmental organisms. Zentralbl Veterinarmed B. 1998;45:65-71.

56. Taniyama H, Okamoto F, Kurosawa T, Furuoka H, Kaji Y, Matsukawa K. Disseminated protothecosis caused by *Prototheca zopfii* in a cow. *Vet Pathol.* 1994; 31:123-5.
57. Brito MAVP, Veiga VMO. Mastite bovina causada por *Prototheca zopfii*: relato de um caso. *Cienc Rural.* 1997;27:681-4.
58. Gomes MJP, Driemeier D, Ferreiro L. Ocorrência de casos de mastite por *Prototheca zopfii* em bovinos, no Rio Grande do Sul. *Napgama.* 1999;2:4-8.
59. Costa EO, Garino Junior F, Watanabe ET, Silva JAB, Ribeiro AR, Horiuti AM. Patógenos de mastite bovina isolados de glândulas mamárias negativas aos testes de Tamis e CMT. *Napgama.* 2001;4:12-5.
60. Benites NR, Melville PA, Guerra JL, Senhorini IL, Costa EO. Estudo de microscopia eletrônica de *Prototheca zopfii* e avaliação histopatológica de glândulas mamárias por ela infectadas. *Napgama.* 1999;2:22-6.
61. Janosi S, Szigeti G, Ratz F, Lauko T, Kerenyi J, Tenk M, et al. *Prototheca zopfii* mastitis in dairy herds under continental climatic conditions. *Vet Q.* 2001;23:80-3.
62. National Mastitis Council. Laboratory handbook on bovine mastitis. Revised edition. Madison: NMC Publications; 1999.
63. Domingues PF, Langoni H, Rocha NS, Padovani CR, Gonzales JAH, Burini CHP. Citologia aspirativa por agulha filha (CAAF) em glândula mamária de vacas com mastite subclínica. In: Anais do 3º Encontro de Pesquisadores em Mastites; 1999, Botucatu. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia; 1999. p.142.
64. Ribeiro MG, Costa EO, Rocha NS, Domingues PF, Ribeiro AR, Nardi Junior G. Citologia aspirativa com agulha fina e microscopia eletrônica de varredura no diagnóstico de mastite clínica bovina por *Prototheca zopfii*. *Napgama.* 1999;2:15-20.
65. McDonald JS, Richard JL, Anderson AJ. Antimicrobial susceptibility of *Prototheca zopfii* isolated from bovine intramammary infections. *Am J Vet Res.* 1984; 45:1079-80.
66. Buzzini P, Turchetti B, Facelli R, Baudino R, Cavarero F, Mattalia L, et al. First large-scale isolation of *Prototheca zopfii* from milk produced by dairy herds in Italy. *Mycopathologia.* 2004;158:427-30.
67. Tortorano MAP, Dho G, Piccinini R, Dapra V, Viviani MA. In vitro activity of conventional antifungal drugs and natural essences against the yeast-like alga *Prototheca*. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61:1312-4.
68. Domingues PF, Langoni H, Neves IR, Chande CG, Listoni FJP. Efeito antimicrobiano in vitro do timerosal. In: Anais do 4º Congresso de Iniciação Científica da UNESP; 1992, Araçatuba. Araçatuba: CBMV; 1992.
69. Mota RA, Sá MEP, Oliveira AAF, Silva LBG, Souza MI. Mastite bovina por *Prototheca zopfii* no Estado de Pernambuco, Brasil. In: Anais do 3º Encontro de Pesquisadores em Mastites; 1999, Botucatu. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia; 1999. p.162.

70. Brandão HM, Gern JC, Vicentini NM, Pereira MM, Andrade PVD. Nanotecnologia: a próxima revolução na agropecuária. Rev CFMV. 2011;17:61-7.
71. Melville PA, Watanabe ET, Benites NR, Ribeiro AR, Silva JA, Garino Junior F, et al. Evaluation of the susceptibility of *Prototheca zopfii* to milk pasteurization. Mycopathologia. 1999;146:79-82.
72. Costa EO, Melville PA, Ribeiro AR, Watanabe ET. Relato de um caso de consumo de queijo fresco com *Prototheca* spp. Nappama. 1998;1:9-10.

Recebido em: 24/01/2013

Aceito em: 13/03/2013