

## MASTITE CLÍNICA EM BOVINO CAUSADA POR *Prototheca zopfii* NO ESTADO DO CEARÁ

[Clinical mastitis in a dairy cow caused by *Prototheca zopfii* in Ceará state, Brazil]

Raimundo Neilson de Lima Amorim<sup>1\*</sup>, Antonio Odair Gonçalves de Souza<sup>2</sup>, Paulo Moisés Lima<sup>3</sup>,  
Francisco Silvestre Brilhante Bezerra<sup>4</sup>, Nilza Dutra Alves<sup>4</sup>, Francisco Marlon Carneiro Feijó<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Graduando em Medicina Veterinária na Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA).

<sup>2</sup>Técnico em Agropecuária pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE)

<sup>3</sup>Docente do IFCE

<sup>4</sup>Docente do Departamento de Ciências Animais da UFERSA

**RESUMO** - Relata-se um caso de mastite clínica causada por *Prototheca zopfii* (alga unicelular), no município de Iguatu, Ceará. O animal, da raça Holandesa, com peso de 500 Kg e 4 anos idade apresentava produção diária de 18 litros de leite, e era criado sob sistema intensivo de confinamento. Observou-se a presença dos sinais clínicos no quarto anterior direito, com queda acentuada da produção de leite e ainda grumos na caneca de fundo preto. Logo em seguida foram coletadas duas amostras de leite do animal e enviada ao Laboratório de Microbiologia Veterinária da UFERSA. Para a análise microbiológica as amostras foram semeadas em ágar Sabouraud e cultivadas em estufa microbiológica sob condição de aerofilia a uma temperatura de 37°C por um período de 48 horas, onde se observou o crescimento das colônias, que se apresentaram com diâmetro variável entre 3 e 6 mm e bordas irregularmente onduladas com elevação central. Realizou-se também o teste de susceptibilidade a antimicrobianos. O antibiograma demonstrou resistência a todos os antibióticos testados: getamicina (10mg), clorafenicol (30mg), ceftriaxona (30mg), cefoxitina (30mg), vancomicina (30mg), polimixina (300mg), novobicina (30mg), estreptomomicina (10mg) e cefalotina (30mg).

**Palavras-Chave:** Mastite bovina; *Prototheca*, alga, antibiograma.

**ABSTRACT** - We report a case of clinical mastitis caused by *Prototheca zopfii* (unicellular algae) in the municipality of Iguatu, Ceará. A Holstein cow weighted 500 kg and was 4 years old, with dairy milk production of 18 liters, and was created under intensive system. The main clinical signs observed in the front right quarter, with drop in milk production and presence of flocks in the wired cup test. Two samples of milk were collected from the animals and sent to Laboratório de Microbiologia Veterinária at UFERSA. The samples were streaked on Sabouraud agar and incubated under aerobic conditions for 48 hours at 37 ° C. After 72 hours the colonies had presented a diameter varying between 3 and 6 mm and irregular edges with central elevation. An antibiogram was also performed, and revealed resistance to all antibiotics tested: getamicin (10mg), chloramphenicol (30 mg), ceftriaxone (30 mg), cefoxitin (30 mg), vancomycin (30 mg), polymyxin (300mg), novobicin (30mg), streptomycin (10mg) and cephalothin (30mg).

**Keywords:** Bovine mastitis, *Prototheca*, algae, antibiogram.

### INTRODUÇÃO

A mastite ocasiona modificações patológicas no tecido glandular e uma série de alterações físicas e químicas do leite, as alterações mais frequentes observadas no leite são a descoloração, aparecimento de coágulos e o aumento no número de leucócitos (FREITAS et al., 2005). As perdas decorrentes deste processo infeccioso geralmente estão de acordo com o grau de intensidade do

processo inflamatório e do estágio de lactação em que ocorre a infecção (SILVA & ARAÚJO, 2008).

A enfermidade manifesta-se de duas formas, clínica e subclínica. A primeira possui sinais evidentes da sua manifestação e a segunda exige exames complementares para sua percepção. Também é subdividida de acordo com o tipo de agente causador em mastite contagiosa ou ambiental (TYLER & CULLOR, 2006). Independentemente do microrganismo envolvido, a infecção da glândula

\* Autor para correspondência. E-mail: neilsonamorim@hotmail.com.

mamária geralmente decorre da penetração do agente via ascendente pelo canal do teto, com posterior colonização do tecido glandular (PHILPOT & NICKERSON, 2002)

As mastites contagiosas são classificadas assim, devido à excreção do agente infeccioso e à transmissão para outro animal. Os principais agentes são o *Staphylococcus aureus*, o *Streptococcus agalactiae* e o *Corynebacterium bovis* (RADOSTITIS, 2002). Também deve ser lembrado o aumento de Estafilococos coagulase negativos, agentes contagiosos, anteriormente considerados agentes infecciosos de menor importância, mas cuja prevalência e virulência têm aumentado consideravelmente (PYORALA & TAPONEN, 2009).

As mastites ambientais são assim denominadas porque os agentes infectantes se encontram normalmente no ambiente, sendo os principais agentes destas mastites a *Escherichia coli*, o *Streptococcus dysgalactiae* e o *Streptococcus uberis*. Existem, porém, outros agentes menos frequentes como *Enterobacter spp*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Pasteurella*, fungos, algas e leveduras (BLOWEY & EDMONDSON, 1999).

Dentre estes microrganismos, destacam-se os relatos de algas do gênero *Prototheca*, também causadores de alterações inflamatórias no úbere (BENITES et al., 1999). Essas algas aclorofiladas, unicelulares apresentam distribuição cosmopolita. Ocorrem, especialmente, em zonas úmidas onde se concentra matéria orgânica e apresenta um elevado grau de resistência a diferentes condições ambientais, agentes químicos e físicos causando uma doença chamada Prototecose que é incomum a animais e humanos (PORE et al. 1983). O gênero é composto por cinco espécies, *Prototheca zopfii*, *P. moriformis*, *P. wickerhamii*, *P. ulmea* e *P. stagnora* (PORE, 1998). A mastite bovina causada por *Prototheca spp*. foi descrita pela primeira vez na Alemanha (LERCHE, 1952). No Brasil, a mastite bovina por *Prototheca spp* já foi descrita em vários estados, incluindo Minas Gerais (COSTA et al., 1995; 1996a; 1996b; 1998), São Paulo e Paraná (CAMARGO & FISCHMAN, 1981), Santa Catarina (VAZ et al., 2005) e Goiás (BUENO et al., 2006) sendo considerada emergente, devido a sua crescente expansão (COSTA et al, 1996a).

Entretanto, relatos de mastite clínica por *Prototheca spp*. não foram encontrados na região do Ceará. Assim, o presente relato tem por objetivo descrever um caso de mastite clínica em vaca causado por alga unicelular do gênero *Prototheca spp*. criada em

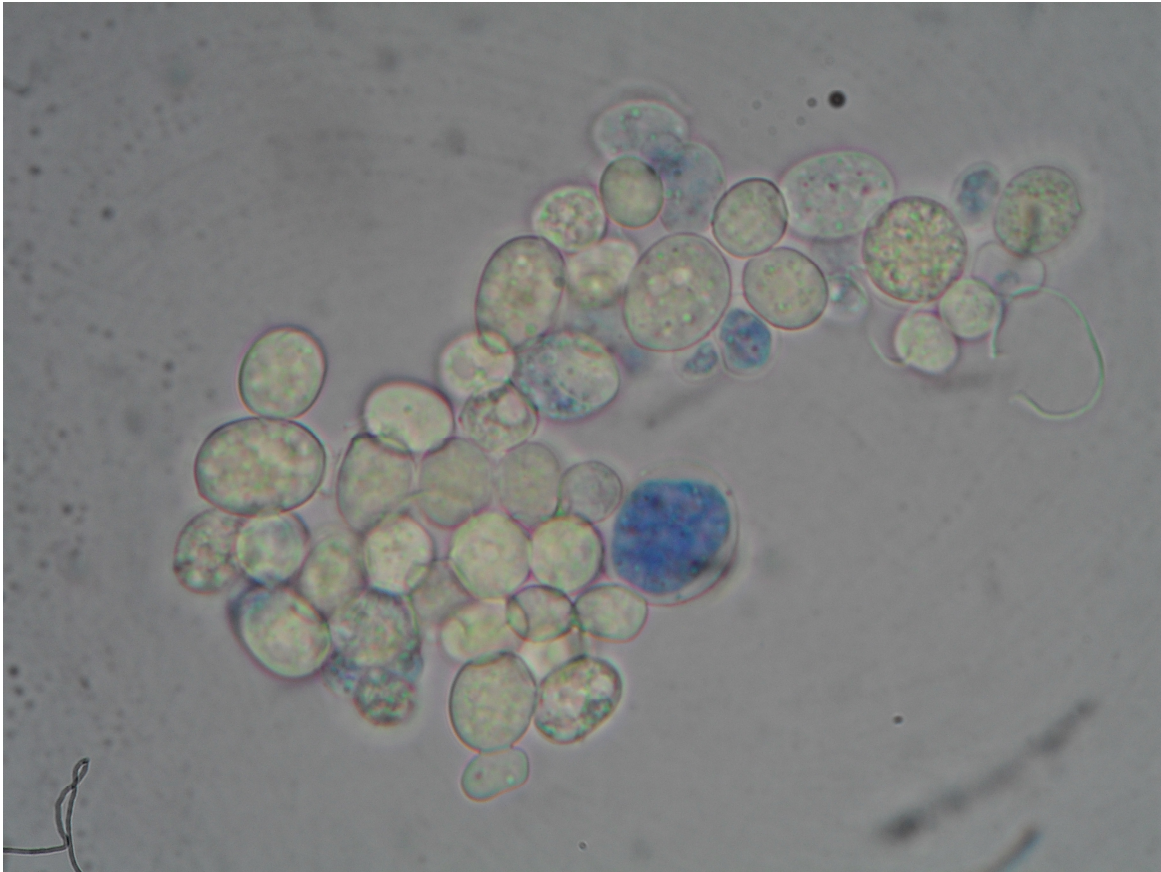
sistema intensivo de confinamento no município de Iguatu-CE, bem como determinar do seu perfil de susceptibilidade a antimicrobianos.

## RELATO DE CASO

Relata-se um caso de mastite clínica causado por *Prototheca spp* no quarto anterior direito em animal da raça holandesa criada em sistema intensivo de confinamento no Município de Iguatu, Ceará. Trata-se de um animal fêmea, com 4 anos de idade, pesando 500 kg e produção diária de leite de 18 litros. A alimentação fornecida era constituída de ração total a base de silagem de canarana, milho triturado, farelo de soja, casca de mandioca e torta de algodão administrada três vezes ao dia. Com o fornecimento de núcleo mineral protéico e água servida à vontade em cochos de plástico separados.

Ao exame clínico observou-se que úbere do animal apresentava-se edemaciado, com aumento de temperatura, endurecimento e dor na glândula mamária. Antes de se fazer a coleta das amostras foi feito o pré-dipping com a lavagem dos tetos com água limpa, imersão em solução anti-séptica, e secagem com papel-toalha descartável. Realizou-se o teste da caneca de fundo preto onde se observou a presença de grumos. Após esse procedimento, foram coletadas duas amostras de leite oriundas do teto anterior direito em tubos estéreis, que foram acondicionados em caixa de isopor a uma temperatura de 4°C e enviados ao laboratório de microbiologia veterinária da UFERSA. Em seguida, foi retirado 1 mL da amostra e colocado em eppendorf e centrifugado a uma rotação de 2.500 rpm, desprezando-se o sobrenadante e repicando-se uma poção do pellet em ágar sabouraud. A placa semeada foi mantida em estufa aeróbia a uma temperatura de 37°C por 48 horas, onde se observou o crescimento das colônias.

A identificação do microrganismo foi feita através das características macroscópicas da colônia, microscópica, morfotintoriais (método de coloração com azul de algodão) (Figura 1) e o perfil bioquímico. Após as 48 horas de incubação, as colônias apresentam diâmetro variável entre 3 e 6 mm e bordas irregularmente onduladas com elevação central (BRITO & VEIGA, 1997, BEXIGA et al. 2003, CARNEIRO et al. 2007). Para realização dos testes de susceptibilidade a antimicrobianos, utilizou-se o método de difusão em ágar (BARRY & THORNSBERRY, 1991). Os antimicrobianos testados incluíram: gentamicina (10mg), clorafenicol (30mg), ceftriaxona (30mg), cefoxitina (30mg), vancomicina (30mg), polimixina (300mg),



**Figura 1.** Fotomicrografia da morfologia *Prototheca zopfii* com coloração de azul de algodão (Aumento de 1000x).

novobicina (30mg), estreptomicina (10mg) e cefalotina (30mg).

### DISCUSSÃO

No Brasil, os primeiros casos de mastite por *Prototheca* spp. foram relatados em propriedades leiteiras dos Estados de Minas Gerais e São Paulo, sendo que os estudos subseqüentes mostraram que a mastite causada por *Prototheca* spp em rebanhos pode se manifestar sob forma de surtos e casos isolados (COSTA et al., 1995; 1996a; 1996b; 1998). A doença é considerada emergente, pois a sua ocorrência tem aumentado consideravelmente (COSTA et al., 1996a). Outros trabalhos também relataram a ocorrência de *P. zopfii* em rebanhos leiteiros de Santa Catarina e Goiás (VAZ et al., 2005; BUENO et al., 2006). Nos Estados de São Paulo e Paraná, os primeiros estudos epidemiológicos indicaram a presença de *P. zopfii* e *P. wickerhamii* em amostras de água de rios, lagos, esgoto e charcos (CAMARGO & FISCHMAN,

1981). Sendo as mesmas patogênicas para o homem e animais (RANJAN et al., 2006). A prototecose já foi relatada no homem e em diversas espécies animais, incluindo cães, gatos, bovinos, serpentes, peixes, castores, morcegos, e ratos (PORE et al., 1983; HOLLINGSWORTH, 2000). Em caprinos, um único relato ocorreu no Estado da Paraíba, em região semelhante ao município de Iguatu, em que o animal apresentava dermatite com nódulos proeminentes na junção muco-cutânea do focinho causado pela *Prototheca wickerhamii* (MACEDO et al. 2008).

As algas do gênero *Prototheca* estão amplamente distribuídas em ambientes com alta umidade (solo, lama, esgoto, fezes). A partir desses locais o microrganismo contamina alimentos, água e fômites (GREENE, 2006; LASS-FLÖRL & MAYR, 2007). O gênero *Prototheca* tem sido associado a infecções no homem e em animais na Europa, na Ásia, na África, na Austrália, nas Ilhas do Oceano Pacífico e nas Américas (LASS-FLÖRL & MAYR, 2007). Esses microrganismos já foram isolados a partir da

água do mar, de lagos e rios, da seiva de árvores, teteiras e pastagem (PORE et al., 1983; COSTA et al., 1997). Entretanto, o microrganismo é frequentemente isolado do leite de vacas, secreções de vacas secas, ordenhadeiras, cama dos animais e alimentos de propriedades rurais de exploração leiteira, nas quais a alga pode manter-se viável por semanas até meses no ambiente. O microrganismo pode ser isolado das fezes de suínos, porém, com menor frequência (RANJAN et al., 2006).

No presente relato, as prováveis fontes de contaminação foram o solo próximo aos bebedouros que apresentava alta umidade e a alta concentração de matéria orgânica presentes nos lotes dos animais. Tais condições apresentam-se ideais para manutenção e desenvolvimento desse microrganismo e foram observadas também em propriedades vizinhas, apesar de não ter sido realizada pesquisa do microrganismo nestas propriedades, sendo necessários estudos adicionais de prevalência nestas regiões.

Estes microrganismos apresentam um elevado grau de resistência, haja vista que já foram isolados entre pH 3 e 11, e o tratamento com cloro de água contaminada por *Prototheca* spp. tem efeito variável sobre as várias estirpes do agente (PORE et al., 1983). Também a pasteurização nem sempre é eficaz no seu controle (MELVILLE et al., 1999).

Recentemente foi proposta a classificação genotípica de *P. zopfii* em três biotipos: I, II e III. O biotipo I predomina nas fezes e no ambiente de criação de bovinos. O biotipo II é encontrado frequentemente em isolados de mastite bovina e o biotipo III em criatórios de suínos e onicomicose humana (ROESLER et al., 2003).

No presente relato, foi determinado ainda, pelo método de difusão em ágar, o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos no qual se verificou resistência a todos os antibióticos testados. De acordo com KIRK (1991), um aspecto importante relacionado às mastites causadas por *P. zopfii* é a inexistência de tratamento antimicrobiano eficaz, sendo recomendado internacionalmente o descarte dos animais acometidos. No entanto, BEXIGA et al. (2003) relataram sensibilidade deste microrganismo à aminosidina e à polimixina B. De fato, alguns antimicrobianos como a polimixina B, anfotericina B, aminosidina e nistatina apresentam efetividade *in vitro*, apesar de sua suscetibilidade *in vivo* ser muito baixo. Além disso, essas drogas não estão disponíveis para o uso veterinário, especialmente por via intramamária, e apresentam custo terapêutico

elevado (JÁNOSI et al., 2001a,.; BEXIGA et al., 2003).

Em aparente contradição, não detectamos falhas graves na rotina da ordenha na exploração da qual foi isolada *Prototheca zopfii*. É feito o pré-dipping com a lavagem dos tetos com água limpa, imersão em solução de Iodo, teste da caneca preta e a secagem é feita com papel descartável para cada teto individualmente de cada animal, foi observada também a realização do pós-dipping com solução a base de Iodo. Após a ordenha é feita a lavagem da sala de ordenha com água quente a uma temperatura de 75 à 80°C em seguida com uso de produtos alcalinos e ácidos todos os dias após cada ordenha. É realizada também a manutenção técnica da sala de ordenha feita periodicamente por técnicos especializados. Estes fatores adequados da ordenha não impediram a infecção por *Prototheca* spp., já que no caso presente, consideramos como possíveis fontes de contaminação, o solo próximo aos bebedouros que apresenta alta umidade, a alta concentração de matéria orgânica presentes nos lotes dos animais com isso nessas regiões apresenta condições ideais para manutenção e desenvolvimento desse microrganismo.

## CONCLUSÃO

A mastite clínica causada por *Prototheca zopfii* tem apresentado uma expansão territorial e uma casuística cada vez mais freqüente, o que provavelmente tem se dado devido às boas condições em que o nosso país apresenta para sua manutenção e desenvolvimento, causando grandes prejuízos devido à diminuição da produção do leite e ao descarte dos animais. Ainda, trabalhos voltados ao estudo dos fatores de risco associados à mastite se fazem necessários, visando-se à recomendação de medidas preventivas e de controle mais eficazes.

## REFERÊNCIAS

- Barry A.L. & Thornsberry C. 1991. Susceptibility tests: Diffusion Test Procedures. In: Balows A., Hauser W.J., Hermann K.L., Isenberg H.D. & Shamody H.J. Manual of clinical microbiology. 5 ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, p.1117-1125 .
- Benites N.R. 1999. Estudo de microscopia eletrônica de *Prototheca zopfii* e avaliação histopatológica de glândulas mamárias por ela infectadas. Revista NAPGAMA 2:22-26.
- Bexiga R., Cavaco L. & Vilela, C.L. 2003. Isolamento de *Prototheca zopfii* a partir de leite bovino. Rev. Port. Ciências Vet. 98:33-37.

- Blowey R. & Edmonson P. 1999. Control de la mastitis em granjas de vacuno de leche, Zaragoza: Ed. Acribia. 208p.
- Brito M.A.V.P. & Veiga V.M.O. 1997. Mastite bovina causada por *Prototheca zopfii*: relato de um caso. *Ciência Rural* 27:681-684.
- Bueno V.F.F., Mesquita A.J., Neves R.B.S., Souza M.A., Ribeiro A.R., Nicolau E.S. & Oliveira A.N. 2006. Epidemiological and clinical aspects of the first outbreak of bovine mastitis caused by *Prototheca zopfii* in Goiás State, Brazil. *Mycopathologia* 161:141-145.
- Camargo Z.P. & Fischman O. 1981 Isolation of *Prototheca* from water samples from Southern Brazil. *Rickia* 9:55-59.
- Carneiro F.P., Moraes M.A.P., Rebêlo A.M.G. & Coutinho A.M. 2007. Protetose cutânea: relato de caso. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 40:466-468.
- Costa E.O., Melville P.A., Ribeiro A.R. & Watanabe E.T. 1998. Relato de um caso de consumo de queijo fresco contaminado com *Prototheca* spp. *Revista NAPGAMA* 1:9-19.
- Costa E.O., Melville P.A., Ribeiro A.R., Watanabe E.T., Parolari M.C.F.F. 1997. Epidemiologic study of environmental sources in a *Prototheca zopfii* outbreak of bovine mastitis. *Mycopathol.* 137:33-36.
- Costa E.O., Ribeiro A.R., Watanabe E.T., Pardo R.B., Silva J. B., Sanches R.B. 1996a. An increased incidence of mastitis caused by *Prototheca* species and *Nocardia* species on a farm in São Paulo, Brazil. *Vet. Res. Commun.* 20:237-241.
- Costa E.O., Benites., N.R., Melville P.O., Pardo R.B., Ribeiro O.R. & Watanabe E.T. 1995. Estudo etiológico da mastite clínica bovina. *Rev. Bras. Med. Vet.* 17:156-158.
- Costa E.O., Melville P. A., Ribeiro A.R., Watanabe E. T. & Parolari M.C.F.F. 1996b. Bovine mastitis due to algae of the genus *Prototheca* sp. *Mycopathol.* 133:85-88.
- Costa E.O., Ribeiro A.R., Melville P.A., Prado M.S., Carciofi A.C. & Watanabe E.T. 1998. Infectious bovine mastitis caused by environmental organisms. *J. Vet. Med. A* 45:65-71.
- Fillipsen L.F., Moreira F.B., Sakashita A.T. & Bittencourt D.R. 1999. Prevalência da mastite bovina causada por *Prototheca zopfii* em rebanhos leiteiros, na região Norte do Estado do Paraná. *Ciência Rural* 29:87-89.
- Freitas M.F.L., Júnior-Pinheiro J.W., Stamford T.L.M., Rabelo S.S.A., Silva D.R., Silveira Filho V.M., Santos F.G.B., Sena M.J. & Mota R.A. 2005. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do Estado de Pernambuco. *Arq. Inst. Biol.* 72:171-177.
- Greene C.E. 2006. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 3.ed. Canada: Saunders/Elsevier. 1387p.
- Hollingsworth S.R. 2000. Canine protothecosis. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 30:1091-1101.
- Jánosi S., Ratz F., Szigeti G., Kulcsar M., Kerenyi J., Laukó T., Katona F. & Huszenicza G. 2001. Review of the microbiological, pathological and clinical aspects of bovine mastitis caused by the alga *Prototheca zopfii*. *Vet. Quart.* 23:58-61.
- Kirk J.H. 1991. Diagnosis and treatment of difficult mastitis cases. *Agri-Practice* 12:15-18.
- Lass-Florl C. & Mayr A. 2007. Human protothecosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 20:230-242.
- Lerche M. 1952. Eine durch Algen (*Prototheca*) hervorgerufene Mastites der Kuh. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 65:64-69.
- Macedo J.T.S.A, Riet-Correa F, Dantas A.F.M & Simões S.V.D. 2008 Cutaneous and Nasal Protothecosis in a Goat. *Vet. Pathol.* 45:352-354.
- Melville P.A., Watanabe E.T., Benites N.R., Ribeiro A.R., Silsa J.A.B., Garino Jr. F. E. & Costa E.O. 1999. Evaluation of the susceptibility of *Prototheca zopfii* to milk pasteurization. *Mycopathol.* 146:79-82.
- Philpot N.W. & Nickerson S.C. 2002. Vencendo a luta contra a mastite. Piracicaba: Westfalia Surge/ Westfalia Landtechnik do Brasil. 188p.
- Pore R.S. 1998. *Prototheca*, a yeastlike alga. In: Kurtzman C.P. & Fell J.W. (ed). *The Yeasts - A taxonomic study*. New York: Elsevier, p.883-887.
- Pore R.S., Barnett E.A., Barnes Jr. W.C. & Walker J.D. 1983. *Prototheca* ecology. *Mycopathol.* 81:49-62.
- Pyoralá S. & Taponen S. 2009. Coagulase-negative staphylococci – Emerging mastitis pathogens. *Vet. Microbiol.* 134:3-8
- Radostitis O.M., Gay C.C., Blood D.C. & Hinchcliff K.W. *Clínica Veterinária – Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos*. 9 ed. Guanabara: Rio de Janeiro, 2002. 1737p.
- Ranjan R., Swarup D. Patra R.C. & Nandi D. 2006. Bovine protothecal mastitis: a review. *Perspect. Agric. Vet. Sci. Nutr. Nat. Res.* 1:1-7.
- Roesler U., Scholz H. & Hensel A. 2003. Emended phenotypic characterization of *Prototheca zopfii*: a proposal for three biotypes and Standards for their identification. *Int J Syst Evol Microbiol.* 53:1195-1199.
- Silva M.V.M. & Araújo K.P.C. 2008 Mastite e qualidade do leite. *Revista Veterinária e Zootecnia em Minas* 15:20-23.
- Tyler J.W. & Cullor J. 2006. Sanidade e distúrbios da glândula mamária. In: Smith B.P. *Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais*. 3 ed. Manole, São Paulo, p.1019-1038.
- Vaz A.K., Carneiro D.M.V.F, Dick W. & Luciano A.M. 2005. Mastite bovina por *Prototheca* spp. em Santa Catarina: relato de caso. *Revista de Ciências Agroveterinárias* 4:72-75.