

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

Fungos e bactérias em leite de ovelhas

ANDRÉIA SPANAMBERG DORNELES

PORTO ALEGRE

2010

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

Fungos e bactérias em leite de ovelhas

Autora: ANDRÉIA SPANAMBERG
DORNELES

Dissertação apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre em Ciências
Veterinárias.

Subárea: Microbiologia.

Especialidade: Micologia

Orientador: PROF^o. DR. LAERTE FERREIRO

PORTO ALEGRE

2010

D713f Dorneles, Andréia Spanamberg

Fungos e bactérias em leite de ovelhas. / Andréia Spanamberg Dorneles.
– Porto Alegre: UFRGS, 2010.

50 f. ; il. – Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, RS-BR, 2010. Laerte Ferreiro, Orient.

1. Micologia veterinária 2. Leite de ovelha: microbiologia 3. Mastite ovina 4. Contaminação de alimentos I. Ferreiro, Laerte, Orient. II. Título.

CDD 616.01

Catálogo na fonte: Biblioteca da Faculdade de Veterinária da UFRGS

FUNGOS E BACTÉRIAS EM LEITE DE OVELHAS

Aprovada em 04 de Fevereiro de 2010

APROVADO POR:

Dr. Laerte Ferreiro
Orientador

Dr. Janio Morais Santurio (UFSM)
Membro da Banca de Avaliação

Dra. Selene Dall'Acqua Coutinho (UNIP – S.P.)
Membro da Banca de Avaliação

Dr. Flávio Mattos de Oliveira (IPD-Santa Casa, POA)
Membro da Banca de Avaliação

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares pelo apoio e paciência durante minha formação.

Ao meu professor orientador Laerte Ferreira pelo incentivo, parceria e amizade.

Ao professor Sydney Hartz Alves pela valiosa coorientação.

Aos veterinários José Renaldi Feitosa Brito e Maria Aparecida Vasconcelos Paiva Brito - Embrapa Gado de Leite,

Às professoras Marisa Cardoso e Verônica Schmidt e colega William Asanome pela identificação bacteriológica,

Aos colegas de laboratório de micologia da Faculdade de Veterinária – UFRGS.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo ensino público e de qualidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro.

RESUMO

O leite é considerado um bom substrato para o desenvolvimento de diversos microrganismos, dentre os quais, uma variada gama de leveduras com distintas características biológicas. Em geral, as leveduras são consideradas saprotróficas, fazendo parte da microbiota residente, entretanto, em alguns casos, elas podem provocar infecções na glândula mamária. A contaminação do leite por microrganismos patogênicos, pode representar um risco para o consumidor, quando o produto é ingerido na forma *in natura* ou até mesmo beneficiada. Deve-se considerar, também, os reflexos negativos na produção de subprodutos, pois alterações nas características físicas e organolépticas podem afetar a qualidade e a vida-de-prateleira dos derivados lácteos. O objetivo desse estudo foi avaliar a ocorrência de fungos e bactérias presentes no leite de ovelhas normais e daquelas com mastite clínica. Foram obtidas 588 amostras de leite de ovelha sendo 106 oriundas de animais com mastite clínica e 482 de animais normais. Alíquotas de 0,1 mL de leite foram semeadas pela técnica de espelhamento em superfície em ágar acidificado Yeast Medium. A identificação das leveduras foi realizada através de testes rotineiramente utilizados na metodologia padrão, além da utilização do meio Hicrome Candida Differential Agar Base (HIMEDIA[®]) e do sistema API 20 C (Biomérieux[®]). Foram realizados exames bacteriológicos, a fim de obter uma correta avaliação do possível agente etiológico envolvido. Do total das amostras analisadas, 53 (27,04%) foram positivas no exame micológico, 134 (68,36%) positivas no exame bacteriológico e 9 (4,59%) apresentaram crescimento de *Candida* spp. e *Staphylococcus* coagulase-negativa. No cultivo micológico foram obtidos 60 isolados pertencentes aos seguintes gêneros: *Candida* spp. (70,00%), *Rhodotorula* spp (11,70%), *Trichosporon* spp. (6,70%), *Geotrichum* spp. (5,00%), *Pichia* spp. (5,00%) e *Cryptococcus* sp. (1,70%). Dentre o total de bactérias, foram isoladas: 110 (82,00%) *Staphylococci* coagulase-negativa, 14 (10,44%) bactérias Gram-negativas, 6 (4,48%) *Staphylococcus aureus* e 4 (3,00%) *Streptococcus* spp. Algumas bactérias Gram-negativas foram identificadas como *Pasteurella* spp., *Rhodococcus* spp. e *Acinetobacter* spp. O resultado microbiológico ressalta a importância da realização concomitante de exames micológicos e bacteriológicos para o correto diagnóstico e monitoramento dos casos de mastite em ovinos. Em relação à saúde pública, o consumo de leite de ovelhas e derivados lácteos contaminados com microrganismos potencialmente patogênicos, constitui um risco para indivíduos imunossuprimidos. No que concerne à produção de derivados lácteos feitos com leite de ovelha, principalmente queijos, a contaminação microbiológica pode afetar a qualidade e a vida-de-prateleira do produto final, causando considerável prejuízo econômico.

Palavras-chave: leveduras, bactérias, leite de ovelha, mastite.

ABSTRACT

The milk is considered a good substrate for the development of various microorganisms, among them, a wide range of yeast strains with different biological characteristics. In general, yeasts are considered to be saprotrophic, part of the normal microflora, however, in some cases, they can cause infections in the mammary gland. Milk contamination by yeasts and yeast-like fungi may represent a risk to the consumer when the product is either consumed *in natura* or its derivatives. The negative impact on the production of milk derivatives should also be considered as the changes in physical and organoleptic characteristics can affect the quality and shelf-life of dairy products. The aim of this study was to evaluate the diversity of yeasts and bacteria in milk from healthy sheep and those with clinical mastitis. A total of 588 samples were obtained: 106 from animals with clinical mastitis and 482 from healthy animals. Aliquots of 0,1 mL from milk samples were spread in triplicate on acidified Yeast Medium agar. The identification of yeasts was carried out through tests routinely used in the standard methodology along with means Hicrome Candida Differential Agar Base (HIMEDIA[®]) and API 20 system (Biomérieux[®]). Bacteriological studies were performed in order to obtain a correct evaluation of the possible etiological agent. Out of the samples analyzed, 53 (27,04%) showed a positive result in the mycological examination, 134 (68,36%) were positive in the bacteriological examination and 9 (4,59%) presented *Candida* spp. and coagulase-negative *Staphylococcus* growing. The mycological analysis showed the presence of 60 isolates belonging to the following genera were cultivated: *Candida* spp. (70%), *Rhodotorula* spp. (11.7%), *Trichosporon* spp. (6.7%), *Geotrichum* spp. (5%), *Pichia* spp. (5%) and *Cryptococcus* spp. (1.7%). The bacteriological analysis showed the presence of 110 (82.00%) coagulase-negative Staphylococci, 14 (10.44%) Gram-negative bacteria, 6 (4.48%) *Staphylococcus aureus* and 4 (3.00%) *Streptococcus* spp. Some Gram-negative bacteria were identified as *Pasteurella* spp., *Rhodococcus* spp. and *Acinetobacter* spp. The microbiological results emphasize the importance of the concomitant use of bacteriological and mycological examination for the diagnosis and monitoring of cases of mastitis in sheep. In relation to public health, the consumption of sheep milk and dairy products contaminated with potentially pathogenic microorganisms, constitutes a risk to immunosuppressed individuals. Regarding the production of dairy products made from ewe's milk, especially cheese, microbiological contamination can affect the life quality and shelf-life of product, causing considerable economic loss.

Keywords: yeast, bacteria, ewes's milk, mastitis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Etapas do diagnóstico micológico.....	27
Figura 2.	Etapas do diagnóstico bacteriológico.....	28
Figura 3.	Características macromorfológicas de diferentes gêneros de leveduras.....	31

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Resultado microbiológico de 588 amostras de leite de ovelha coletadas no período de março/2007 a março/2009 na região metropolitana de Porto Alegre.....	30
--	----

LISTA DE QUADRO

Quadro 1. Leveduras associadas à mastite micótica.....	15
--	----

LISTA DE SIGLAS

CMT	California Mastitis Test
GL	Gay Lussac
L	Litro
mg	miligrama
mL	mililitro
µL	microlitro
pH	potencial hidrogeniônico
SIM	Sulfato Indol Motilidade
TSI	Triple Sugar Iron
YCB	Yeast Carbon Base

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	Ocorrência de Leveduras no Leite.....	13
2.2	Mastite Micótica.....	14
2.2.1	Mastite por <i>Candida</i> spp. e <i>Cryptococcus</i> spp.....	16
2.2.2	Patogenicidade.....	17
2.2.3	Sinais clínicos e lesões.....	18
2.3	Diagnóstico.....	19
2.3.1	Diagnóstico clínico.....	19
2.3.2	Diagnóstico laboratorial.....	19
2.3.2.1	Exame macroscópico.....	20
2.3.2.2	Exame microscópico.....	20
2.3.2.3	Testes fisiológicos.....	22
2.4	Tratamento e Profilaxia.....	23
3	MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1	Animais Amostrados.....	25
3.2	Critério para Identificação de Mastite.....	25
3.3	Amostras de Leite.....	25
3.4	Análise Micológica.....	26
3.5	Análise Bacteriológica.....	27
3.6	Análise Estatística.....	28
4	RESULTADOS	29

5	DISCUSSÃO	32
6	CONCLUSÕES	38
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
	ANEXO 1	48
	ANEXO 2	49

1 INTRODUÇÃO

Devido à sua composição nutricional, o leite é considerado um bom substrato para o desenvolvimento de diversos microrganismos, dentre os quais, uma variada gama de leveduras com distintas características biológicas (FLEET, 1990). Em geral, as leveduras são consideradas saprotróficas e muitas espécies têm sido isoladas de tanques de armazenamento de leite oriundo de animais considerados sadios (SPANAMBERG et al., 2004; RUZ-PEREZ et al., 2004).

A contaminação do leite por leveduras e fungos leveduriformes, muitas vezes representada por espécies potencialmente patogênicas, pode representar um risco para o consumidor, quando o produto é ingerido na forma *in natura* ou até mesmo beneficiada. Deve-se considerar, também, os reflexos negativos na produção de subprodutos, pois alterações nas características físicas e organolépticas podem afetar a qualidade e a vida-de-prateleira dos derivados lácteos (CHEN et al., 2003; FLEET, 1990).

No Brasil, pesquisas realizadas nos últimos anos detectaram a presença de diversas leveduras no leite de vacas com ou sem mastite (SPANAMBERG et al., 2008a; COSTA et al., 2008; SANTOS & MARIN, 2005; COSTA et al., 1993), porém poucos trabalhos, mesmo na literatura mundial, tratam sobre a diversidade da microbiota fúngica no leite de pequenos ruminantes.

Mastite é uma das maiores causas de perdas econômicas na criação de animais produtores de leite e, conseqüentemente, na produção de derivados lácteos. A maioria dos casos, em todas as espécies leiteiras, está associada à etiologia bacteriana, entretanto, uma menor parcela é atribuída à organismos frequentemente encontrados no meio ambiente, dentre os quais podem ser citados fungos filamentosos e leveduras, sendo essas as mais frequentemente relacionadas com infecções da glândula mamária (CHENGAPPA, 1984).

Com base nesta problemática, **o objetivo do presente estudo foi:**

- Avaliar a ocorrência de fungos e bactérias presentes no leite de ovelhas normais e daquelas com mastite clínica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ocorrência de Leveduras no Leite

O perfil bioquímico e fisiológico das leveduras é muito variável e permite seu crescimento em uma ampla gama de habitats. Quanto ao leite *in natura*, sua composição favorece o desenvolvimento de várias espécies de leveduras e fungos leveduriformes, os quais são capazes de metabolizar os constituintes lácteos (ROOSTITA & FLEET, 1996; JACQUES & CASAREGOLA, 2008). Algumas características como a habilidade de produzir enzimas, principalmente protease e lipase, utilizar ácido láctico ou cítrico, crescer em baixas temperaturas e tolerar altas concentrações de sais favorecem o crescimento destes microrganismos (TANIWAKI & SILVA, 2001).

As fontes de contaminação microbiana do leite cru estão localizadas ao longo da cadeia produtiva, desde a produção na fazenda até o beneficiamento do produto primário na indústria, podendo ser provenientes do ar, do contato com os trabalhadores, dos equipamentos de ordenha, dos alimentos, da terra, das fezes e de gramíneas. Dessa forma, a etiologia da contaminação e o grau de extensão encontrados no leite, imediatamente após a ordenha, são afetados por fatores relacionados aos animais, limpeza dos equipamentos, água utilizada, estação e saúde animal, sugerindo que o padrão higiênico-sanitário utilizado na produção é ponto-chave no controle da contaminação do leite e derivados (COOREVITS et al., 2008; BRAMLEY, 1990) .

A contaminação de produtos lácteos, especialmente em queijos, é causada por leveduras e fungos filamentosos (“bolors”) presentes no ambiente das fábricas, como no ar, nas paredes e prateleiras de maturação, na superfície de equipamentos e instalações, na água utilizada para limpeza dos aparelhos, no leite *in natura*, na salmoura, entre outras fontes (CHAPMAN & SHARPE, 1990). A presença de leveduras no leite cru é indesejada, especialmente quando este não é submetido à pasteurização e é utilizado na fabricação de produtos artesanais.

Leveduras frequentemente presentes no leite cru não sobrevivem à pasteurização e sua presença no leite pasteurizado, assim como nos produtos

lácteos, é causada frequentemente por recontaminação durante o beneficiamento deles (JODRAL et al., 1993), ou por ineficácia do processo térmico, pois a microbiota do leite pasteurizado depende da carga microbiana e também da temperatura de armazenamento iniciais (ANDRADE et al., 2008).

É importante salientar a ação das leveduras como organismos de deterioração de alimentos e bebidas. Este efeito negativo está ligado às suas exigências nutricionais, à resistência ao estresse físico-químico (importância na conservação de alimentos) e a capacidade de multiplicação em baixas temperaturas, em baixos valores de pH, em baixa atividade de água e em altas concentrações de sal (FLEET & MIAN, 1987; FLEET, 1990; SEILER, 1991). A deterioração causada por leveduras é reconhecida como uma alteração principalmente em leites fermentados e queijos. Tipicamente os problemas causados por leveduras deteriorantes são a produção de gás, alteração no sabor e flavor, descolorações e mudanças de textura do produto final (BROCKLEHURST & LUND, 1985; FLEET, 1990). Em alguns derivados lácteos, a adição de ingredientes não lácteos, como frutas, açúcar, xarope e outros produtos manufaturados também são considerados fontes de contaminação, além de constituírem substrato nutritivo para o crescimento de leveduras (FLEET, 1990).

2.2 Mastite Micótica

As principais espécies fúngicas associadas à mastite pertencem aos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*, seguidos de outros gêneros como *Geotrichum*, *Pichia* e *Trichosporon*. A maior parte dos relatos de mastite micótica causadas por leveduras refere-se à espécie bovina, embora já tenham sido descritos poucos casos nas espécies ovina e caprina (Quadro 1).

Quadro 1. Leveduras associadas à mastite micótica.

Espécie	Leveduras associadas à mastite	Autor / País / Ano
Bovina	<i>Candida</i> spp., <i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. catenulata</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. rugosa</i> , <i>C. krusei</i> , <i>Trichosporon loubieri</i>	Costa et al. / Brasil / 2008
Bovina	<i>Pichia guilliermondii</i> , <i>Galactomyces geotrichum</i> , <i>Rhodotorula minuta</i> , <i>R. glutinis</i> , <i>Candida rugosa</i> , <i>C. catenulata</i> , <i>C.</i> <i>zeylanoides</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>Cryptococcus laurentii</i>	Spanamberg et al. / Brasil / 2008 ^a
Ovina	<i>Candida</i> sp.	Krzyscin / Polônia / 2007
Caprina	<i>Candida albicans</i>	Langoni et al. / Brasil / 2006
Bovina	<i>Rhodotorula</i> spp., <i>Cryptococcus</i> spp., <i>Trichosporon cutaneum</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. albicans</i>	Krukowski et al. / Polônia / 2006
Bovina	<i>Trichosporon beigelli</i>	Victoria & Langoni / Brasil / 2006
Bovina	<i>Candida kefir</i> , <i>C. humicola</i> , <i>C. rugosa</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>C. famata</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. zeylanoides</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. albicans</i>	Santos & Marin / Brasil / 2005
Ovina	<i>Candida</i> sp., <i>Cryptococcus</i> sp.	Al-Jammas / Iraque / 2003
Ovina	<i>Candida glabrata</i>	Gonzales et al. / Argentina / 2003
Bovina	<i>Candida kefir</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. humicola</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. ciferri</i> , <i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>Trichosporon cutaneum</i> , <i>T. capitatum</i>	Krukowski et al. / Polônia / 2000
Bovina	<i>Candida kefir</i> , <i>C. catenulata</i> , <i>C. lambica</i>	Lagneau et al. / Bélgica / 1996
Bovina	<i>Candida krusei</i>	Elad et al. / Israel / 1995
Bovina	<i>Candida tropicalis</i> , <i>C. rugosa</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. valida</i> , <i>C. kefir</i>	Aalbaek et al. / Dinamarca / 1994
Caprina	<i>Candida tropicalis</i>	Bakheit et al. / Sudão / 1994
Bovina	<i>Candida tropicalis</i> , <i>C. rugosa</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>Trichosporon beigelli</i>	Kuo & Chang / Japão / 1993
Bovina	<i>Candida tropicalis</i> , <i>C. rugosa</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C.</i> <i>guilliermondii</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. intermedia</i> , <i>C. zeylanoides</i> , <i>Cryptococcus</i> <i>albidus</i> , <i>Cryptococcus</i> spp.	Costa et al. / Brasil / 1993
Ovina	<i>Cryptococcus</i> sp.	Shnawa & Nigam / Índia / 1987
Bovina	<i>Candida tropicalis</i> , <i>C. rugosa</i> , <i>Cryptococcus lactivorius</i>	Richard et al. / EUA / 1980

Os agentes envolvidos na mastite micótica se proliferam no ambiente de criação dos animais leiteiros, tais como na pele do teto, nas mãos dos ordenhadores e em outros substratos orgânicos (RICHARD et al., 1980; BARNETT et al., 2000). Esse tipo de mastite ocorre sob a forma de surtos, geralmente de curta duração, frequentemente com manifestação aguda e com maior concentração nos momentos do pré e pós-parto imediato (CARBON, 1968). Vários aspectos influenciam o aparecimento de mastite micótica, entre eles, o sistema de criação empregado (intensivo ou extensivo), o mau funcionamento do sistema de ordenha (manual ou mecânica), assim como seu manejo inadequado, a falta de higiene e de limpeza das instalações e dos equipamentos, além do uso prolongado de terapia antibacteriana por via intramamária (RUZ-PEREZ et al., 2004; YAMAMURA et al., 2007; BAUMGARTNER et al., 2008).

As mastites micóticas são classificadas em primárias e secundárias. A primária ocorre espontaneamente, não sendo precedida por infecção bacteriana e/ou tratamento com antibacterianos, durante as primeiras semanas de lactação. A secundária, que é mais frequente, se desenvolve após casos de mastite bacteriana e/ou de tratamento antibacteriano via intramamária. Ela pode ocorrer de forma aguda ou crônica, especialmente após tratamentos repetitivos (CARBON, 1968). A maioria dos casos ocorre por via ascendente, com a penetração dos microrganismos via canal do teto, durante ou entre as ordenhas, assim como durante a administração intramamária de antibióticos (CRAWSHAW et al., 2005).

2.2.1 Mastite por *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp.

Candida spp. vivem frequentemente em saprobiose, mas em circunstâncias propícias podem desenvolver seu poder patogênico. Usualmente, a presença de *Candida* spp. no leite ocorre sem doença associada, embora possa causar mastite nas formas subclínica, clínica ou crônica (WAWRON & SZCZUBIAL, 2001). Dependendo da gravidade da infecção, a queda da produção pode ser rápida,

apresentando alterações macroscópicas visíveis no leite como a formação de flocos e de grumos (CARBON, 1968). *Candida albicans*, integrante normal da microbiota gastrintestinal dos mamíferos (ODDS, 1988), é a espécie mais frequentemente isolada e descrita em casos de mastite micótica. Por meio de inoculações experimentais, via intramamária, em ovelhas e cabras, já foi demonstrada a capacidade patogênica desta espécie. Mesmo sem prévia terapia antibacteriana e ausência de fatores imunossupressores, ocorreu o desenvolvimento de um quadro inicialmente agudo e purulento, que gradualmente se tornou crônico, não purulento e com formação de granulomas. A queda na produção leiteira é rápida, podendo até ocorrer agalaxia com lesões teciduais que podem ser extensas e irreversíveis. As lesões são restritas aos quartos mamários inoculados, sem disseminação aos outros quartos e aos outros órgãos do corpo (CARBON, 1968). Inoculações experimentais de *Candida tropicalis* em vacas demonstraram, igualmente, elevado grau de patogenicidade para a glândula mamária (KUO & CHANG, 1993).

A criptococose mamária pode ser esporádica ou enzoótica em certas situações. Na maioria das vezes, ela está associada à mastite clínica e, em menor porcentagem, aos casos subclínicos (LANGONI et al., 1998; KLOSSOWSKA & MALINOWSKI, 2001), podendo ter evolução aguda ou crônica (PAL, 1991). Dependendo do quadro clínico, o animal pode apresentar agalaxia em poucas semanas. Na forma aguda, o comprometimento do parênquima mamário pode ser observado pela presença de fibrose, nódulos necróticos e, algumas vezes, hemorrágicos. Esse tipo de infecção frequentemente se restringe aos quartos infectados, não ocorrendo comprometimento sistêmico (VERMA et al., 1985; MANJEET et al., 1994).

2.2.2 Patogenicidade

O primeiro obstáculo enfrentado por um patógeno para adentrar o úbere é composto pela barreira formada pelo esfíncter do teto e pelo tampão formado pelo epitélio queratinizado. Uma vez que o microrganismo tenha atravessado o

canal do teto e alcançado a cisterna mamária, passam a atuar diversos fatores. Dentre os fatores solúveis, estão presentes a lactoperoxidase, o sistema complemento, as citocinas, a lactoferrina, a lisozima e a enzima lisossomal NAGase (N-acetil- β -D-glucosaminidase). Já, as defesas celulares inespecíficas na glândula mamária são representadas pelos neutrófilos, pelos macrófagos e pelas células “natural killer” (CARNEIRO et al., 2009).

Caso ocorra uma falha nos mecanismos de defesa do sistema imunológico, os microrganismos inicialmente se instalam nos ductos e nas cisternas e, posteriormente, progridem para pequenos ductos e alvéolos do úbere, onde se multiplicam, provocando edema e destruição das células secretoras (RAINARD & RIOLLET, 2006).

Especificamente em relação às mastites causadas por *Candida* spp. a derência da levedura à superfície celular, a formação de tubo germinativo com conseqüente desenvolvimento da forma pseudofilamentosa (no caso particular de *C. albicans*), a produção de toxinas e enzimas extracelulares constituem os fatores mais importantes relacionados ao quadro clínico (TAMURA et al., 2007). Por exemplo, a produção de fosfolipase por *C. albicans* é considerado um fator importante para iniciar o processo de infecção e instalação da doença, pois esta enzima que está localizada na superfície da levedura e extremidade do tubo germinativo, hidrolisa fosfolipídeos da membrana celular, dando origem aos lisofosfolipídeos que causam dano à célula epitelial (PRICE et al., 1982).

2.2.3 Sinais clínicos e lesões

O desenvolvimento das mastites micóticas difere segundo o agente etiológico, mas frequentemente pode ser dividido nas formas aguda e crônica. Na primeira são observadas modificações no aspecto natural do leite, além do comprometimento da glândula mamária e sistêmico com presença de febre elevada. São observados sinais evidentes de inflamação como edema, aumento de temperatura, endurecimento e dor na glândula mamária, aparecimento de grumos, pus ou qualquer outra alteração das características do leite. Na segunda

forma ocorrem apenas modificações macroscópicas no leite, sem aparente comprometimento da glândula mamária (BRADLEY, 2002).

2.3 Diagnóstico

2.3.1 Diagnóstico clínico

Os sinais clínicos observados nas mastites micóticas, na maior parte dos casos, não podem ser distinguidos daqueles causados por mastites bacterianas. Entretanto, o uso de antimicrobiano intramamário sem sucesso no tratamento ou a intensificação dos sintomas, com a continuidade da terapia, podem sugerir o desenvolvimento de uma etiopatogenia fúngica. Para o esclarecimento do agente etiológico envolvido, amostras de leite podem ser coletadas para imediato processamento no laboratório ou então serem congeladas por períodos inferiores a 10 dias porque, após este limite, a viabilidade das leveduras começa decrescer (SPANAMBERG et al., 2008b).

2.3.2 Diagnóstico laboratorial

Atualmente, existem diversos procedimentos utilizados para facilitar a rotina laboratorial para identificação das leveduras e dos fungos leveduriformes. Entre eles destaca-se a utilização dos meios cromogênicos (CHROMagar Candida/Candida ID bioMérieux® SA), empregados na triagem inicial e na identificação rápida de espécies patogênicas como *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei*, além dos testes bioquímicos com base no perfil de assimilação de substratos existentes no sistema de galerias API 20 C e API 32 (bioMérieux® SA), processados segundo as indicações dos fabricantes. O grande entrave para a utilização desses testes, e de outros já disponíveis, é o alto custo e a baixa procura por diagnóstico fúngico nos laboratórios de medicina veterinária.

Os testes rotineiramente utilizados para identificação de fungos leveduriformes, incluem a observação de características fenotípicas dos isolados (macromorfologia e micromorfologia), e a realização de provas como formação de tubo germinativo e produção de clamidoconídios (ambos positivos para *Candida albicans*), verificação de ascosporos, além de outros testes fisiológicos complementares para o diagnóstico das demais espécies (YARROW, 1998; NEUFELD, 1999; BARNETT et al., 2000; CHABASSE, 2006).

2.3.2.1 Exame macroscópico

Características como textura, topografia, bordos e coloração são observados em meios sólidos e formação de película em meios líquidos. As colônias de leveduras têm uma textura pastosa ou mucóide e, em geral, uma topografia lisa ou rugosa. Dependendo das condições de cultivo, podem apresentar franjas filamentosas em torno da margem da colônia de algumas espécies. Uma grande variedade de cores (branca, creme, acinzentada, parda, amarela, alaranjada ou vermelha) pode ser descrita. Apesar do aspecto colonial ser menos distintivo para as espécies de levedura, a coloração é um importante procedimento de exclusão (NEUFELD, 1999).

2.3.2.2 Exame microscópico

A micromorfologia é avaliada através de exame a fresco das células de leveduras, a partir de cinco até sete dias de crescimento de culturas em ágar Sabouraud (2% glicose, 1% peptona, 0,5% extrato de levedura, 2% ágar, 400 mg/L de cloranfenicol), observadas em microscopia óptica convencional. Os caracteres morfológicos a serem observados são: forma e tamanho da célula, tipo de reprodução (brotamento / fissão), presença de cápsula (na suspeita de *Cryptococcus* sp.) e a presença de blastoconídios e artroconídios para diferenciação entre os gêneros *Geotrichum* e *Trichosporon*.

Dois testes muito utilizados na triagem de culturas de leveduras possivelmente patogênicas são a formação de clamidoconídios e a formação de tubo germinativo. O desenvolvimento de clamidoconídios tem sido utilizado na micologia médica como procedimento diagnóstico especialmente de *Candida albicans*. A técnica escolhida, na maioria das vezes, é a de microcultivo utilizando ágar fubá. A colônia suspeita é inoculada através de estrias na superfície do meio e, a seguir, é recoberta com uma lamínula estéril. Os clamidoconídios estarão usualmente presentes após 24-48 horas de incubação a 30°C. Neste microcultivo também são observadas as seguintes características: formação de micélio, pseudomicélio, presença de blastoconídios, presença de artroconídios, posição dos mesmos e células leveduriformes em diversas disposições. Para a verificação da formação de tubo germinativo, a cultura suspeita é inoculada em tubo de ensaio contendo 0,5 a 1 mL de soro suíno ou clara de ovo, e incubada em banho-maria a 37°C durante 2 a 3 horas (NEUFELD, 1999).

A formação de ascosporos é realizada utilizando o meio especial ágar acetato (0,4% acetato de sódio, 2% agar), com incubação a 25°C por até um mês. A pequena quantidade de carboidratos nesse meio de indução restringe o crescimento vegetativo e aumenta a produção de ascosporos. As características observadas em microscopia óptica são a presença ou ausência de conjugação, forma e número de ascosporos por asca e liberação ou não de esporos logo após a sua formação (NEUFELD, 1999).

Dependendo do isolado, é importante o exame microscópico para a detecção de cápsula em torno das células de levedura. A visualização é feita através de preparações microscópicas com tinta da china ou nigrosina; nesse caso a tinta não cora a levedura, mas serve como contraste que permite que as cápsulas, que são hialinas, possam ser vistas (NEUFELD, 1999).

2.3.2.3 Testes Fisiológicos

Um importante teste preconizado pelas técnicas micológicas clássicas é a determinação da capacidade de fermentação da levedura em estudo. A fermentação alcoólica é o processo pelo qual um carboidrato é desdobrado na ausência de oxigênio, formando etanol e CO₂. Se um carboidrato for fermentado, ele será assimilado, porém o contrário não é, necessariamente, verdadeiro. Se a fermentação ocorre, a glicose será sempre fermentada. A técnica consiste em inocular as culturas em tubos de ensaio com meio para a fermentação de glicose contendo tubos de *Durham* invertidos em seu interior. A leitura dos resultados é feita regularmente em 1, 2, 3, 4, 7, 10, 14 e 21 dias após a incubação. A produção de gás é confirmada por seu acúmulo nos tubos de *Durham* (NEUFELD, 1999; BARNETT, 2000).

A capacidade de produzir urease é um critério útil para a distinção de leveduras. O teste consiste em inocular os isolados em tubos de ensaio contendo o meio sólido YCB-Uréia (1,17% YCB; 2% agar, 1% uréia; fucsina ácida). Após três dias de incubação, à temperatura ambiente, é realizada a leitura. A atividade da enzima urease, quando presente, provoca uma mudança do indicador de uma cor fucsina (rosa) para branco, devido à elevação de pH após a hidrólise da uréia no meio (NEUFELD, 1999).

O auxanograma com fontes de carbono e nitrogênio são testes baseados na capacidade de assimilação das leveduras frente a determinadas fontes de carbono e de nitrogênio. A habilidade ou não de assimilar os substratos ofertados permite a caracterização das espécies de acordo com seu padrão de assimilação. Tradicionalmente, três principais métodos são utilizados: o método de Wickerham em tubos de ensaio com meios líquidos, auxanograma em placas com ágar base nitrogenado (Yeast Nitrogen Base) para os testes com fontes de carbono. Utiliza-se o ágar Yeast Carbon Base para os testes de assimilação com fontes de nitrogênio (BARNETT et al., 2000).

A capacidade de crescimento de fungos leveduriformes sob diferentes temperaturas (25°C, 30°C, 37°C, 40°C, 42°C, 45°C) consiste em prova

laboratorial bastante utilizada. De modo geral, as espécies patogênicas crescem favoravelmente entre 30°C e 37°C, sendo o crescimento a 37°C bem característico. O teste consiste na inoculação dos isolados em tubos de ensaio contendo caldo Sabouraud (2% glicose, 1% peptona, 0,5% extrato de levedura). Após a inoculação, os tubos são incubados em banho-maria nas respectivas temperaturas testadas por três dias, sendo a leitura realizada diariamente através do grau de turvação, de acordo com a escala de Wickerham (YARROW, 1998; BARNETT et al., 2000).

2.4 Tratamento e Profilaxia

Apesar do aumento no número de antifúngicos comercialmente disponíveis nos últimos anos para o tratamento de diversas micoses humanas e animais, são raros os fármacos antimicóticos disponibilizados em veículo adequado para o tratamento da mastite micótica, principalmente quando comparados aos medicamentos antibacterianos.

A literatura registra poucos dados específicos sobre tratamento contra mastite fúngica, mas alguns autores citam a nistatina, a natamicina, o fluconazol e o miconazol em solução aquosa para o tratamento intramamário em vacas com mastite por *Candida* sp (NOBRE et al., 2002; KRUKOWSKI & SABA, 2003).

Exceto na mastite causada por *Cryptococcus* spp., na maioria das vezes, a doença é autolimitante, apresentando uma fase aguda com recuperação espontânea sem uso de antifúngicos. O tratamento suporte utilizado visa, geralmente, diminuir os sinais clínicos e não combater o agente etiológico específico (CARBON, 1968; CRAWSHAW et al., 2005).

Práticas higiênicas inadequadas prejudicam a qualidade do leite e favorecem a ocorrência de mastite. A prevenção é fundamental para o controle da mastite, diminuindo as perdas na produção, antes que essas sejam percebidas em níveis econômicos.

As instalações como sala de ordenha e curral de espera, por onde circulam os animais antes, durante e após a ordenha, devem ser mantidas limpas e secas,

para evitar a multiplicação de microrganismos. Na limpeza diária, é fundamental a remoção das fezes para reduzir a proliferação de moscas e outros parasitas. Utensílios e objetos de ordenha devem ser limpos e adequadamente desinfetados após cada ordenha.

A correta higiene do ordenhador é outro ponto fundamental, pois as mãos atuam como veículo transmissor de microrganismos, entre eles leveduras, as quais podem contaminar o úbere, o leite e todo o material utilizado. Outros aspectos a serem considerados em um programa de controle de mastite incluem a imersão dos tetos pré e pós-ordenha com desinfetante germicida, descarte dos animais com diagnóstico de mastite crônica, além da correta manutenção do equipamento da ordenha com a finalidade de evitar traumatismos mecânicos no úbere e/ou tetos das ovelhas (RADOSTIS et al., 2002).

No caso específico de ovinos, a contagem de células somáticas é uma importante ferramenta para o diagnóstico de mastites, visto que a realização do “California Mastitis Test” (CMT) não garante resultados fidedignos nessa espécie. O CMT é importante para a detecção de mastites subclínicas, indicando a quantidade de células somáticas presentes no leite. Estas células incluem as que resultam da descamação fisiológica do epitélio do úbere e, essencialmente, células de defesa da glândula mamária (glóbulos brancos e macrófagos). O resultado do teste é observado através da viscosidade da mistura (leite + reagente); no caso dos ovinos, somente as reações negativas ou classificadas como três cruces (fortemente positivas) são facilmente interpretadas, enquanto as reações intermediárias são duvidosas (FTHENAKIS, 1995; MOTA, 2008).

Outro ponto importante na resistência da glândula mamária às infecções é a dieta, pois a carência de certos nutrientes afeta os mecanismos de defesa, como, por exemplo, a atividade dos leucócitos, transporte de anticorpos e integridade do tecido glandular. Desse modo, alguns autores sugerem, por exemplo, uma suplementação alimentar com selênio e vitamina E (PASCHOAL et al., 2003).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais Amostrados

O estudo foi realizado com 311 ovelhas da raça Lacaune (72 com mastite clínica e 239 normais), criadas em sistema de confinamento, localizado na região metropolitana de Porto Alegre, estado do Rio Grande do Sul, no período de março/2007 a março/2009. As ovelhas não receberam tratamento antibacteriano antes da amostragem.

3.2 Critério para Identificação de Mastite

A mastite clínica foi caracterizada através da apresentação de sinais clínicos da glândula mamária (dor, calor e rubor) e por secreção anormal do leite. As ovelhas sem comprometimento aparente na glândula mamária, com características macroscópicas normais no leite e, ainda, com reações negativas no teste do CMT foram consideradas normais. Animais com reações intermediárias ao CMT (entre o negativo e o fortemente positivo) foram excluídas do critério de inclusão, pela dificuldade de interpretação dos resultados.

3.3 Amostras de Leite

Um total de 588 amostras de leite de ovelha foram obtidas, sendo 106 oriundas de ovelhas com mastite clínica e 482 de animais aparentemente normais (sem mastite). As amostras (10 mL) foram assepticamente colhidas em frascos estéreis, depois da correta antissepsia dos tetos com álcool 70°GL. Imediatamente as amostras foram remetidas ao laboratório em caixa de isopor com gelo e semeadas em diferentes meios de cultivo.

3.4 Análise Micológica

Alíquotas de 0,1 mL das amostras de leite foram semeadas pela técnica de espalhamento em superfície, em triplicata, no ágar acidificado Yeast Medium (0,3% extrato de levedura, 0,3% extrato de malte, 1% glicose, 0,5% peptona, 2% ágar, 400 mg/l de cloranfenicol, pH 4,5). As placas foram incubadas por 3 a 5 dias em temperatura de 22°C a 25°C, para o isolamento tanto das leveduras patogênicas quanto das não patogênicas. Considerou-se como positivas as amostras que apresentaram mais de cinco colônias morfolologicamente iguais. Após esse período, cada tipo morfológico foi isolado e purificado em placas de Petri contendo ágar YM. Os isolados foram armazenados em tubos de ensaio contendo ágar Sabouraud Dextrose (Oxoid), sendo cobertos com óleo mineral estéril e, após, mantidos em refrigerador. Inicialmente, as leveduras foram caracterizadas através de provas fisiológicas de acordo com testes rotineiramente utilizados (Figura 1) (BARNETT et al., 2000; YARROW, 1998), seguido de testes diferenciais, tais como produção de clamidoconídios e tubo germinativo (NEUFELD, 1999) e cultivo em Hicrome Candida Differential Agar Base (HIMEDIA[®]). A identificação final das leveduras e fungos leveduriformes foi realizada através do sistema API 20 C (Biomérieux[®]). Os isolados que produziram artroconídios foram classificados nos gêneros *Geotrichum* ou *Trichosporon*.

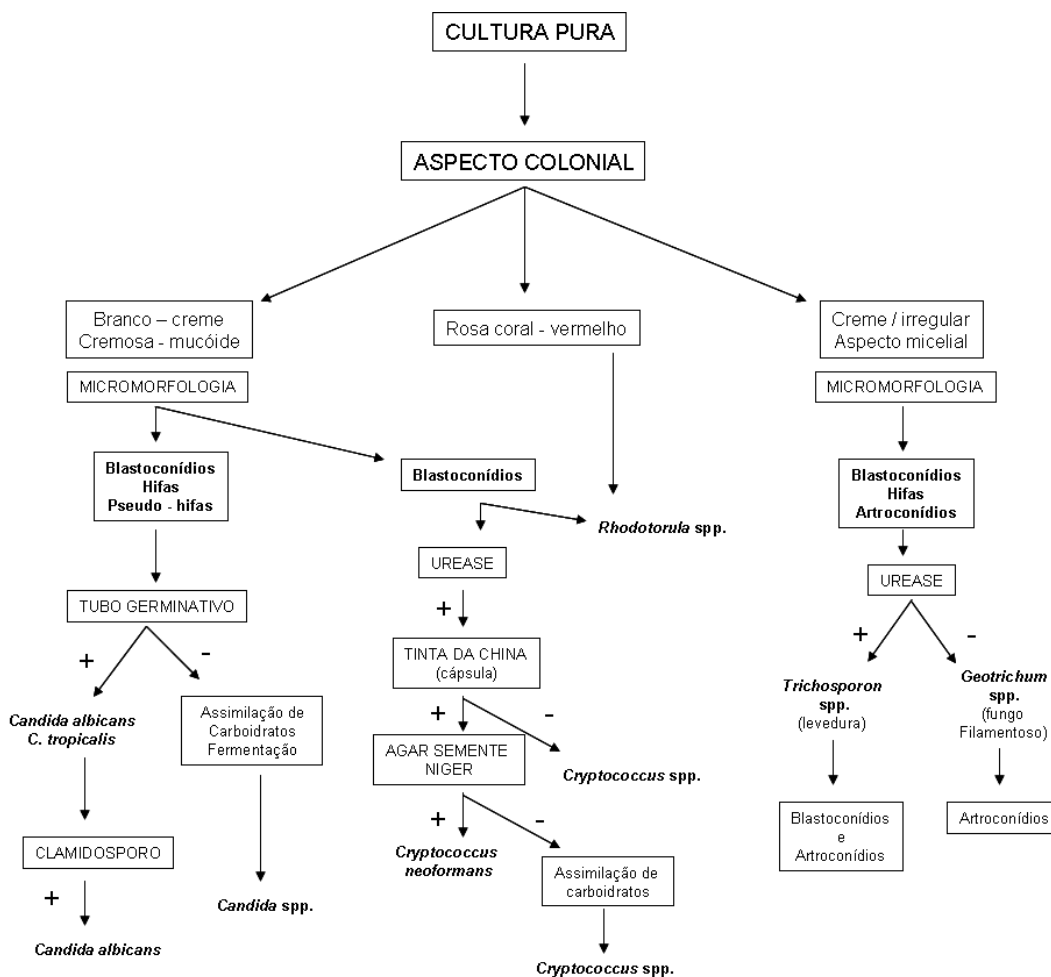


Figura 1: Etapas do diagnóstico micológico

3.5 Análise Bacteriológica

Uma alíquota de 10 µL foi semeada em ágar sangue de ovelha 5% e em ágar MacConkey, e incubada a uma temperatura de 37°C por 24-48h. As colônias isoladas foram identificadas por meio de suas características macro e micromorfológicas, bioquímicas e tintoriais (HARMON et al., 1990). As bactérias do gênero *Streptococcus* foram identificados também pelo teste de catalase. As bactérias do gênero *Staphylococcus* foram classificadas em *Staphylococcus* coagulase-positivos e *Staphylococcus* coagulase-negativos de acordo com os testes de catalase, *clumping factor* e coagulase. As bactérias

Gram-negativas foram repicadas em TSI, SIM e citrato (HARMON et al., 1990). Considerou-se como contaminadas as amostras que apresentaram o crescimento de mais de três colônias diferentes.

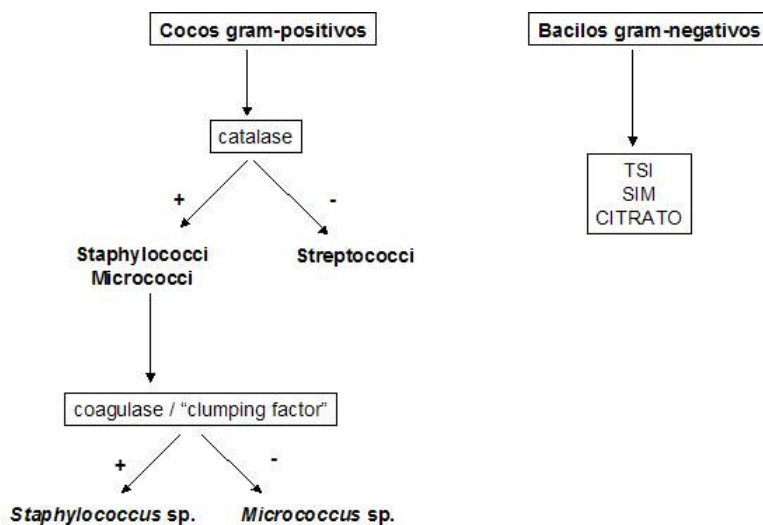


Figura 2: Etapas do diagnóstico bacteriológico

3.6 Análise Estatística

A relação entre mastite clínica e resultado microbiológico (análise micológica e bacteriológica) foi verificada através do teste Qui-quadrado (valor de significância valor- $p < 0,05$). A análise foi realizada pelo programa SPSS versão 12.0.

4 RESULTADOS

Ocorreu o isolamento de microorganismos em 196 (33,33%) amostras de leite (Tabela 1), sendo 134 (68,36%) com crescimento bacteriano, 53 (27,04%) micológico, 9 (4,59%) misto definidos pelo crescimento de bactérias e leveduras (Figura 3). Além disso, ocorreu contaminação em 42 amostras (7,14%) (definida pelo crescimento de mais de três colônias diferentes) e 350 (59,52%) foram negativas.

Foram cultivados 60 isolados pertencentes aos seguintes gêneros: *Candida* spp. (70,00%), *Rhodotorula* spp. (11,70%), *Trichosporon* spp. (6,70%), *Geotrichum* spp. (5,00%), *Pichia* spp. (5,00%) e *Cryptococcus* sp. (1,70%). Leveduras potencialmente patogênicas foram identificadas como *Candida glabrata* (n= 8), *C. tropicalis* (n= 6), *C. parapsilosis* (n= 5), *C. albicans* (n= 4), *Pichia guilliermondii* (n= 3) e *Trichosporon asahii* (n= 1).

Dentre o total de bactérias, foram isoladas: 110 (82,00%) Staphylococci coagulase-negativa, 14 (10,44%) bactérias Gram-negativas, 6 (4,48%) *Staphylococcus aureus* e 4 (3,00%) *Streptococcus* spp. Algumas bactérias Gram-negativas foram identificadas como *Pasteurella* spp., *Rhodococcus* spp. e *Acinetobacter* spp.

A análise estatística demonstrou associação significativa apenas entre as variáveis mastite clínica e o resultado bacteriológico (valor-p<0,05).

Tabela 1: Resultado microbiológico de 588 amostras de leite de ovelha coletadas no período de março/2007 a março/2009 na região metropolitana de Porto Alegre.

Amostras de leite (588)	Positivas (196)			Agentes isolados
	Bacteriológico N (%)	Micológico N (%)	Misto N (%)	
Mastite clínica (106)	73 (37,24%)	22 (11,22 %)	2 (1,02 %)	<i>Staphylococcus coagulase-negativa*</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Candida albicans*</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. tropicalis</i> <i>Pichia guilliermondii</i>
Normais (482)	61 (31,12 %)	31 (15,81 %)	7 (3,57%)	<i>Staphylococcus coagulase-negativa*</i> Bactérias Gram-negativas <i>Streptococcus spp.</i> <i>Candida albicans</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. tropicalis</i> <i>Candida spp.*</i> <i>Cryptococcus laurentii</i> <i>Geotrichum spp.</i> <i>Pichia guilliermondii</i> <i>Rhodotorula spp.</i> <i>Trichosporon asahii</i> <i>T. mucoides</i> <i>Trichosporon spp.</i>
TOTAL	134 (68,36%)	53 (27,04%)	9 (4,59%)	

* Crescimento misto: *Staphylococcus coagulase-negativa* e levedura.
N (Número absoluto); % (Porcentagem)

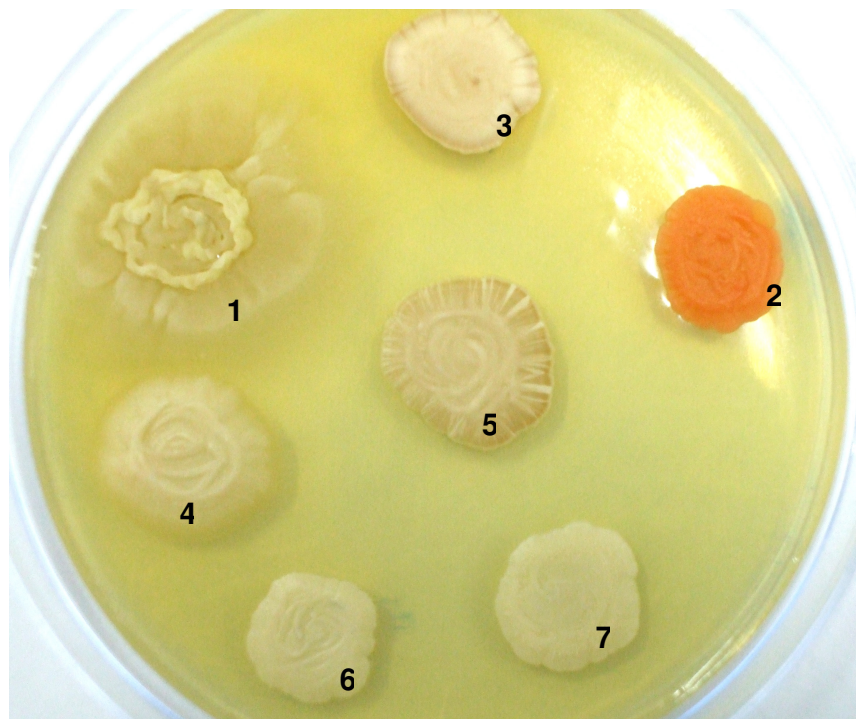


Figura 3. Características macromorfológicas de diferentes gêneros de leveduras observados no meio Agar Sabouraud. 1 – *Trichosporon* sp., 2 – *Rhodotorula* sp., 3, 4, 5, 6 e 7: *Candida* spp.

5 DISCUSSÃO

Em comparação com outras espécies produtoras de leite, o percentual de leite de ovinos ocupa o quarto lugar na produção mundial, contribuindo com 1,4% do total geral (CNPGL). Embora a ovinocultura leiteira seja uma atividade ainda pouco explorada (OTTO DE SÁ et al., 2005), segundo Ribeiro et al. (2007), no Brasil a criação de ovinos com aptidão para produção de leite tem se destacado nos últimos anos, em virtude de experiências bem sucedidas de produtores com a raça especializada Lacaune.

A maior parte do leite de ovelha não é consumido diretamente pela população, sendo destinado principalmente para a produção de queijos com valor de mercado significativo. Características peculiares desse leite, como a presença de níveis elevados de gordura e de caseína, favorecem a elaboração de diferentes tipos de queijos, com particularidades especiais de textura e sabor, o que confere aos produtos aromas e sabores especiais, como os queijos Roquefort e o Gorgonzola (SOUZA et al., 2005; TIMPERLEY & NORMAN, 1997). Dessa forma, características sensoriais e organolépticas típicas presentes no queijo, podem ser influenciadas desde o início da produção por fatores que interferem na quantidade e na qualidade do leite, tais como as técnicas de ordenha utilizada, infecções de úbere e manejo do rebanho (OTTO DE SÁ et al., 2005).

No presente trabalho, 22,8% das amostras foram positivas no cultivo bacteriológico, ocorrendo predominância de *Staphylococcus* coagulase-negativa no leite de ovelhas normais e com mastite clínica. O isolamento de *Staphylococcus aureus* ocorreu apenas no leite de animais com mastite clínica. Segundo Bergonier et al. (2003), Staphylococci são os principais agentes envolvidos nas infecções mamárias de pequenos ruminantes, sendo o *Staphylococcus aureus* mais frequente nos casos clínicos. *Staphylococcus* coagulase-negativa tem sido considerado a maior causa em infecções subclínicas, (HUESTON et al.; 1989), porém outros autores reportaram a presença desses agentes no leite de ovelhas sem mastite (FTHENAKIS & JONES, 1990).

A pesquisa de fungos filamentosos e leveduras não é realizada rotineiramente no leite cru, tanto de bovinos quanto de outras espécies, porém alguns trabalhos já indicaram a presença de uma grande diversidade de organismos fúngicos provenientes de animais sem mastite. No Rio Grande do Sul, um estudo realizado com 36 amostras de leite cru detectou 80 isolados pertencentes aos gêneros *Kluyveromyces*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Geotrichum* e *Trichosporon* (SPANAMBERG et al., 2004). No mesmo Estado, outro estudo, realizado com 15 amostras de leite *in natura* de cabras, detectou a presença de 56 leveduras identificadas como pertencentes aos gêneros *Bullera*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Sporodiobolus*, *Trichosporon*, *Yarrowia* e *Zygoascus* (SPANAMBERG et al., 2009). Na Itália, análises no leite *in natura* de búfalas, isolaram os gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* e *Yarrowia* (CORBO et al., 2001); no mesmo estudo, em relação ao leite *in natura* de ovelha, os gêneros *Bullera*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Yarrowia* e *Kluyveromyces* estavam presentes, sendo ressaltado o alto nível de contaminação quando comparado com outras amostras de leite normal de cabras, vacas e búfalas. Os resultados apresentados nos trabalhos anteriores mostraram resultados semelhantes ao presente estudo, onde os gêneros mais prevelentes foram *Candida*, *Cryptococcus*, *Geotrichum*, *Pichia*, *Rhodotorula* e *Trichosporon*.

De acordo com Pouillet et al. (1991), baixas contagens de microrganismos são comuns no leite de ovelhas. A qualidade microbiológica de queijos feito com leite de ovelha depende tanto da qualidade do material na sua origem, quanto do processo de fabricação. Alguns autores sugerem que a falta de padrões higiênicos na produção de leite ovino, desde sua obtenção até processamento térmico, dificulta o estabelecimento de práticas sanitárias básicas. Dessa forma, as características microbiológicas do leite ovino podem diferir do bovino, onde os padrões já estão bem padronizados. Antes de se estabelecer qualquer comparação, é preciso considerar aspectos específicos ligados ao sistema de criação e manejo das ovelhas, tais como maior número de animais para obtenção

de um determinado volume de leite, sistema de confinamento e materiais utilizados na criação, tipo de alimentação, fornecimento de ração durante a ordenha (SALMERÓN et al., 2002).

Segundo Fleet & Mian (1987), o leite *in natura* proveniente de animais sem mastite, contém baixos níveis de leveduras, as quais utilizam proteínas, lipídeos e açúcares disponíveis para seu crescimento. A reduzida quantidade de leveduras pode ser explicada por questões relacionadas à estrutura celular, pela competição com outro tipo de microrganismo e, ainda, por características peculiares do próprio alimento. Em relação à estrutura celular, por serem fungos unicelulares que se reproduzem por brotamento, e mais raramente por fissão celular, e por também poderem crescer em condições anaeróbicas, as leveduras têm a capacidade de multiplicar-se em ambientes líquidos, os quais favorecem a dispersão das células. Por outro lado, a reprodução assexuada das células não é favorável à dispersão das colônias na superfície dos alimentos sólidos, ou a sua penetração nesse tipo de produto, diferentemente da situação favorável que ocorre com os fungos filamentosos (TANIWAKI & SILVA, 2001). Uma outra explicação sobre o baixo nível de contaminação por leveduras, tanto no leite cru, quanto no pasteurizado, pode ser o rápido crescimento bacteriano, em amostras inicialmente também contaminadas com bactérias, o qual inibiria o desenvolvimento das leveduras presentes (DEAK, 1991). Alguns estudos indicam que a competição pelos substratos do leite cru por bactérias e/ou a produção de metabólitos bacterianos são antagonistas ao crescimento de leveduras (ROOSTITA & FLEET, 1996). O contrário ocorre no processo de fabricação de queijos, onde a interação das culturas de bactérias ácido-láticas e da flora secundária composta por bactérias e outros fungos é benéfica (VILJOEN, 2001). A terceira questão está relacionada ao fato de que, como todos os fungos, as leveduras crescem mais lentamente do que as bactérias, não competindo bem em ambientes que permitam o crescimento bacteriano, ou seja, condições de alta atividade de água e pH próximo ao neutro presente no leite (TANIWAKI & SILVA, 2001).

Ainda assim, mesmo com limitações peculiares, as leveduras representam um importante componente da microflora dos produtos lácteos, sendo geralmente detectada não somente no leite, mas também nos derivados. Quando a presença de leveduras está muito elevada, além de alterações nas características físicas e organolépticas em virtude da produção enzimática, existe um risco potencial para a saúde de pessoas, particularmente aquelas com imunodeficiência (MONTAGNA et al., 1998).

Segundo Grant (1996), a pasteurização pode não garantir a ausência de microrganismos patogênicos, e a eficácia do processo dependerá do nível de contaminação inicial do leite *in natura*, assim como de um correto procedimento após a pasteurização, evitando recontaminação do produto. Quanto ao leite de pequenos ruminantes, embora as informações sejam escassas, Andrade et al. (2008) não detectaram a presença de leveduras no leite de cabra após a pasteurização. Já outro estudo, que comparou o efeito da pasteurização na microflora inicial do leite *in natura* de ovelha e após o processo térmico, concluiu que as leveduras mostraram uma maior resistência em relação às bactérias presentes. Os autores ressaltaram ainda que a pasteurização pode reduzir a população presente para níveis abaixo do limiar de detecção e que condições posteriores, como a manutenção de adequada temperatura de refrigeração, são fundamentais para a manutenção da qualidade do leite (CONSENTINO & PALMAS, 1997). Algumas espécies de *Candida* e de *Kluyveromyces* encontradas no leite pasteurizado, também já foram encontradas em outros produtos, sugerindo que o leite *in natura* pode ter sido a fonte primária de contaminação (FLEET & MIAN, 1987). Além disso, os microorganismos presentes após tratamentos térmicos, podem causar alterações na textura e sabor dos produtos lácteos durante o armazenamento (CHEN et al., 2003; VACHLU & KOUR, 2006).

A maior parte das leveduras é considerada saprotrófica, sendo encontrada em tanques de armazenamento de leite oriundos de animais sadios (RUZ-PEREZ et al., 2004), embora em alguns casos estejam presentes em amostras de leite mastítico (KRUKOWSKY et al., 2006; KUO & CHANG, 1993; CHENGAPPA

ET AL., 1984; SANTOS & MARIN, 2005). A maioria dos estudos sobre mastite micótica está relacionada com vacas, e os agentes fúngicos não são considerados primários, atuando geralmente como contaminantes ambientais relacionados à falta de higiene (SPANAMBERG et al., 2004).

No Rio Grande do Sul, poucos estudos enfocam a prevalência da mastite micótica em animais produtores de leite. Ferreiro et al. (1985), detectaram em 896 amostras analisadas de leite mamítico, a presença de *Candida* spp. em 1,3% dentre as quais 0,9% por *Candida albicans*. Em outro estudo realizado no mesmo Estado, embora as leveduras do gênero *Candida* representassem 37,9% do total dos isolados, *C. albicans* não foi isolada no leite de animais com mastite clínica e subclínica (SPANAMBERG et al., 2008a). Em Minas Gerais, um estudo com 1710 amostras de leite de animais com mastite obteve 56 leveduras, sendo *C. albicans* a espécie dominante, representando 28,1% dos isolados (COSTA et al., 2008). Ainda em outro trabalho no Brasil, se obteve isolamento de *C. albicans* em 8,9% dentre 260 amostras de vacas com mastite (SANTOS & MARIN, 2005). No presente trabalho, *C. albicans* foi isolada em 6,7% das 588 amostras de leite de animais normais e daqueles com mastite.

No Egito, Moawad & Osman (2005), examinando 196 amostras de leite provenientes de ovelhas com mastite subclínica detectaram a presença de leveduras em 4,84% das amostras. Em pesquisa realizada no Iraque com 140 amostras de ovelhas com mastite, foi encontrada uma porcentagem total de 7,9% atribuída a fungos em geral, dentre os quais foram identificados apenas três gêneros de leveduras: *Candida*, *Cryptococcus* e *Saccharomyces* (AL-JAMMAS, 2003). Adicionalmente, trabalhos realizados na Argentina e Polônia com leite mamítico revelaram unicamente o isolamento de uma pequena quantidade de *Candida* spp. (GONZALES ET AL., 2003; KRZYSCIN, 2007). No presente trabalho, a presença de leveduras e fungos leveduriformes foi detectada em 9% (53) do total de amostras, com nove diferentes espécies de leveduras e uma de fungo leveduriforme. Apenas as espécies *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *Pichia guilliermondii* foram encontradas tanto nas amostras de leite

normal quanto no mastítico, enquanto que as outras cinco espécies foram isoladas apenas do leite normal.

No presente estudo, apenas 1,7% dos isolados foram de leveduras do gênero *Cryptococcus*. Embora *Cryptococcus neoformans* seja a mais frequentemente implicada nos casos de mastite, *Cryptococcus* sp., *C. laurentii* e *C. curvatus* também já foram associadas à mastite de bovinos (KIRK & BARTLETT, 1986; LANGONI et al., 1998; KLOSSOWSKA & MALINOWSKI, 2001, COSTA et al., 1993; KLIMAITE et al., 2003), de ovinos (SHNAWA & NIGAM, 1987), de bubalinos (PAL, 1991), assim como de caprinos (CONTRERAS et al., 1995).

O desencadeamento da mastite micótica em vacas e cabras ocorre usualmente após terapia antibacteriana (THOMPSON et al., 1978; JENSEN et al., 1996; VESTWEBER & LEIPOLD, 1995). O uso de antibacterianos por um período prolongado é apontado como o principal fator que favorece a ocorrência de mastite micótica, por afetar a microbiota que atua, quando em equilíbrio, como defesa natural do animal. Por exemplo, as leveduras do gênero *Candida* podem utilizar a penicilina e a tetraciclina como fontes de nitrogênio (LOFTSGARD & LINDQUIST, 1960), fato que enfatiza a relevância da implementação de um adequado manejo para prevenir a infecção. Pode ocorrer também casos de mastite micótica por origem iatrogênica, através de soluções antibacterianas contaminadas por organismos fúngicos (THOMPSON et al., 1978; JENSEN et al., 1996).

6 CONCLUSÕES

- O cultivo do leite proveniente de ovelhas normais e com mastite clínica apresentou 134 (68,36%) amostras positivas na análise bacteriológica e 53 (27,04%) positivas na análise micológica, resultados que enfatizam a necessidade da realização concomitante de ambos os exames para o correto diagnóstico e monitoramento dos casos de mastite em ovinos;

- Em relação à saúde pública, o consumo de leite de ovelhas e de seus derivados lácteos contaminados com microrganismos potencialmente patogênicos, constitui um risco para indivíduos imunossuprimidos;

- No que concerne à produção de derivados lácteos feitos com leite de ovelha, principalmente queijos, a contaminação microbiológica pode afetar a qualidade e a vida-de-prateleira do produto final, causando considerável prejuízo econômico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AALBAEK, B. et al. Mycotic and algal bovine mastitis in Denmark. **Acta Pathologica, microbiologica et immunologica**, v. 102, p. 451-456, 1994.

ANDRADE, P.V.D. et al. Características microbiológicas e físico-químicas do leite de cabra submetido à pasteurização lenta pós-envase e ao congelamento. **Ciência Rural**, v.38, p.1424-1430, 2008.

Al-JAMMAS, M.A. Mycotic mastitis among ewes in Mosul. **Iraqi Journal of Veterinary Sciences**, v.17, p.55-60, 2003.

BAKHEIT, M.R. et al. Caprine mastitis in Atbara Town, Nahr El Nile State Northern Sudan. **Sudan Journal of Veterinary Research**, v. 13, p.19-22, 1994.

BARNETT, J.A., PAYNE, R.W; YARROW, D. **Yeast, characteristics and identification**. 3.ed. Cambridge: Cambridge University, 2000. 1150p.

BAUMGARTNER, M. et al. Outbreak of clinical yeast mastitis in a dairy herd following simultaneous intramammary antibiotic treatment of 23 cows. **Wiener Tierärztliche Monatsschrift**, v.95, p.15-21, 2008.

BERGONIER, D. et al. Mastitis of dairy small ruminants. **Veterinary Research**, v.34, p.689-716, 2003.

BRADLEY, A.J. Bovine mastitis: an evolving disease. **The Veterinary Journal**, v.164, p.116-128, 2002.

BRAMLEY, A.J. & MCKINNON, C.H. The Microbiology of Raw Milk. In: _____. **Dairy Microbiology**, Vol. 1. (Ed.: Robinson, R.K.). Londres: Elsevier Applied Science, 1990, 299p.

BROCKLEHURST, T.F. & LUND, B.M. Microbiological changes in cottage cheese varieties during storage at + 7°C. **Food Microbiology**, v.2, p.207-233, 1985.

CALLON, C. et al. Application of SSCP- PCR fingerprinting to profile the yeast community in raw milk Salers cheeses. **Systematic and Applied Microbiology**,

v.29, p.172-180, 2006.

CARBON, J.P. **Contribution à l'étude de mamite mycosique de la vache.** 1968. 59f. Tese Doutorado em Medicina Veterinária – École Nationale de Vétérinaire D'Alfort (ENVA), França, 1968.

CARNEIRO, D.M.V.F.; DOMINGUES, P.F.; VAZ, A.K. Imunidade inata da glândula mamária bovina: resposta à infecção. **Ciência Rural**, v.39, p.1934-1943, 2009.

CHABASSE, D. et al. **Candida patogènes.** Paris: Lavoisier, 2006. 183p.

CHENGAPPA, M.M. et al. Isolation and Identification of Yeasts and Yeastlike Organisms from Clinical Veterinary Sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v.19, p.427-428, 1984.

CHAPMAN, H.R. & SHARPE, M.E. Microbiology of Cheese. In:____. **Dairy Microbiology**. Vol. 1. (Ed.: Robinson, R.K.). Londres: Elsevier Applied Science, 1990, 299p.

CHEN, L.; DANIEL, R.M.; COOPER, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. **International Dairy Journal**, v.13, p.255-275, 2003.

CNPGL – CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE GADO DE LEITE – Embrapa. Disponível em www.cnpgl.embrapa.br, acesso em janeiro de 2010.

COCOLIN, L. et al. An application of PCR-DGGE analysis to profile the yeast populations in raw milk. **International Dairy Journal**, v.12, p.407-411, 2002.

CONSENTINO,S. & PALMAS, F. Hygienic conditions and microbial contamination in six ewe's milking processing plants in Sardinia. **Journal of Food Protection**, v.60, p.283-287, 1997.

CONTRERAS, A. et al. Prevalency and aetiology of non-clinical intramammary infection in Murciano-Granadina goats. **Small Ruminant Research**, v.17, p.71-78, 1995.

COOREVITS, A. et al. Comparative analysis of the diversity of aerobic-spore-forming bacteria in raw milk from organic and conventional dairy farms. **Systematic and Applied Microbiology**, v.31, p.126-140, 2008.

CORBO, M.R. et al. Occurrence and characterization of yeasts isolated from milks and dairy products of Apulia region. **International Journal of Food Microbiology**, v.69, p.146-152, 2001.

COSTA, E.O. et al. Survey of bovine mycotic mastitis in dairy herds in the State of São Paulo, Brazil. **Mycopathologia**, v.124, p.13-17, 1993.

COSTA, G.M. et al. Mastite por leveduras em bovinos leiteiros do Sul do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Ciência Rural**, v.38, p.1938-1942, 2008.

CRAWSHAW, W.M.; MACDONALD, N.R.; DUNCAN, G. Outbreak of *Candida rugosa* mastitis in a dairy herd after intramammary antibiotic treatment. **Veterinary Records**, v.156, p.812-813, 2005.

DEAK, T. Foodborne yeast. **Advances in Applied Microbiology**, v.36, p.180-277, 1991.

ELAD, D. et al. Feed contamination with *Candida Krusei* as a probable source of mycotic mastitis in dairy cows. **Journal of the American Veterinary Medical Research**, v. 207, p. 620-622, 1995.

FERREIRO, L. et al. Mastite bovina na Grande Porto Alegre, RS – Brasil. **Arquivos da Faculdade de Veterinaria - UFRGS**, v.13, p.81-88, 1985.

FLEET, G.H. Yeasts in dairy products, A Review. **Journal of Applied Bacteriology**, v.68, p.199-211, 1990.

FLEET, G.H. & MIAN, M.A. The occurrence and growth of yeasts in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v.4, p.145-155, 1987.

FTHENAKIS, G.C. & JONES, J.E.T. The effect of experimental induced clinical mastitis on milk yield of ewes and on the growth of lambs. **British Veterinary Journal**, v.146, p.43-49, 1990.

FTHENAKIS, G.C. California Mastitis Test and Whiteside Test in diagnosis of subclinical mastitis of dairy ewes. **Small Ruminant Research**, v.16, p.271-276, 1995.

GONZALES, C.A. et al. Evolution of sanitary status from sheep's udder during the milking period. **Veterinaria Argentina**, v.20, p.609-617, 2003.

GRANT, I.R. et al. Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in cow's milk at pasteurization temperatures. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.631-636, 1996.

HARMON, R. J. et al. **Microbiological procedures for diagnosis of bovine udder infection**. Arlington: National Mastitis Council, 1990. 34 p.

HUESTON, W.D.; BONER, G.J.; BAERTSCHE, S.L. Intramammary antibiotic treatment at the end of lactation for prophylaxis and treatment of intramammary infections in ewes. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.194, p.1041-1044, 1989.

JACQUES, N. & CASAREGOLA, S. Safety assessment of dairy microorganisms: The hemiascomycetous yeasts. **International Journal of Food Microbiology**, v.126, p.321-326, 2008.

JENSEN, H.E., MONTEIROS, A.E.; CARRASCO, L. Caprine mastitis due to Aspergillosis and Zygomycosis: a pathological and immunohistochemical study. **Journal of Comparative Pathology**, v.114, p.183-191, 1996.

JODRAL, M. et al. Mycoflora and toxigenic *Aspergillus flavus* in Spanish milk. **International Journal of Food Microbiology**, v.18, p.171-174, 1993.

KAUKER, E. Ueber mastitis-blastomyceten. **Berliner und Münchener Tier Woch**, v.68, p.407, 1955.

KIRK, J.H. & BARTLETT, P.C. Bovine mycotic mastitis. **Compendium on Continuing Education Practice Veterinary**, v.8, p.F106-F110, 1986.

KLIMAITE, J. et al. Etiology yeasts and other microorganisms of subclinical mastitis in cows. **Veterinarija ir Zootechnika**, v.23, p.5-9, 2003.

KLOSSOWSKA, A. & MALINOWSKI, E. Pathogens in raw milk which affect humans. **Medycyna Weterynaryjna**, v.57, p.28-31, 2001.

KRUKOWSKI, 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, p.3-7, 2003.

KRUKOWSKI, H. et al. Yeasts and algae isolated from cows with mastitis in the south-eastern part of Poland. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v.9, p.181-184, 2006.

KRZYSCIN, P. Etiological factors of mastitis in Polish merino ewes. **Annales Universitatis Mariae Curie-Skowska. Sectio EE Zootechnica**, v.25, p.37-42, 2007.

KUO, C.C. & CHANG, C.H. Isolation of yeasts from mastitis milk of dairy cattle. **Journal of the Chinese Society of Veterinary Science**, v.19, p.221-227, 1993.

LAGNEAU, P.E. Isolation of yeasts from bovine milk in Belgium. **Mycopathologia**, v.135, p.90-97, 1993.

LANGONI, H. et al. Participação de leveduras, algas e fungos na mastite bovina. **Veterinária e Zootecnia**, v.10, p.89-98, 1998.

LOFTSGARD, G. & LINDQUIST, K. Bovine mycotic mastitis. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.1, p.201-220, 1960.

LOPANDIC, K. et al. Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. **Food Microbiology**, v.23, p.341-350, 2006.

MANJEET, S. et al. Biochemical changes in milk in Cryptococcal mastitis of experimental goats. **Indian Journal of Dairy Science**, v.47, p.1043-1049, 1994.

MOAWAD, A.A. & OSMAN, S.A. Prevalence and aetiology of subclinical mastitis in dairy ewes at Fayoum Governorate, Egypt. **Veterinary Medical Journal**, v.51, p.135-149, 2005.

MONTAGNA, M.T. et al. Food Products and fungal contamination. Note I. Preliminary investigation in commercial yoghurt. **Journal of Preventive Medicine and Hygiene**, v.39, p.68-70, 1998.

MOTA, R.A. Aspectos epidemiológicos, diagnóstico e controle das mastites em caprinos e ovinos. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, v.2, p.57-61, 2008.

NEUFELD, P.M. Identificação de fungos leveduriformes. *In: Manual de micologia médica: Técnicas básicas de diagnóstico*. Rio de Janeiro: PNCQ, 1999. p.80-95.

NOBRE, M.O. et al. Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. Revisão bibliográfica. **Ciência Rural**, v.32, p.175-184, 2002.

ODDS, F.C. **Candida and candidosis**. London: Bailliere Tindall, 1988. 382p.

OTTO DE SÁ, C. et al. Influência do fotoperíodo no consumo alimentar, produção e composição do leite de ovelhas Bergamácia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.6, p.601-608, 2005.

PAL, M. Mastitis in a water buffalo (*Bubalus bubalis*) due to *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v.8, p.89-91, 1991.

PASCHOAL, J.J. et al. Efeito da suplementação de selênio e vitamina E sobre a incidência de mastite clínica em vacas da raça holandesa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, p.249-255, 2003.

POULLET, B. et al. Microbial study of Casar de Cáceres cheese throughout ripening. **Journal of Dairy Research**, v.58, p.231-238, 1991.

PRICE, M.F.; WILKINSON, I.D.; GENTRY, L.O. Plate methods for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v.20, p.7-14, 1982.

RADOSTIS, O.M. et al. Mastite. In:_____. **Clinica veterinaria - um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.541-629.

RAINARD, P. & RIOLLET, C. Innate immunity of the bovine mammary gland. Review article. **Veterinary Research**, v.37, p.369-400, 2006.

RIBEIRO, L.C. et al. Produção, composição e rendimento em queijo do leite de ovelhas Santa Inês tratadas com ocitocina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.2, p.438-444, 2007.

RICHARD, J.L. et al. Identification of yeasts from infected bovine mammary glands and their experimental infectivity in cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v.48, p.1991-1994, 1980.

ROOSTITA, R. & FLEET, G.H. Growth of yeasts in milk and associated changes to milk composition. **International Journal of Food Microbiology**, v.31, p.205-219, 1996.

RUZ-PEREZ, M. et al. Pesquisa de fungos no leite de tanques de refrigeração de propriedades de exploração leiteira. **Arquivo Instituto Biológico**, v.71, p.663-665, 2004.

SALMERÓN, J. et al. Effect of pasteurization and seasonal variations in the microflora of ewe's milk for cheesemaking. **Food Microbiology**, v.19, p.167-174, 2002.

SANTOS, R.C. & MARIN, J.M. Isolation of *Candida* spp. from mastitic bovine milk in Brazil. **Mycopathologia**, v.159, p.251-253, 2005.

SEILER, H. Some additional physiological characteristics for the identification of food-borne yeasts. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, v.45, p.253-258, 1991.

SHNAWA, I.M.S. & NIGAM, J.M. A note on cryptococcal mastitis in sheep. **Indian Veterinary Medical Journal**, v.7, p.175-176, 1987.

SOUZA, A.C.K.O. et al. Produção, composição química e características físicas do leite de ovinos da raça corriedale. **Revista Brasileira Agrociência**, v.11, p.73-77, 2005.

SPANAMBERG, A. et al. Diversity and enzyme production by yeasts isolated from raw milk in Southern Brazil. **Acta Scientiae Veterinaire**, v.32, p.195-199, 2004.

SPANAMBERG, A. et al. Diversity of yeasts from bovine mastitis in southern Brazil. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v.25, p.154-156, 2008a.

SPANAMBERG, A. et al. Efeito do congelamento sobre a viabilidade de células leveduriformes. **Acta Scientiae Veterinaire**, v.36, p. 43-45, 2008b.

SPANAMBERG, A. et al. High frequency of potentially pathogenic yeast species in goat's raw milk and creamed cheese in Southern Brazil. **Acta Scientiae Veterinaire**, v.37, p.133-141, 2009.

TAMURA, N. K. et al. Fatores de virulência de *Candida* spp. isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p.91-93, 2007.

TANIWAKI, M.A. & SILVA, N. **Fungos em Alimentos: ocorrência e detecção**. Campinas: Núcleo de Microbiologia/ITAL, 2001, 82p.

THOMPSON K,G. et al. Mycotic mastitis in two cows. **New Zealand Veterinary Journal**, v.26, p.176-177, 1978.

TIMPERLEY, C. & NORMAN, C. **O livro de queijos**. São Paulo: Manole, 1997. 119p.

VACHLU, J. & KOUR, A. Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.9, p.69-75, 2006.

VERMA, P.C.; KARLA, D.S.; BHARGAVA, D.N. Some aspects os

histochemical studies in experimentally produced mycotic mastitis. **Haryana Veterinarian**, v.14, p.27-34, 1985.

VESTWEBER, J.G. & LEIPOLD, H.W. Pulmonary and mammary aspergillosis in a dairy cow. **Canadian Veterinary Journal**, v.35, p.780, 1995.

VICTORIA, C. & LANGONI, H. Occurrence of clinical and subclinical mastitis in dairy herd caused by *Trichosporon beigelli*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, p.280-282, 2006.

VILJOEN, B.C. The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. **International Journal of Food Microbiology**, v.69, p.37-44, 2001.

WAWRON, W. & SZCZUBIAL, M. Treating mastitis mycotica in cows. **Medycyna Weterynaryjna**, v.57, p.863-866, 2001.

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.

YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In: KURTZMAN, C.P. & FELL, J.W. (Eds.). **The yeasts, a taxonomic study**. Amsterdam: Elsevier Science, 1998, pp. 77-100.

ANEXO 1

AGAR HICROME CANDIDA BASE MODIFICADO (HIMEDIA)

Meio cromógeno de cultura diferencia *Candida albicans* de outras leveduras de interesse clínico (*Candida tropicalis*, *C. krusei* e *C. glabrata*). A utilização deste meio facilita a detecção e a identificação destas leveduras e, também, fornece resultados presuntivos em menor tempo que os obtidos pelos métodos já padronizados.

Composição em g/L:

Digestão péptica do tecido animal: 5.00

Extrato de malte: 3.0

Extrato de leveduras: 3.0

Glicose: 10.0

Cloranfenicol: 0.05

Mistura cromogênica: 2.6

Agar: 18.0

pH final (a 25°C): 7.2 (+/- 0.2)

Preparação do meio de cultura:

Dissolver 28.83 gramas em 500mL de água destilada estéril aquecida. Não autoclavar. Misturar bem e dispensar em placas de Petri.

Avaliação dos resultados:

Observação da cor apresentada pela cultura após 24-48 horas a 30°C.

Leveduras	Cor
<i>Candida albicans</i>	colônia lisa / verde claro
<i>Candida tropicalis</i>	colônia azul / azul metálico
<i>Candida krusei</i>	colônia aveludada / lilás- rosada
<i>Candida glabrata</i>	colônia creme a branca

ANEXO 2

Sistema API 20 C (Biomérieux)

Sistema comercial de galerias que contém substratos desidratados, permitindo a realização simultânea de 19 provas de assimilação.

Preparação do meio de cultura:

A cultura da levedura é misturada em água destilada até se alcançar um grau de turvação 2 na escala de McFarland. Após 100 µL é vertido nos orifícios da galeria. A leitura é realizada de acordo com o grau de turbidez em comparação com o controle negativo.

Avaliação dos resultados:

A identificação é realizada a partir da formação de um código numérico, através da observação da turvação em cada substrato (resultado positivo).