

## Fatores de risco associados à mastite bovina causada por *Prototheca zopfii*

### Risk factors associated with bovine mastitis caused by *Prototheca zopfii*

Aline Artioli Machado Yamamura<sup>I</sup> Ernst Eckhardt Müller<sup>II</sup> Roberta Lemos Freire<sup>II</sup>  
Júlio César de Freitas<sup>II</sup> Lucienne Garcia Pretto-Giordano<sup>II</sup>  
Roberta dos Santos Toledo<sup>II</sup> Márcio Garcia Ribeiro<sup>III</sup>

#### RESUMO

Este trabalho teve como objetivo o estudo de fatores de risco associados à mastite bovina causada por *Prototheca zopfii*. Foram analisadas 13 propriedades leiteiras dos Estados do Paraná e de São Paulo, segundo os seguintes critérios de seleção: confirmação prévia de casos de mastite por *Prototheca* spp., triagem pela pesquisa de *Prototheca* spp. em tanques de expansão e latões e rebanhos com contagem de células somáticas acima de  $5 \times 10^5$  cel mL<sup>-1</sup>. As amostras coletadas consistiram de: leite, água, solo, fezes e swab de teteiras. *Prototheca* spp. foi isolada de amostras de leite dos quartos mamários com mastite clínica ou subclínica em uma propriedade e de amostras de leite e do ambiente em quatro propriedades, nas quais foi isolada em amostras de: água de bebedouro, abastecimento, esgoto, empoçada no piso de estábulo e sala de ordenha, solo de piquete e pasto, teteiras, fezes de bezerros e suínos. Do total de 383 vacas examinadas, *Prototheca* spp. foi isolada em 20 (5,2%) vacas, sendo caracterizada como *P. zopfii* em 18. Os fatores de risco associados à mastite causada por *P. zopfii* foram: criação das vacas a pasto, alimentação dos animais com pasto e silagem, realização de ordenha mecânica em estábulo, permanência das vacas após ordenha em piquete sem alimento, criação de suínos próxima às instalações dos bovinos, existência de cães, gatos e roedores, falta de higienização dos tetos com água, pré-imersão dos tetos em aplicador com retorno e sem a troca do anti-séptico, alimentação dos bezerros com leite de vacas com mastite clínica e serem as vacas da raça holandesa.

**Palavras-chave:** mastite bovina, bovinos leiteiros, alga, *Prototheca* spp..

#### ABSTRACT

This research had as objective the study of risk factors associated with bovine mastitis caused by *Prototheca*

*zopfii*. Thirteen dairy herds in Paraná and São Paulo states were analyzed and selected according to the following criteria: previous confirmation of *Prototheca* spp. mastitis cases, screening of *Prototheca* spp. in bulk tanks and milk cans, and herds with somatic cells count over  $5 \times 10^5$  cel mL<sup>-1</sup>. The samples collected consisted of: milk, water, soil, manure and swabs of teat cup rubbers. *Prototheca* spp. was isolated from mammary quarters with clinical and subclinical mastitis of milk samples in one herd and from the environment and cows in four herds. Out of 383 cows examined, *Prototheca* spp. was isolated in 20 (5.2%) cows with mastitis, and 18 of them were characterized as *P. zopfii*. In four herds when *Prototheca* spp. was identified from mammary quarters and environment the agent was isolated from the following samples: water in the waterers, puddled water in the stalls and the milking parlour, supply, sewage, cow pen and pasture soil, teat cup rubbers and manure from calves and swines. The risk factors associated with *P. zopfii* mastitis consisted of: pasture system, pasture and silage feeding, use of milking machine in stalls, cow pen without fresh feed after milking, raising of swines near bovine housing, existence of dogs, cats and rodents, absence of teats hygienization with water, use of pre-immersion devices with return and without change of antiseptic, calves fed with milk of clinical mastitis cases and the Holstein breed.

**Key words:** bovine mastitis, dairy cattle, algae, *Prototheca* spp.

#### INTRODUÇÃO

Além das bactérias, reconhecidas há décadas como agentes etiológicos de mastite em vacas leiteiras, vários outros gêneros e espécies de microrganismos, inclusive algas unicelulares do gênero

<sup>I</sup>Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Estadual de Londrina (UEL), CP 6001, 86051-970, Londrina, PR, Brasil. E-mail: alineartioli@uel.br. Autor para correspondência.

<sup>II</sup>UEL, Londrina, PR, Brasil.

<sup>III</sup>Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, Brasil.

*Prototheca*, podem causar alterações inflamatórias no úbere (BENITES et al., 1999). A mastite bovina causada por *Prototheca* spp. foi descrita pela primeira vez na Alemanha (LERCHE, 1952).

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). Trabalhos recentes relatam a ocorrência de *P. zopfii* em rebanhos leiteiros de Santa Catarina e Goiás (VAZ et al., 2005; BUENO et al., 2006). 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 (KIRK, 1991). 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). *P. zopfii* foi isolada em propriedades leiteiras, com surtos de mastite no ambiente, em amostras de fezes, teteiras, água e solo de pastagem (COSTA et al., 1997).

No Brasil, país de clima propício à manutenção de *P. zopfii* no meio ambiente, 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. Este trabalho teve como objetivo pesquisar-se os fatores de risco associados à mastite bovina causados por *Prototheca* spp. em rebanhos leiteiros.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização desta pesquisa, foram selecionadas 13 propriedades produtoras de leite, com um total de 707 vacas em lactação, sendo localizadas em cinco municípios do Estado do Paraná e em um do Estado de São Paulo. As propriedades foram selecionadas pelos seguintes critérios: confirmação prévia de casos de mastite causada por *Prototheca* spp. (duas propriedades), triagem através da pesquisa de *Prototheca* spp. em tanques de expansão e latões (oito propriedades) e propriedades com contagem de células somáticas de rebanho acima de  $5 \times 10^5$  cel mL<sup>-1</sup> (três). Nessas propriedades, foram examinados 820 quartos mamários e coletadas amostras de leite de 383 vacas com mastite clínica ou subclínica, primíparas e

pluríparas, da raça holandesa e mestiça, em diferentes estágios de lactação, no período de novembro de 2002 a novembro de 2004.

De cada tanque de expansão e latão, foi coletada uma amostra de 25mL de leite após agitação. Das vacas com mastite clínica (sinais clínicos ou prova de Tamis positiva) e de vacas com mastite subclínica diagnosticada pelo CMT (*Califórnia Mastitis Test*) (SCHALM & NOORLANDER, 1957), as amostras de leite foram coletadas em tubos com tampa de rosca estéreis após assepsia dos tetos e acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo reciclável para transporte até o laboratório.

Em todas as propriedades, foram coletadas amostras de água de bebedouro, água de abastecimento, esgoto proveniente da sala de ordenha, água empoçada no piso de sala de ordenha ou de estábulo, solo da pastagem, solo do piquete próximo à sala de ordenha ou estábulo, da cama, em caso de confinamento, de swabs de teteiras antes e após a ordenha das vacas com mastite causada por *Prototheca* spp., de fezes coletadas por meio de swabs retais de vacas (com mastite causada por *Prototheca* spp.) e de bezerros lactentes. As amostras de fezes de instalações de suínos foram coletadas em duas propriedades leiteiras, onde os animais eram criados próximos às instalações do gado de leite. As amostras de solo foram colhidas em diferentes pontos, 5cm abaixo da superfície, e as fezes das instalações dos suínos foram colhidas com espátula e acondicionadas em placas estéreis. As amostras de aproximadamente 300mL de água foram acondicionadas em frascos com capacidade de 500mL. Todo o material de coleta foi previamente esterilizado e as amostras foram mantidas em caixas isotérmicas com gelo reciclável para transporte até o laboratório.

Para o estudo dos fatores de risco associados à mastite causada por *Prototheca* spp., foi elaborado um formulário de investigação epidemiológica. As questões formuladas levaram em consideração os seguintes fatores: tipos de instalações, manejo dos animais, manejo e higiene de ordenha, tratamento de vacas em lactação e secas e manejo dos bezerros. Foram consideradas ainda características do solo dos piquetes e mangueiras, criação próxima de outras espécies animais, fonte e localização da água de abastecimento e de bebedouros e destino dos dejetos.

As amostras de leite colhidas de tanques ou latões foram semeadas em meio de enriquecimento para *Prototheca* spp. (MEP) indicado por PORE et al. (1987). Após esterilização em autoclave, foi adicionado o antifúngico 500mg de 5-fluorocitosina a 190mL de meio de cultura. Para o enriquecimento, foi adicionado

1mL de MEP para cada 5mL de leite e os frascos foram incubados a 32°C, por aproximadamente 96 horas, em estufa-incubadora com plataforma de agitação. Amostras de leite obtidas de vacas, individualmente e do meio de enriquecimento, foram semeadas por esgotamento em ágar Sabouraud dextrose (ASD) com 100mg mL<sup>-1</sup> de cloranfenicol e 0,1g L<sup>-1</sup> de hidróclorato de tiamina. As placas foram incubadas por 48 horas, a 35°C (PORE, 1983).

Para a análise das amostras de água proveniente do solo, alíquotas de 50mL da amostra foram centrifugadas a 480 x g por 10 minutos, e volumes de 20mL do sedimento, ou água do fundo dos tubos, foram semeados em duplicata no ASD. As amostras de água límpida de abastecimento e provenientes de bebedouro foram filtradas em filtros Millipore de 0,45mm. Para a semeadura, os filtros foram pressionados sobre o ASD em duplicata e o resíduo semeado por esgotamento com alça de platina. As placas foram incubadas a 35°C e em temperatura ambiente por até 96 horas (PORE et al., 1983).

As amostras de solo foram diluídas em salina estéril, semeadas em ASD e as culturas incubadas por 48 horas, a 35°C. As amostras de fezes e os *swabs* de fezes e de teteiras foram semeados em ASD e as culturas incubadas por até 96 horas, a 35°C (PORE et al., 1983; COSTA et al., 1997).

Para o isolamento e a identificação das principais bactérias causadoras de mastite, as amostras de leite foram semeadas em ágar-sangue ovino 5% e ágar MacConkey, e incubadas em aerofilia por até 120 horas e 48 horas, respectivamente, e identificadas pelas características culturais, morfológicas, tintoriais e bioquímicas (KRIEG & HOLT, 1984; HARMON et al., 1990). Para a caracterização do gênero *Prototheca*, as colônias foram identificadas pela morfologia em ASD e, microscopicamente, pela coloração com lactofenol-azul-algodão, sendo observados a forma, o tamanho dos esporângios e a presença de endósporos. As espécies foram identificadas por assimilação de carboidratos (sacarose, glicose e trealose) e de n-propanol em meio YNB - *Yeast Nitrogen Base* (CAMARGO & FISCHMAN, 1979; PORE et al., 1983).

Para a análise estatística univariada dos resultados, foram empregados o teste de Qui-quadrado, ou Exato de Fischer, e o cálculo de *Odds Ratio* com intervalo de confiança de 95%. Utilizou-se o nível de significância de 5%. Os cálculos foram executados no programa Epi Info 6,0 (DEAN et al., 1994).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram examinados 820 quartos mamários de 383 vacas em lactação com mastite clínica ou subclínica

nas 13 propriedades estudadas, tendo sido isolada *Prototheca* spp. em dez propriedades. Dessas, em oito, o agente foi isolado em amostras de leite dos tanques de expansão, mas, somente em três dessas, foi isolada *Prototheca* spp. de amostras de leite dos quartos mamários e do ambiente. Nas duas propriedades com diagnóstico prévio de mastite causada por *Prototheca* spp., esta alga foi isolada em amostras de leite dos quartos mamários, em uma propriedade, e nas amostras dos quartos mamários e do ambiente, em outra. Nas três propriedades leiteiras com contagem de células somáticas acima de 5x10<sup>5</sup>cel mL<sup>-1</sup>, não foi isolada *Prototheca* spp.. O quadro subclínico da mastite bovina causada por *Prototheca zopfii* se caracteriza pela baixa produção de leite e contagem de células somáticas elevada, geralmente superior a 10x10<sup>5</sup>cel mL<sup>-1</sup> (JÁNOSI et al., 2001). No entanto, as vacas infectadas também podem apresentar contagem de células somáticas baixa, ou seja, inferior a 2x10<sup>5</sup>cel mL<sup>-1</sup> (TENHAGEN et al., 2005; BUENO et al., 2006).

Do total de 383 vacas examinadas, *Prototheca* spp. foi isolada em amostras de leite de 30 quartos mamários em 20 (5,2%) vacas, sendo caracterizadas como *P. zopfii* em 18 vacas. As duas vacas restantes localizavam-se em uma propriedade localizada em município do Estado de São Paulo, no qual a metodologia empregada não permitiu que fosse identificada a espécie pertencente ao gênero *Prototheca*. Oito vacas apresentaram mastite subclínica em 12 quartos mamários e 12 vacas mastite clínica em 18 quartos mamários. Em sete quartos mamários, *Prototheca* spp. estava associada ao isolamento de *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium bovis* e *Candida* spp..

AALBAEK et al. (1994), na Dinamarca, ao analisarem 40 rebanhos leiteiros, diagnosticaram 42 vacas com mastite causada por *P. zopfii* e observaram uma prevalência de mastite de 11,1%. Em estudo realizado na Hungria por JÁNOSI et al. (2001), em um período de dois anos, foram identificadas 223 vacas com mastite causada por *Prototheca* spp. em 32 propriedades e a prevalência de animais foi de 1,6%.

COSTA et al. (1995), ao estudarem 28 propriedades leiteiras nos Estados de São Paulo e Minas Gerais, constataram uma taxa de 6,33% de mastite bovina por algas do gênero *Prototheca*. Em um surto de mastite bovina, COSTA et al. (1996a) verificaram uma taxa de 8,06% em vacas com mastite clínica por *Prototheca* spp. Em estudo subsequente, COSTA et al. (1996b) observaram taxas de 14,95% em vacas com mastite subclínica e de 8,06% em vacas secas. Na região norte do Estado do Paraná, a ocorrência de mastite bovina causada por algas do gênero *Prototheca*

relatada pela primeira vez foi de 0,48% (FILLIPSEN et al., 1999).

Das amostras de leite dos 820 quartos mamários estudados, foram isolados microrganismos de 494 (60,24%) quartos mamários, de um total de 319 vacas com suspeita de mastite. Os microrganismos isolados com maior frequência foram *Corynebacterium bovis* (33,00%), *Staphylococcus* coagulase negativo (24,00%), *Streptococcus* spp. (14,58%), *Staphylococcus* coagulase positivo (11,54%), *P. zopfii* (4,66%), *Candida* spp. (2,23%) e *Prototheca* spp. associada a outros agentes (1,40%).

COSTA et al. (2000a) referem-se aos microrganismos predominantes na etiologia das mastites bovinas de propriedades das diferentes bacias leiteiras do Estado de São Paulo como pertencentes às espécies dos gêneros *Corynebacterium*, *Staphylococcus* e *Streptococcus*, variando de um mínimo de 62,2%, na bacia leiteira de Alta Paulista a um máximo de 91% na bacia leiteira do Vale do Ribeira.

Nas quatro propriedades com isolamento de algas no ambiente das vacas, *Prototheca* spp. e *P. zopfii* foram isoladas em uma das seguintes amostras de água: de bebedouro, de abastecimento e de esgoto proveniente da sala de ordenha, além de quatro amostras de solo, nove de fezes de bezerros, seis de fezes de suínos e cinco de teteiras. Em amostras de solo, apesar da utilização de meio seletivo, não foi possível identificar-se a espécie do gênero *Prototheca* devido ao crescimento de fungos filamentosos.

A análise univariada consta das variáveis de manejo de ordenha e do rebanho relacionadas à presença de *Prototheca* spp. em amostras de leite e do ambiente dos animais. Verifica-se que os fatores de risco associados à mastite por *P. zopfii* nos rebanhos estudados foram: ordenha mecânica em estábulo (P=0,0048; OR=4,23; IC95%=1,40-13,64), permanência das vacas após a ordenha em piquete sem alimento (P=0,0339), falta de higienização dos tetos com água (P=0,0001; OR=11,37; IC95%=3,43-41,53), pré-imersão dos tetos em aplicador com retorno do anti-séptico (P=0,0001; OR=21,53; IC95%=6,40-76,91), não efetuação da troca do anti-séptico utilizado no *pre-dipping* (P=0,0098), criação a pasto (P=0,0157), alimentação com pasto e silagem (P=0,0001), criação de suínos próximas às instalações dos bovinos (P=0,0001), existência de cães, gatos e roedores (P=0,0028), bezerros alimentados com leite de vacas com mastite clínica (P=0,0031; OR=6,02; IC95%=1,63-26,30) e vacas da raça holandesa (P=0,0092).

Nas pastagens, a multiplicação e a permanência das algas do gênero *Prototheca* é favorecida pela presença de matéria orgânica e elevada

umidade. Estudo amplo realizado por PORE et al. (1983), que abrangeu diversas propriedades localizadas nos EUA, nas Filipinas e no Haiti, mostrou a distribuição ubiqüitária das algas no meio ambiente. Os autores isolaram *P. zopfii* e *P. wickerhamii* de amostras de solo de pasto, água de lagos, rios, córregos e esgoto. Relatos subseqüentes de isolamento de *P. zopfii* na pastagem, na água e em dejetos próximos à sala de ordenha evidenciaram o caráter ambiental dessa infecção (ANDERSON & WALKER, 1988; COSTA et al., 1997).

A criação de suínos próxima à propriedade leiteira pode favorecer a disseminação de *P. zopfii* através da adubação das pastagens com esterco suíno. A presença de cães, gatos e roedores pode disseminar na propriedade a *P. zopfii* pelas fezes contaminadas, já que estas passam livremente através do trato digestivo (KIRK, 1991; COSTA et al., 2000b). PORE & SHAHAN (1988) observaram que a utilização de esterco como adubo, no pasto e na lavoura, pode contaminar o solo onde permanecem as vacas em lactação. Segundo ANDERSON & WALKER (1988), a ocorrência de mastite causada por *P. zopfii* pode ser mais elevada em rebanhos mantidos em sistema de confinamento total e em piquetes, sem acesso ao pasto, mas com presença de lama e fezes. PORE et al. (1983) e COSTA et al. (1997) verificaram que as principais fontes de disseminação para *P. zopfii* nas propriedades leiteiras são bezerros, suínos, roedores, cães, gatos e vacas em lactação.

Neste trabalho, a ordenha mecânica em estábulo esteve associada com a maior disseminação da prototecose. Normalmente, o manejo e a higiene da ordenha, sob essas condições, são dificultados pela contaminação do piso e do equipamento de ordenha com fezes das vacas. COSTA et al. (1997) observaram que, em propriedades com casos de mastite por *P. zopfii*, a alga foi isolada com maior frequência no equipamento de ordenha e no ambiente das instalações. A permanência das vacas, após a ordenha, no piquete, sem fornecimento de alimento, pode favorecer a infecção por *P. zopfii*. O fechamento completo do esfíncter dos tetos não ocorre imediatamente após a ordenha, o que favorece a entrada de microrganismos no úbere. COSTA et al. (1996a; 1998) observaram uma elevada ocorrência de mastite causada por *P. zopfii* em rebanhos que não foram alimentados imediatamente após a ordenha. Segundo os autores, a oferta de alimentos no cocho, após a ordenha, estimula as vacas a se manterem em estação, favorecendo o fechamento do esfíncter do teto.

A eficácia do *pre* e *post-dipping* pode ser influenciada pelo tipo de anti-séptico, pela presença de matéria orgânica, pela falta de reposição do produto e pelo tipo de aplicador utilizado. Segundo COSTA et

al. (1996a), o *pre-dipping* pode prevenir a contaminação do equipamento de ordenha por microrganismos de origem ambiental encontrados na superfície do teto e o *post-dipping*, de microrganismos adquiridos durante o processo de ordenha. Os autores observaram, ainda, que a eficácia de anti-sépticos, como o iodo, é influenciada pela presença de matéria orgânica, como fezes e leite, incorporados ao produto pela limpeza incorreta dos tetos. Este fato pôde ser observado neste trabalho, no qual a não-higienização dos tetos com água antes da ordenha e a utilização de aplicador com retorno do anti-séptico estariam associados à maior ocorrência da infecção.

A alimentação de bezerros com leite obtido de vacas com infecções intramamárias pode contribuir para a ocorrência de novas infecções. De acordo com COSTA et al. (2000b), bezerros alimentados com leite de vacas com mastite por *Prototheca* spp. podem disseminar o agente, por meio de eliminação fecal, e, portanto, aumentar a contaminação do meio ambiente. No presente trabalho, nas propriedades onde este manejo foi adotado, *P. zopfii* foi isolada de amostras dos *swabs* retais dos bezerros. Por outro lado, nas propriedades onde esta alga não foi isolada de casos de mastite, também não se isolou *P. zopfii* das amostras de fezes dos bezerros lactentes. Esta prática comumente adotada nas propriedades de exploração leiteira brasileiras foi considerada imprópria para alimentar bezerros (COSTA et al., 2000b).

A associação estatística foi positiva para as variáveis normalmente indicadas para a prevenção de mastite, tais como: armazenamento do leite em tanque de expansão ( $P=0,0375$ ;  $OR=0,20$ ;  $IC95\%=0,03-0,94$ ), higienização do equipamento com água quente ( $P=0,0162$ ;  $OR=3,70$ ;  $IC95\%=1,21-12,08$ ), utilização de detergente alcalino e ácido ( $P=0,0001$ ), emprego de *pre-dipping* ( $P=0,0018$ ;  $OR=6,52$ ;  $IC95\%=1,74-28,83$ ), diagnóstico laboratorial e antibiograma ( $P=0,0001$ ;  $OR=9,68$ ;  $2,58-42,85$ ) e utilização de vacina contra mastite ( $P=0,0001$ ;  $OR=12,64$ ;  $IC95\%=3,31-56,87$ ). Apesar de terem sido estatisticamente positivas, essas variáveis fazem parte das práticas de manejo de ordenha normalmente realizadas em propriedades mais tecnificadas e com animais mais produtivos, por isso mais suscetíveis às infecções intramamárias. Esse fato ficou evidente nesta pesquisa, uma vez que propriedades com rebanho da raça holandesa apresentaram o maior número de casos de mastite por *P. zopfii*.

LESCOURRET et al. (1995) observaram que as práticas de manejo, entre elas a higiene de ordenha, quando aplicadas inadequadamente, são consideradas fatores de risco na ocorrência da mastite ambiental. Entretanto, os mesmos autores verificaram que a anti-

sepsia dos tetos estava associada a um aumento do número de casos de mastite clínica, provavelmente porque propriedades com esta propensão façam uso do *pre-dipping* de maneira inadequada.

A realização de exames laboratoriais e antibiograma é prática de manejo desejável, mas normalmente é realizada em propriedades com elevada ocorrência de mastite. A mastite por *Prototheca* spp. é de difícil tratamento pela resistência à maioria dos antimicrobianos tanto *in vitro* quanto *in vivo*, sendo recomendada a segregação e/ou o descarte de animais acometidos como medida de controle eficaz (KIRK, 1991). Além disso, como o diagnóstico pode apresentar dificuldades na identificação das algas do gênero *Prototheca*, frequentemente, vacas acometidas por infecções intramamárias subclínicas com resultado microbiológico negativo não são medicadas e podem disseminar o agente para outros animais do rebanho, principalmente durante a ordenha (COSTA et al., 1996b). COSTA et al. (1993) observaram que animais com mastite crônica, submetidos à terapia antibacteriana excessiva e repetida, são mais suscetíveis às infecções fúngicas ou mistas. Neste estudo, todas as vacas com mastite por *P. zopfii* foram submetidas a terapias anteriores.

Nesta pesquisa, o emprego de vacinas para a prevenção de mastite foi considerado fator não-causal. As propriedades leiteiras utilizavam a vacina J5, destinada à prevenção de mastites ambientais de origem bacteriana, principalmente de enterobactérias, considerando-se que essas propriedades habitualmente têm sérios problemas com infecções intramamárias de origem ambiental.

## CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho permitem concluir-se que, nas propriedades estudadas, tanto o ambiente quanto as fezes de outras espécies animais, provavelmente, sejam importantes vias de transmissão de *Prototheca* spp. para as vacas leiteiras.

Os principais fatores de risco associados à mastite por *P. zopfii* encontrados neste trabalho foram: criação das vacas a pasto, alimentação dos animais com pasto e silagem, realização de ordenha mecânica em estábulo, permanência das vacas após a ordenha em piquete sem alimento, criação de suínos próxima às instalações dos bovinos, existência de cães, gatos e roedores na propriedade, falta de higienização dos tetos com água, pré-imersão dos tetos em aplicador com retorno e não efetuação da troca do anti-séptico, alimentação dos bezerros com leite de vacas com mastite clínica e serem as vacas da raça holandesa.

## REFERÊNCIAS

- AALBAEK, B. et al. Mycotic and algal bovine mastitis in Denmark. **Acta of Pathology Microbiology and Immunology Scandinavian**, v.102, p.451-456, 1994.
- ANDERSON, K.L.; WALKER, R.L. Sources of *Prototheca* spp in a dairy herd environment. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.193, n.5, p.553-556, 1988.
- BENITES, N.R. et al. Estudo de microscopia eletrônica de *Prototheca zopfii* e avaliação histopatológica de glândulas mamárias por ela infectadas. **Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira**, ano II, n.1, p.22-26, 1999.
- BUENO, V.F.F. et al. Epidemiological and clinical aspects of the first outbreak of bovine mastitis caused by *Prototheca zopfii* in Goiás State, Brazil. **Mycopathologia**, v.161, v.3, p.141-145, 2006.
- CAMARGO, Z.P. de; FISCHMAN, O. Use of morphophysiological characteristics for differentiation of the species of *Prototheca*. **Sabouraudia**, v.17, p.275-278, 1979.
- CAMARGO, Z.P. de; FISCHMAN, O. Isolation of *Prototheca* from water samples from southern Brazil. **Rickia**, v.9, p.55-59, 1981.
- 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, E.O. et al. Estudo etiológico da mastite clínica bovina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.17, n.4, p.156-158, 1995.
- COSTA, E.O. et al. An increased incidence of mastitis caused by *Prototheca* species and *Nocardia* species on a farm in São Paulo, Brazil. **Veterinary Research Communications**, v.20, p.237-241, 1996a.
- COSTA, E.O. et al. Bovine mastitis due to algae of the genus *Prototheca* sp. **Mycopathologia**, v.133, p.85-88, 1996b.
- COSTA, E.O. et al. Epidemiologic study of environmental sources in a *Prototheca zopfii* outbreak of bovine mastitis. **Mycopathologia**, v.137, p.33-36, 1997.
- COSTA, E.O. et al. Infectious bovine mastitis caused by environmental organisms. **Journal of Veterinary Medicine**, v.45, p.65-71, 1998.
- COSTA, E.O. et al. Estudo da etiologia das mastites bovinas nas sete principais bacias leiteiras do Estado de São Paulo. **Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira**, ano III, n.4, p.6-13, 2000a.
- COSTA, E.O. et al. Pesquisa de *Prototheca* sp em fezes de bezerros em propriedades que utilizam o leite de animais com mastite no manejo alimentar dos mesmos em comparação com as que não utilizam. **Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira**, ano III, n.1, p.20-22, 2000b.
- DEAN, G.A. et al. **Epi Info, Version 6: a word processing, database, and statistic program for epidemiology on microcomputers**. Atlanta: Center of Diseases Control and Prevention, 1994. [CD-ROM].
- FILLIPSEN; L.F. et al. Prevalência da mastite bovina causada por *Prototheca zopfii* em rebanhos leiteiros, na região Norte do Estado do Paraná. **Ciência Rural**, v.29, n.1, p.87-89, 1999.
- HARMON, R.J. et al. **Microbiologic procedures for diagnosis of bovine udder infection**. Arlington, VA.: National Mastitis Council, 1990. 34p.
- JÁNOSI, S. et al. *Prototheca zopfii* mastitis in dairy herds under continental climatic conditions. **Veterinary Quarterly**, v.23, n.2, p.80-83, 2001.
- KIRK, J.H. Diagnosis and treatment of difficult mastitis cases. **Agri-Practice**, v.12, n.2, p.15-18, 1991.
- KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 9ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. 1268p.
- LERCHE, M. Eine durch Algen (*Prototheca*) hervorgerufene Mastites der Kuh. **Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift**, v.65, p.64-69, 1952.
- LESCOURRET, F. et al. Predictive model of mastitis occurrence in the dairy cow. **Journal of Dairy Science**, v.78, p.2167-2177, 1995.
- PORE, R.S. et al. *Prototheca* ecology. **Mycopathologia**, v.81, p.49-62, 1983.
- PORE, R.S. et al. Occurrence of *Prototheca zopfii*, a mastitis pathogen, in milk. **Veterinary Microbiology**, v.15, p.315-323, 1987.
- PORE, R.S.; SHAHAN, T.A. *Prototheca zopfii*: natural, transient, occurrence in pigs and rats. **Mycopathologia**, v.101, p.85-88, 1988.
- SCHALM, O.W.; NOORLANDER, D.O. Experimental observation leading to development of California Mastitis Test. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.139, p.199-204, 1957.
- TENHAGEN, B.A. et al. Shedding patterns and somatic cell counts in milk from quarters chronically infected with *Prototheca* spp. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v.112, n.2, p.44-48, 2005.
- VAZ, A.K. et al. Mastite bovina por *Prototheca* spp. em Santa Catarina: relato de caso. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.4, n.1, p.72-75, 2005.