



## LEVEDURAS EM CASOS DE MASTITE BOVINA SUBCLÍNICA NO SUL DO RIO GRANDE DO SUL

*Yeasts in cases of subclinical bovine mastitis in the south of Rio Grande do Sul*

**Pedro Rassier dos SANTOS<sup>1\*</sup>, Carolina Lambrecht GONÇALVES<sup>2</sup>, Giniani Carla DORS<sup>3</sup>, Helenice de Lima GONZALEZ<sup>4</sup>, Patrícia da Silva NASCENTE<sup>5</sup>**

**RESUMO:** Alguns alimentos como o leite tem um importante papel na dieta humana, pois fornece uma série de nutrientes essenciais. A contaminação do leite por micro-organismos indesejáveis, como os fungos, pode causar alterações físico-químicas no mesmo, limitando sua durabilidade e de seus derivados, além de determinar problemas econômicos e de saúde pública. As leveduras são os agentes fúngicos mais frequentemente relacionados às infecções da glândula mamária em bovinos de leite. Para realização deste trabalho, foram coletadas 640 amostras de leite, oriundas dos quartos mamários de vacas em lactação que apresentaram resultado positivo ao Califórnia Mastitis Test (CMT). Previamente foi realizada a desinfecção do teto com algodão embebido em álcool 70°GL e posteriormente retirou-se as amostras de aproximadamente 10 mL de leite que foram encaminhadas para o Laboratório de Micologia, no Instituto de Biologia da UFPel, semeadas em placas de Petri contendo Ágar Sabouraud Dextrose adicionado de Cloranfenicol e armazenadas na estufa por 7 dias a 36 °C. Nas amostras em que houve crescimento leveduriforme, fez-se a identificação através do Sistema Vitek 2. Foram identificados: *Cryptococcus laurentii*, *Candida famata* e *Candida parapsilosis*.

**Palavras-chave:** Infecção intramamária; fungos; *Candida*; *Cryptococcus*.

**ABSTRACT:** Some foods such as milk plays an important role in the human diet, because it provides a number of essential nutrients. The contamination of milk by undesirable micro-organisms such as fungi, can cause physical and chemical changes in it, limiting its durability and its derivatives, as well as determining economic and public health problems. Yeasts are the etiologic agents most often related to infections of the mammary gland in dairy cattle. For this work, they collected 640 milk samples coming from the mammary glands of lactating cows that showed positive result to the California Mastitis Test (CMT). It was previously held disinfecting ceiling swab 70°GL alcohol, samples were gathered, about 10 ml of milk and these were referred to Mycology Laboratory in UFPel Institute of Biology and seeded in Petri plates containing Sabouraud Dextrose Agar Chloramphenicol added and stored in the greenhouse for 7 days at 36 °C. In the samples in which there was yeast growth, made the identification using the Vitek 2 system. The following were identified: *Cryptococcus laurentii*, *Candida famata* and *Candida parapsilosis*.

**Key words:** Intramammary infection; fungi; *Candida*; *Cryptococcus*.

\*Autor para correspondência

Recebido para publicação em 20/04/2021, aprovado em 05/06/2021

<sup>1</sup>Mestre, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas; (51)997232388, rassier1907@gmail.com.

<sup>2</sup>Doutora, Universidade Federal de Pelotas, carolina\_lamg@yahoo.com.br

<sup>3</sup>Doutora, Universidade Federal de Pelotas, dorsgi@yahoo.com.br

<sup>4</sup>Doutora, Universidade Federal de Pelotas, helenicegonzalez@hotmail.com

<sup>5</sup>Doutora, Universidade Federal de Pelotas, pattsn@gmail.com

## INTRODUÇÃO

Uma vida saudável requer uma dieta balanceada, e a ingestão adequada de nutrientes é fundamental, estando diretamente relacionada com o bom funcionamento do organismo (MENDONÇA et al., 1999). Alguns alimentos possuem um importante papel na dieta humana, como o leite, que possui grande quantidade de nutrientes essenciais ao crescimento e a manutenção de uma vida saudável, como proteínas, carboidratos, gordura, vitaminas, sais minerais e fibras (PINTO, et al., 2006).

A produção leiteira envolve cerca de 150 milhões de lares em todo o mundo e é caracterizada por ser uma atividade de retorno financeiro rápido para os pequenos produtores (FAO, 2016). No Brasil, o crescimento da produção leiteira é constante desde 1974, entretanto, houve uma queda por dois anos consecutivos a partir de 2015, fato até então inédito desde o início da série histórica publicada pelo IBGE. Após esses dois anos de queda, o Brasil voltou a registrar crescimento na produção, com 33,5 bilhões de litros de leite (IBGE, 2019).

Dados do primeiro trimestre de 2020 apontam para a continuação desse crescimento, como por exemplo em relação a aquisição de leite cru feita pelos estabelecimentos que atuam sob algum tipo de inspeção sanitária, que foi de 6,30 bilhões de litros, o que corresponde a um aumento de 1,4% em comparação ao volume registrado no primeiro trimestre de 2019 (IBGE, 2020). Embora o país tenha avançado em produtividade, somente uma pequena parcela dos produtores atende aos critérios de qualidade exigidos pelo mercado (LIMA et al., 2020).

Por seu alto teor nutritivo, o leite e os produtos lácteos são excelentes meios para o desenvolvimento de leveduras e outros micro-organismos (NAMVAR et al., 2019), exigindo cuidados em sua produção desde a ordenha até o processamento e armazenamento (GUIMARÃES et al., 2009), visto que a qualidade do leite está associada a carga microbiana inicial presente no produto. Quanto maior o número de contaminantes e a temperatura de estocagem, menor será o tempo de conservação do produto (PINTO et al., 2006).

Entre os problemas relacionados a produção leiteira no Brasil, está a contaminação microbiológica do leite, influenciando diretamente na queda de sua qualidade. (CARVALHO et al., 2018; LAMPUGNANI et al., 2018; NOEL et al., 2016). Entre as principais causas, estão as inadequadas condições de higiene de ordenha e procedimentos inadequados de limpeza dos utensílios e equipamentos (DIAS et al., 2020).

Outro problema relacionado com aumento da carga microbiana no leite e que consequentemente leva a alterações nas características do produto é a mastite, uma inflamação da glândula mamária que ocorre em decorrência da contaminação por bactérias patogênicas, vírus, fungos e algas, além de traumas provocados por agentes químicos, físicos, mecânicos, térmicos ou por problemas metabólicos (ACOSTA et al., 2016; HUSSEIN et al., 2018; KIBEBEW, 2017).

A mastite pode ser dividida em dois tipos: clínica ou subclínica. A mastite subclínica possui incidência muito maior em um rebanho leiteiro comparada a clínica. Entretanto, pode passar despercebida em muitos dos casos, pois diferente da mastite clínica, não há sinais visíveis a olho nu (HOSSAIN et al., 2017; SHAHEEN et al., 2016). Para confirmação da

mastite subclínica são utilizados diversos testes, sendo que um dos mais utilizados é a Contagem de Células Somáticas (CCS) pelo California Mastitis Test (CMT), por se tratar de um teste de baixo custo e fácil aplicação em rebanhos leiteiros (ROSSI et al., 2018).

Com relação a mastite causada por micro-organismos, as bactérias são as mais frequentes (DAMASCENO et al., 2020; SHAHEEN et al., 2016; SONG et al., 2020). Entretanto, mastites micóticas vêm sendo mais relatadas recentemente (AL-ABEDI et al., 2020; JASMMOHAMMED et al., 2020; YANUARTONO et al., 2019).

Vários aspectos influenciam o aparecimento de mastite causada por fungos, entre eles o mau funcionamento e manejo inadequado do sistema de ordenha, a falta de higiene e a limpeza das instalações e dos equipamentos, além do uso prolongado de terapia antimicrobiana por via intramamária (RUZ-PEREZ et al., 2004). Dentro dos fungos, as leveduras são os mais frequentemente relacionados às infecções da glândula mamária em bovinos de leite, sendo que a mastite por fungos filamentosos também pode ocorrer (AKDOUCHE et al., 2018; ULSENHEIMER et al., 2018).

Diversos gêneros de leveduras podem estar envolvidos na mastite micótica, como *Candida*, *Cryptococcus*, *Geotrichum*, *Pichia* e *Trichosporon*, sendo que os dois primeiros gêneros se destacam entre os demais (KRUKOWSKI et al., 2001; SPANAMBERG et al., 2009; AKDOUCHE; AISSI; SAADI, 2018). A diferenciação entre mastites micótica e bacteriana é clinicamente difícil, entretanto, o uso de antibióticos por tempo prolongado e a falta de sucesso no tratamento podem ser indicativos de mastite causada por fungos (SPANAMBERG et al., 2009).

Sabendo da importância da contaminação do leite por micro-organismos e da escassez de conhecimentos sobre mastite micótica em relação a mastite bacteriana, o objetivo desse trabalho foi pesquisar a presença e identificar fungos a partir de 640 amostras de leite oriundos de quartos mamários de vacas com mastite subclínica, confirmadas com resultado positivo ao *California Mastitis Test* (CMT), de 21 propriedades localizadas no sul do Rio Grande do Sul.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram acompanhadas ordenhas bovinas em 21 propriedades leiteiras no Sul do Rio Grande do Sul no período de um ano. Para o diagnóstico da mastite subclínica foi aplicado o *California Mastitis Test* (CMT), em todas as vacas em lactação, onde a classificação é dada conforme a intensidade da reação formada: leve (+), moderada (++) e intensa (+++) (FONSECA & SANTOS, 2000).

Para as vacas que apresentaram resultado positivo ao CMT, fez-se a desinfecção do orifício do teto com algodão embebido em álcool 70%GL e após identificação, retirou-se uma amostra de leite de aproximadamente 10 ml. As amostras foram acondicionadas e levadas para o Laboratório de Micologia, no Instituto de Biologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Pelotas.

No laboratório, foram semeadas em placas de Petri contendo Ágar Sabouraud Dextrose adicionado de

Cloranfenicol e, posteriormente, armazenadas na estufa por sete dias a 36 °C.

Após esse período, as placas que apresentaram crescimento de micro-organismos, foram selecionadas e das colônias isoladas foi realizada coloração de Gram para diferenciação de crescimento bacteriano. Aquelas que foram identificadas como blastoconídios foram repicadas e encaminhadas para a identificação através do sistema automatizado de identificação bioquímica Vitek 2®.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 640 amostras coletadas em vacas com mastite subclínica de 21 propriedades do sul do RS, apenas 14 (2,18%) apresentaram isolamento de leveduras.

Em um estudo semelhante, KSOURI et al. (2015) avaliaram 1.121 amostras de leite de dez propriedades diferentes, sendo que 321 foram coletadas de mastite clínica, 544 amostras de mastite subclínica e 256 de amostras de leite de glândulas mamárias saudáveis. As análises micológicas revelaram a presença fúngica em 10,17% das amostras.

Já Al-abedi et al., (2020), realizaram um estudo com o intuito de avaliar a presença *Candida*, principalmente *C. parapsilosis* em 250 amostras de leite, coletados de leite bovino após confirmação pelo CMT e foi observada uma alta frequência, com 116 isolados de *Candida* spp. (46,4%), e destas, 15 (12,9%) foram identificadas como *C. parapsilosis*.

Jasm Mohammed et al., (2020) avaliaram a prevalência de fungos, onde também o foco principal do trabalho era *Candida* spp. em casos de mastite subclínica bovina, e dentro do gênero *Candida*, principalmente a espécie *C. albicans*. Foram coletadas 100 amostras de leite e destas, obtiveram 63 isolados fúngicos, sendo que 15 (23,8%) foram *Candida* spp., e destes, cinco foram *C. albicans*.

A mastite micótica, por ser menos frequente e, conseqüentemente, menos pesquisada que a mastite bacteriana, apresenta poucos estudos de frequência, entretanto, alguns destes relatam uma alta frequência de leveduras, como os dados apresentados anteriormente nos estudos realizados por Al-abedi et al., (2020) e Jasm Mohammed et al., (2020).

No nosso estudo, os gêneros identificados a partir do Sistema Vitek 2®, foram: *Cryptococcus* sp. e *Candida* spp.. As espécies possíveis de serem identificadas foram *Cryptococcus laurentii*, *Candida famata*, *Candida parapsilosis*, entretanto as demais espécies não foram passíveis de identificação e enquadradas apenas em gênero *Candida* spp. O Sistema Vitek 2® está direcionado para amostras clínicas de origem humana e algumas espécies destes gêneros com origem animal não são por ele identificadas. A identificação de *Candida* realizada por Jasm Mohammed et al., (2020) foi através de técnicas convencionais como teste de produção de tubo germinativo, produção de clamidósporos, produção de urease e ágar CHROM. Além disso, utilizou-se o sistema Rapid: API 20 e sistema Vitek 2, sendo este último o mesmo método do nosso trabalho.

Os gêneros *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp. e encontrados no nosso estudo estão de acordo com a literatura, onde os dois gêneros mais relacionados a mastite micótica bovina são os encontrados neste estudo (KRUKOWSKI et al., 2001; SPANAMBERG et al., 2009; AKDOUCHE; AISSI; SAADI, 2018; WUNDER JÚNIOR, 2007; AKDOUCHE; AISSI; SAADI, 2018).

As duas espécies de *Candida* identificadas no presente trabalho merecem atenção, visto que estão entre as espécies mais frequentemente isoladas e relacionadas a doenças humanas, sendo elas: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. (ELDESOUKY et al., 2016). São consideradas micro-organismos oportunistas, já que fazem parte da microbiota de pessoas saudáveis humanos e animais, além de serem patógenos emergentes, responsáveis por infecções nosocomiais de difícil tratamento (ZARAGOZA et al., 2012; SEYEDMOJTABA et al., 2018; NAMVR et al., 2019).

Com relação a espécie *Cryptococcus laurentii*, esta também foi identificada em um estudo realizado por Spanamberg et al., (2008) quando em 28 fazendas, foram coletadas 248 amostras de leite, sendo 54 de vacas com mastite clínica e 194 de vacas com mastite subclínica. Como resultados, 43 (22,1%) das amostras de leite obtidas de mastite subclínica apresentaram crescimento fúngico, sendo que destas, foi possível isolar um total de 68 espécies: oito amostras foram do gênero *Cryptococcus*, sendo duas, *Cryptococcus laurentii*, além de *Candida* (37,9%), *Pichia* (19,1%), *Rhodotorula* (10,3%), *Geotrichum* (5,8%), *Debaryomyces* (5,8%), *Trichosporon* (4,4%) e o restante (1,4%) correspondeu a *Kluyveromyces*, *Galactomyces* e *Rhodospidium*.

## CONCLUSÕES

1. A partir das amostras de leite bovino com mastite subclínica, isolou-se *Cryptococcus laurentii*, *Candida famata* e *Candida parapsilosis*.
2. Considera-se, com isso, a importância da identificação fúngica, não só por conhecimento de espécies emergentes como patógenos na área humana e animal, mas também por ser decisiva no momento no melhor direcionamento do tratamento.

## REFERÊNCIAS

- ACOSTA, A. C. et al. Mastites em ruminantes no Brasil. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 36, n. 7, p. 565-573, 2016.
- AL-ABEDI, Hawraa FH; AL-ATTRAQCHI, Azhar AF; KHUDAIE, Bassam Y. Investigation of the Hydrolytic Enzyme Activities of *Candida parapsilosis* Isolated From Milk Samples of Bovine Mastitis by API ZYM and Molecular Method. Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology, v. 14, n. 3, p. 2343-2349, 2020.
- CARVALHO, Aparecida Selsiane Sousa et al. Susceptibilidade de *Staphylococcus aureus* isolados de leite cru a antibióticos comerciais. Ciência Animal Brasileira, v. 19, 2018.
- DAMASCENO, Vanessa Souza et al. Análise do perfil microbiológico de agentes causadores de mastite bovina e sua relação com a qualidade do leite em uma fazenda do Sul de Minas Gerais. Brazilian Journal of Development, v. 6, n. 11, p. 91409-91421, 2020.

- DIAS, Juliana Alves; BELOTI, Vanerli; DE OLIVEIRA, Audenice Miranda. Ordenha e boas práticas de produção. Embrapa Rondônia-Capítulo em livro técnico (INFOTECA-E), 2020.
- ELDESOUKY, Ibrahim et al. *Candida* mastitis in dairy cattle with molecular detection of *Candida albicans*. Kafkas Univ Vet Fak Derg, v. 22, n. 3, p. 461-464, 2016.
- FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. Qualidade do Leite e Controle de Mastite. São Paulo: Lemos Editorial. 175p. 2000.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Dairy Production and Products – Milk Production. Disponível em <<http://www.fao.org/dairy-production-products/en/#.V3AZwbgrLIV>>em Acesso em 6 jan. 2021
- GUIMARÃES, F.F.; LANGONI, H. Leite: Alimento imprescindível, mas com riscos para saúde pública. Vet e Zootec 16(1): 38-51, 2009.
- HAHEEN, M.; TANTARY, H. A.; NABI, S. U. A treatise on bovine mastitis: disease and disease economics, etiological basis, risk factors, impact on human health, therapeutic management, prevention and control strategy. Advances in Dairy Research, p. 1-10, 2016.
- HOSSAIN, M. K. et al. Bovine mastitis and its therapeutic strategy doing antibiotic sensitivity test. Austin J Vet Sci Anim Husb, v. 4, n. 1, p. 1030, 2017.
- HUSSEIN, Hany Ahmed et al. Milk amyloid A as a biomarker for diagnosis of subclinical mastitis in cattle. Veterinary world, v. 11, n. 1, p. 34, 2018.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística Indicadores) (2019) Estatística da produção pecuária, Disponível em: <[https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2380/ep\\_p\\_2019\\_3tri.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2380/ep_p_2019_3tri.pdf)> Acesso em 12 jan. 2021.
- IBGE, IBGE Indicadores. Estatística da produção pecuária. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2020.
- JASMMOHAMMED, Sudad; YASSEIN, Shaimaa Nabhan. Characterization of some virulence factors of *Candida albicans* isolated from subclinical bovine mastitis. Plant Archives, v. 20, n. 1, p. 238-242, 2020.
- KIBEBEW, Kinf. Bovine mastitis: A review of causes and epidemiological point of view. J Biol Agric Healthc, v. 7, n. 2, p. 1-14, 2017.
- KRUKOWSKI, Henryk et al. Survey of yeast mastitis in dairy herds of small-type farms in the Lublin region, Poland. Mycopathologia, v. 150, n. 1, p. 5-7, 2001.
- KSOURI, Samir et al. Survey of bovine mycotic mastitis in different mammary gland statuses in two north-eastern regions of Algeria. Mycopathologia, v. 179, n. 3-4, p. 327-331, 2015.
- LAMPUGNANI, Camila et al. Qualidade do leite cru refrigerado e características da produção leiteira na mesorregião oeste paranaense, Brasil. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, v. 73, n. 1, p. 19-26, 2018.
- LIMA, Eduardo de Assis et al. Influence of filamentous fungi and yeasts on bacterial count and somatic cells in samples of raw bovine milk. Research, Society and Development, v. 9, n. 7, p. 304974135, 2020.
- MENDONÇA, C.L.; FIORAVANT, M.C.S.; SILVA, J.A. Etiologia da mastite bovina. Veterinária Notícias 5(1):107-118, 1999.
- NAMVAR, Zahra et al. Antifungal susceptibility of non-albicans *Candida* spp. isolated from raw milk and human blood in Alborz and Tehran provinces. Iranian Journal of Microbiology, v. 11, n. 6, p. 520, 2019.
- NOEL, Caroline da Costa et al. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana e produção de “slime” de isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de casos de mastite bovina na região sul-fluminense. Revista de Saúde, v. 7, n. 1, p. 22-26, 2016.
- PINTO, C.L.O.; MARTINS, M.L.; VANETTI, M.C.D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicotróficas proteolíticas. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 26(3): 645-651, jul.-set. 2006.
- ROSSI, R. S. et al. Diagnostic accuracy of Somaticell, California Mastitis Test, and microbiological examination of composite milk to detect *Streptococcus agalactiae* intramammary infections. Journal of dairy science, v. 101, n. 11, p. 10220-10229, 2018.
- 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.
- SEYEDMOUSAVI, Seyedmojtaba et al. Fungal infections in animals: a patchwork of different situations. Medical mycology, v. 56, n. suppl\_1, p. S165-S187, 2018.
- SONG, Xiangbin et al. The prevalence of pathogens causing bovine mastitis and their associated risk factors in 15 large dairy farms in China: An observational study. Veterinary Microbiology, v. 247, p. 108757, 2020.
- SPANAMBERG, Andréia et al. Diversity of yeasts from bovine mastitis in Southern Brazil. Revista iberoamericana de micologia, v. 25, n. 3, p. 154, 2008.
- SPANAMBERG, Andréia et al. Mastite micótica em ruminantes causada por leveduras. Ciência Rural, v. 39, n. 1, p. 282-290, 2009.
- YANUARTONO, Yanuartono et al. Mycotic Mastitis in Ruminants. Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan, v. 29, n. 2, p. 109-130, 2019.

ZARAGOZA, Carolina Segundo et al. Yeasts isolation from bovine mammary glands under different mastitis status in the

Mexican High Plateau. Revista iberoamericana de micologia, v. 28, n. 2, p. 79-82, 2011.