

TRATAMENTO DE MASTITE EM OVINO CAUSADA POR *Prototheca* sp. ATRAVÉS DO OZÔNIO: RELATO DE CASO.

Humberto Cáfaro Filho*, Tiago Fávero Moda*, Carlos José de Lima*, Adriana Barrinha Fernandes*, Renato Amaro Zângaro*, Dora Inês Kozusny-Andreani*, Livia Helena Moreira*

*Instituto de Engenharia Biomédica, Unicastelo, Parque Tecnológico de São José dos Campos, Estrada Doutor Altino Bondesan, 500 Distrito Eugênio de Melo, São José dos Campos, CEP: 12247- 016 e Associação Cidade da Ciência Tecnologia e Educação – CITÉ, Rua Machado Sidney, 160/601, Centro - CEP 12245-650, São José dos Campos – SP, Brasil.

e-mail: lhsil@uol.com.br

Resumo: Protothecose é uma doença emergente que infecta os homens e animais, seu agente etiológico é a alga *Prototheca* sp. de distribuição mundial. É um micro-organismo muito resistente ao tratamento por antibióticos, e a eliminação dos animais infectados ainda é a melhor forma do controle da doença. A mastite causada por *Prototheca* sp. já foi identificada em bovinos e recentemente em caprinos, mas não há relatos na literatura de casos em búfalos, ovinos e equinos. Neste estudo, descrevemos o isolamento de *Prototheca* sp. em amostras de leite proveniente de uma ovelha com mastite clínica, no município de Fernandópolis/SP. Através da técnica de ozonioterapia foi feita uma única aplicação da mistura gasosa O₂/O₃ diretamente no teto do animal infectado na concentração de 66 mg/L no volume de 180 mL; amostras de leite foram colhidas com intervalo de antes, 12h, 24h, 48h e 72h após o tratamento e enviadas para o laboratório. Não foram mais observados isolados de *Prototheca* sp. nas amostras de leite deste animal, portanto, o tratamento *in vivo* foi capaz de eliminar a *Prototheca* sp. do teto infectado. Trata-se do primeiro relato de mastite por este agente em ovinos e o primeiro relato de caso de cura de mastite causada por *Prototheca* sp. utilizando o ozônio.
Palavras-chave: *Prototheca* sp., Mastite, Ovino, Ozônio.

Abstract: *Protothecosis* is an emerging disease which infects humans and animals, its etiologic agent is the algae *Prototheca* sp. of worldwide distribution. It is a microorganism very resistant to treatment through antibiotics, and the elimination of the infected animals is still the best form to control the disease. Mastitis caused by *Prototheca* sp. has already been identified in cattle and recently in goats, however there are no reports in literature of cases in buffaloes, sheep and horses. In this study, we describe the isolation of *Prototheca* sp. in milk samples from a sheep with clinical mastitis in the city of Fernandópolis. Through the technique of ozone therapy, a single application directly was made on the udder of the infected animal at the concentration of ozone-oxygen gas mixture of 66mg/L with volume of 180 mL, milk samples were

collected at 12, 24 and 48 hours after application and sent to the laboratory. It was no longer observed isolated of *Prototheca* sp. in the samples of this animal, therefore, the *in vivo* treatment was able to eliminate *Prototheca* sp. from the infected udder. This is the first report of mastitis in sheep caused by this agent and the first case report of healing of mastitis caused by *Prototheca* sp. using ozone.

Keywords: *Prototheca* sp., Mastitis, Sheep, Ozone.

Introdução

Prototheca spp. são algas aclorofiladas, unicelulares da família Chlorellaceae encontradas em praticamente todo o planeta. Sua ocorrência é mais frequente em locais úmidos, ricos em matéria orgânica, tais como, lama, esterco, mas também foram encontradas na água do mar, lagos, rios, seiva de árvores, infectando a espécie humana e outras espécies de animais, como cães, gatos, suínos, roedores e bovinos [1].

Em bovinos há relatos de casos de mastite causada por *Prototheca* sp. em diversos continentes; no Brasil, os relatos se concentram nos estados de Mato Grosso do Sul, São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Pernambuco e Rio Grande do Sul [2]. As condições inadequadas de manejo e higiene estão relacionadas às propriedades epidêmicas [3,4], a manutenção dos animais em ambiente barrentos assim como a má higienização dos tetos na pré-ordenha, normalmente estão relacionados com a presença deste agente causando a mastite bovina [1].

A resistência ao tratamento com antibióticos e antifúngicos usuais é uma das características desta alga, o controle mais indicado é a eliminação do bovino infectado, evitando que este torne-se um reservatório do agente, e em casos do animal possuir um alto valor genético a eliminação do teto infectado através da cauterização se justificaria evitando assim a disseminação da doença no rebanho [3,4].

O uso do gás ozônio surgiu como uma alternativa de tratamento da mastite bovina e é uma forma alotrópica do oxigênio de fórmula química O₃ que inativa fungos, vírus, bactérias, leveduras e protozoários [5].

Pesquisadores ao estudarem a eficácia do ozônio, na forma de gás, no tratamento intramamário de mastite clínica em bovino por *Prototheca* sp., concluíram que mesmo fazendo três aplicações da mistura gasosa oxigênio/ozônio não foi capaz de eliminar a *Prototheca* sp. do teto tratado nas concentrações utilizadas, confirmando que a alga é extremamente resistente aos tratamentos *in vivo* [2]. Este trabalho teve o objetivo de relatar o primeiro caso de mastite em ovino pela alga *Prototheca* sp. com o primeiro relato de cura após o tratamento utilizando a ozonioterapia.

Material e métodos

Numa propriedade rural localizada no município de Fernandópolis/SP, com a finalidade de produção de ovinos para corte, destaca-se pela alta incidência de mastite clínica no momento do desmame do borrego precoce. O controle de mastites da propriedade incluiu o exame clínico realizado pela apalpação dos úberes e a realização do Exame Califórnia Mastite Teste (CMT) no leite.

No período de desmame do borrego, uma ovelha desenvolveu mastite clínica aguda e foi separada do rebanho para o tratamento. A ovelha foi submetida ao tratamento com ozônio que consistiu em uma única aplicação intramamária de 180 mL da mistura gasosa O₂/O₃ na concentração de 66 mg/L, aplicado através de uma sonda uretral no canal do teto. Para a produção da mistura gasosa foi utilizado o equipamento OZONELIFE® da empresa Medical System acoplado a um cilindro de oxigênio medicinal.

Foram colhidas amostras de leite deste animal antes, 12h, 24h, 48h e 72h após o tratamento. As amostras de leite foram enviadas ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Camilo Castelo Branco para o isolamento e identificação do agente envolvido.

Durante todo o tratamento a ovelha contaminada ficou isolada, como medida profilática para se evitar a disseminação da doença no rebanho.

Para o teste de susceptibilidade aos antimicrobianos da alga *Prototheca* sp. isolada da amostra de leite da ovelha infectada, utilizou-se a técnica de difusão em ágar [6]. Foram utilizados para esta avaliação multidiscos (Laborclin®) contendo os antimicrobianos, cefepime (cef), clindamicina (cli), ciprofloxacina (cip) sulfazotrim (stu), tetraciclina (tet), cloranfenicol (clo), gentamicina (gen), oxacilina (oxa), penicilina-G (pen), rifampicina (rif), eritromicina (eri) e vancomicina (van). A sensibilidade aos antibióticos foi interpretada de acordo com as recomendações do National Committee for Clinical Laboratory Standards [7].

Este trabalho foi submetido e aprovado pelo CEUA/UNICASTELO sob o número 0014/2013.

Resultados

Nas colheitas de amostras de leite da ovelha foi isolado e identificado o agente etiológico *Prototheca* sp. como causador da mastite clínica aguda antes do

tratamento (figura 1), o agente etiológico *Prototheca* sp. apresentou as características: colônias brancas, rugosas e de aspecto vítreo, e na microscopia óptica foram observados os esporângios ovais.



Figura 1: Morfologia das colônias de *Prototheca* sp. em Ágar Sabouraud Dextrose.

Após a aplicação da mistura gasosa O₂/O₃ foram colhidas amostras de leite para cultivo microbiológico nos períodos de 12h, 24h, 48h e 72h para a comparação dos resultados antes e depois do tratamento. Constatou-se que, a partir de 12h após o início do tratamento não foram mais isolados *Prototheca* sp. nas amostras de leite. No período do tratamento observou-se imediatamente após a ordenha que o leite apresentava-se ligeiramente rosado denunciando a presença de sangue, mas não houve alteração nos úberes como inchaços ou alteração de temperatura.

No presente relato, foi determinado pelo método de difusão em ágar, o perfil de susceptibilidade da *Prototheca* sp. aos antimicrobianos, verificando-se resistência a todos os antibióticos testados, como demonstrados na figura 2.

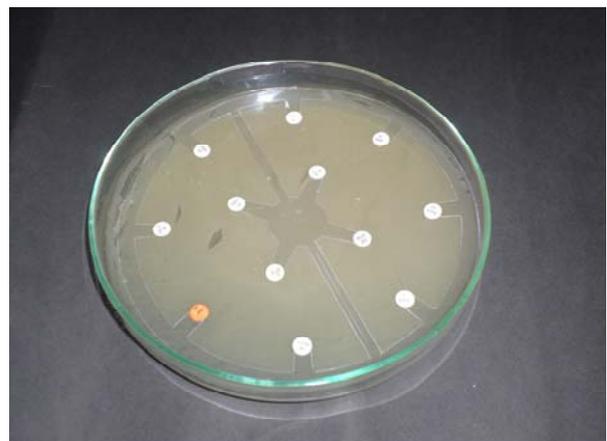


Figura 2: Antibiograma usado em *Prototheca* sp.

Discussão

Muitos autores [1,2,3,4] constataram que a alga *Prototheca* sp. é causadora de mastite clínica aguda em bovinos, neste estudo ocorreu em uma ovelha relatando uma nova espécie suscetível a Protothecose.

Os resultados obtidos no presente estudo diferem de outros autores [2] uma vez que estes não comprovaram a eficiência da mistura gasosa O₂/O₃ na cura da mastite bovina, mas cabe ressaltar que estes autores utilizaram diferentes concentrações, 35mg/mL, 10mg/mL e 10mg/mL, em 3 aplicações intramamária, no presente relato foi utilizada uma única aplicação na concentração de 66 mg/mL em ovino, sendo capaz de eliminar a *Prototheca* sp. Este estudo também corrobora com pesquisadores [3,4] que a alga é extremamente resistente aos antimicrobianos existentes atualmente no mercado, tornando difícil a erradicação e/ou tratamento. Com a utilização do ozônio na forma de gás foi comprovado o efeito germicida na dosagem utilizada como relatado por outros pesquisadores [5], sendo o primeiro relato de cura de mastite pela alga *Prototheca* sp, mas há necessidade de novas pesquisas para comprovar a eficiência do método na concentração utilizada da mistura gasosa O₂/O₃ em uma amostragem maior de animais e em outras espécies de animais suscetíveis a alga *Prototheca* sp.

Conclusão

O tratamento utilizando a mistura gasosa O₂/O₃ foi eficiente na eliminação da alga *Prototheca* sp. como causadora de mastite clínica aguda na ovelha. Este relato evidencia o primeiro caso de mastite em ovinos causada por *Prototheca* sp., assim como, o primeiro caso de cura de Protothecose com a utilização da Ozonioterapia.

Agradecimentos

Agradeço UNICASTELO pela bolsa integral para o Curso de Doutorado em Engenharia Biomédica, a Profa. Ilda Stefanine que me ajudou nas correções e a técnica de Laboratório de Microbiologia Selma Aparecida Pereira Bernardo.

Referências

- [1] Vaz A. K., et al. Mastite bovina por *Prototheca* sp. em Santa Catarina: relato de caso. Revista de Ciências Agroveterinárias, Lages, 2005, v.4, n.1, p. 72-75. Disponível em: <http://rca.cav.udesc.br/rca_2005_1/vaz.pdf>. Acesso em: 17 de out. 2013. ISSN 1676-9732, 2005.
- [2] Moreira, et al., Treatment of clinical mastitis in bovine by *Prototheca* sp. through ozone therapy – case report. Anais do IV World Congress of Oxygen - Ozone therapy, Buenos Aires, Argentina, 2013.
- [3] Costa, E.O., et. al. Bovine mastitis due to algae of the genus *Prototheca*. Mycopathologia, 1996a, v.133, n.2, p.85-88.
- [4] Costa, E.O., et al. An increased incidence of mastitis caused by *Prototheca* sp and *Nocardia* sp. on a farm in SãoPaulo, Brazil. Vet. Res. Commun., 1996b, v.20, n.3, p.237-241.
- [5] Elvis, A. M.; Ekta, J. S. Ozone therapy: a clinical review. J. Nat. Sci. Biol. Med., 2011, v.2, n. 1, p. 66-70. Disponível em:<www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3312702>. Acesso em: 12 maio 2014. DOI:10.4103/0976-9668.82319.
- [6] Bauer, A.W., et, al., Antibiotic testing by standardized single disk method. American Journal of Clinical Pathology, 1966, v.45, p.493-496.
- [7] National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility (Approved Standards, M2-A4) Villanoa, 2005; PA National Committee For Clinical Laboratory