

RESISTÊNCIA DE ESPÉCIES DE CANDIDA ISOLADAS DE LEITE PROVENIENTE DE MASTITE BOVINA À PASTEURIZAÇÃO E FERVURA

RESISTANCE OF CANDIDA SPECIES ISOLATED FROM MILK FROM BOVINE MASTITIS TO PASTEURIZATION AND BOILING

L. C. AGOSTINHO SARTORI¹, R. C. SANTOS¹, J. M. MARIN^{2*}

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo a avaliação da resistência a pasteurização e a fervura de culturas do gênero *Candida* isoladas de leite bovino. Foram obtidos 45 isolados de *Candida* em leite provenientes de vacas leiteiras acometidas de mastite clínica ou sub-clínica em quatro estados brasileiros. As culturas foram submetidas a diferentes tratamentos térmicos, pasteurização rápida (72-75°C / 20 seg), pasteurização lenta (62-65°C / 30 min), e fervura (100°C / 1-3 seg). A pasteurização rápida foi o procedimento no qual houve maior índice de resistência da levedura (64,4%), seguida pela fervura (15,5%) e pela pasteurização lenta (6,6%). A persistência de diferentes espécies de *Candida* em leite submetido à pasteurização e a fervura, pode representar um risco ao consumidor, especialmente aos indivíduos imunocomprometidos, crianças e pessoas idosas.

PALAVRAS-CHAVE: Mastite bovina. Leite. Tratamento térmico. Levedura. *Candida*.

SUMMARY

The objective of this study was to evaluate the resistance of *Candida* species isolated from bovine milk to pasteurization and boiling. A total of 45 *Candida* isolates were obtained from mastitic milk of dairy cows with clinical or subclinical mastitis from four Brazilian States. The isolates were submitted to different thermal treatments, fast pasteurization (72-75°C / 20sec), slow pasteurization (62-65°C / 30 min) and boiling (100°C / 1-3sec). Fast pasteurization was the procedure in which there was a higher resistance of yeast (64.4%), followed by boiling (15.5%) and slow pasteurization (6.6%). Care should be taken regarding the possibility of *Candida* strains persistence in pasteurized and boiled milk, which can represent a risk to consumers especially to immuno-compromised individuals, children and elderly people.

KEY-WORDS: Bovine mastitis. Milk. Thermal treatment. Yeast. *Candida*.

¹Pós graduadas do Programa de Microbiologia Agropecuária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Julio de Mesquita (UNESP) - Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil.

²Professor Associado do Departamento de Morfologia, Fisiologia e Patologia Básica, FORP, Universidade de São Paulo (USP) - Campus Ribeirão Preto, SP, Brasil. *Endereço para correspondência: José Moacir Marin, Departamento de Morfologia, Fisiologia e Patologia Básica, FORP, Universidade de São Paulo, Campus Ribeirão Preto, Avenida do Café s/n, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, 14040-904. e-mail: jmmarin@forp.usp.br

INTRODUÇÃO

A mastite é definida como uma inflamação da glândula mamária, geralmente como consequência de infecção microbiana, e continua a ser a doença mais freqüente e dispendiosa em vacas leiteiras (SEKER, 2010). Mais de 150 diferentes microrganismos têm sido identificados como agentes etiológicos da mastite (WATTS, 1988; BRADLEY, 2002). Além dos agentes bacterianos, outros grupos de microrganismos como os fungos podem causar o processo inflamatório (WATTS, 1988; KRUKOWSKI et al., 2006).

Os fungos são componentes naturais da microbiota do solo e podem colonizar a pele do úbere em pequeno número. Eles são considerados oportunistas e produzem doença quando os mecanismos de defesa naturais estão reduzidos (KIRK & BARLETT, 1986). As espécies de *Candida* são os organismos mais freqüentemente isolados entre os agentes etiológicos da mastite micótica em glândulas mamárias infectadas (SPANAMBERG et al., 2009; ZHOU et al., 2013.).

Existem relatos na literatura sobre a ocorrência de leveduras em leite e queijo de bovinos (CORBO et al., 2001). A presença de microrganismos no leite, muitos dos quais responsáveis por zoonoses, representa um fator que compromete a sua qualidade e segurança. Portanto, com o objetivo de reduzir o teor microbiano no leite, bem como a eliminação de microrganismos potencialmente perigosos para os seres humanos, a pasteurização é o procedimento mais utilizado (KOUSTA et al., 2010). O objetivo deste estudo foi avaliar a resistência de espécies de *Candida* isoladas de leite proveniente de bovinos com mastite frente a diferentes tratamentos térmicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais amostrados

O estudo foi conduzido com vacas de propriedades leiteiras, mantidas sob o sistema intensivo de criação, distribuídas em quatro estados brasileiros, São Paulo (6 fazendas), Paraná (14 fazendas), Santa Catarina (7 fazendas) e Rio Grande do Sul (14 fazendas). Os rebanhos analisados eram constituídos por animais de diferentes raças, idades e em diferentes fases de lactação.

Crítérios para a classificação em mastite clínica ou sub-clínica

A mastite clínica foi caracterizada por sinais clínicos e/ou secreção de leite anormal detectada pelo teste da caneca de fundo preto. A mastite sub-clínica foi identificada pelo CMT (California Mastitis Test) convencional.

Amostras de leite

Quatrocentos e vinte e oito amostras de leite de quartos com mastite clínica ou sub-clínica foram coletados no período de Fevereiro a Dezembro de 2009. As amostras de leite (10 mL) foram sempre coletadas assepticamente em frascos de vidro

esterilizados após a desinfecção dos tetos com álcool a 70%. Os três primeiros jatos de leite foram descartados, e em seguida o quarto jato foi coletado e mantido a uma temperatura de 4 ° C até processamento no laboratório. Alíquotas de 0,1 mL de amostras de leite foram semeadas em ágar Sabouraud Dextrose (SDA, Oxoid) suplementado com cloranfenicol (400mg/L). As placas foram incubadas a 37°C por 72h. As leveduras foram fenotipicamente caracterizadas através de teste padrão (RICHARD et al., 1980; KREGER-VAN RIJ, 1984; BARNETT et al., 1990). Apenas as leveduras do gênero *Candida* foram utilizadas no presente estudo. Depois de identificadas, um isolado de cada placa foi mantido em ágar Sabouraud Dextrose a temperatura ambiente. Entre as amostras de leite, cinquenta e cinco amostras foram positivas para o gênero *Candida* (12,8%), entre elas *Candida krusei* (19 isolados), *C. parapsilosis* (14 isolados), *C. tropicalis* (10 isolados), *C. albicans* (7 isolados), *C. glabrata* (2 isolados), *C. spp.* (2 isolados) e *C. rugosa* (1 isolado).

Tratamento térmico

Quarenta e cinco isolados do gênero *Candida* foram aleatoriamente selecionados, sendo incluídos representantes de todas as espécies identificadas. Na seqüência as culturas foram analisadas utilizando a metodologia descrita por MELVILLE et al. (1999) e RUZ-PERES et al. (2010). Para todas as avaliações, foram usadas culturas recentes (48h) de leveduras cultivadas em ágar Sabouraud Dextrose. Para cada um dos isolados, a concentração de células em 5,0 mL de Solução salina estéril (0,85%) foi ajustada a uma turbidez equivalente ao tubo número 3 da escala de Mc Farland (9×10^8 cel/mL). Posteriormente, uma alíquota de 2 mL de cada suspensão do microrganismo foi transferida para um tubo de vidro estéril contendo 18 mL de leite integral estéril, que significa uma diluição da ordem de 10^{-1} (correspondente a solução mãe/controle com aproximadamente 9×10^7 cel/mL). Após homogeneização 1 mL de cada suspensão foi distribuído em 15 tubos de vidro estéreis. As amostras foram submetidas a diferentes tratamentos térmicos, cinco tubos a 62-65°C por 30 minutos (pasteurização lenta), cinco tubos a 72-75°C por 20 segundos (pasteurização rápida), cinco tubos até atingir a fervura, na seqüência todos os tubos foram colocados imediatamente em um banho de gelo.

Após a realização dos três tratamentos térmicos, foram colhidas alíquotas de 0,1 mL das suspensões testadas (inclusive da solução mãe/controle), as quais foram plaqueadas em ágar Sabouraud Dextrose utilizando-se a técnica de *spread plate*, e incubadas a 37°C por 48 horas, para a avaliação da presença e quantidade de unidades formadoras de colônias de *Candida*. Os testes que visaram à avaliação da resistência de cada isolado foram repetidos por cinco vezes para cada tratamento térmico. O isolado foi considerado resistente quando foi observada ausência total de crescimento de colônias em pelo menos três dos cinco testes realizados.

RESULTADOS

Em relação aos isolados de leveduras, 6,6%, 64,4% e 15,5% foram resistentes à pasteurização lenta, pasteurização rápida e fervura respectivamente (Tabela 1), portanto a pasteurização rápida (72-75°C / 20 seg) foi o método menos eficiente de eliminação das leveduras. Foi observado também que a média de número de colônias recuperadas após os diferentes tratamentos térmicos foi maior para a pasteurização rápida (Tabela 2). No presente estudo, apenas um isolado o número 6 (*C. krusei*) se mostrou resistente aos três tratamentos utilizados.

DISCUSSÃO

A eliminação de microorganismos nocivos para os seres humanos é altamente desejável e a pasteurização é o principal processo atualmente utilizado. Diferentes autores descreveram o isolamento de leveduras, especialmente várias espécies de *Candida* em produtos lácteos (CORBO et al., 2001; SPANAMBERG et al, 2004). Considerando que os animais podem ser vetores de transmissão ou reservatórios de estirpes que causam doença em humanos e podem representar um risco para os pacientes imuno-comprometidos (EDELMAN et al.,

2005), deve ser dada uma atenção especial aos produtos lácteos, uma vez que conforme os resultados apresentados neste trabalho e no trabalho de RUIZ-PERES et al (2010), isolados de diferentes espécies de *Candida* se mostraram resistentes aos tratamentos térmicos utilizados, permanecendo viáveis no leite e nos seus derivados.

Embora *C. albicans* continue a ser a causa mais freqüente de fungemia, uma série de relatos tem documentado infecções causadas por *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. lusitanae* (RODRIGUES et al, 2010). O consumo de leite contaminado com *Candida* representa um dos meios de transmissão, neste sentido NEDRET KOÇ et al. (2001) relataram 12 casos de fungemia por *C. glabrata* que ocorreram entre as crianças internadas em um hospital da Turquia, devido a contaminação do leite.

A resistência de isolados de *Candida* ao tratamento térmico representa uma dificuldade na eliminação deste patógeno, o que pode representar um risco potencial para a saúde pública.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Dra. Maria da Graça Portantiolo Corrêa e o Laboratório VITAFORT Ltda pelas amostras de leite mastítico disponibilizadas.

Tabela 1 - Número absoluto e porcentagem da resistência de 45 culturas de *Candida*, isoladas do leite de bovinos com mastite, provenientes de propriedades leiteiras de quatro estados brasileiros em 2009, frente a diferentes tratamentos térmicos.

Levedura	Pasteurização					
	Lenta (62-65°C / 30 min.)		Rápida (72-75°C / 20 seg.)		Fervura	
	N	%	N	%	N	%
<i>Candida</i> (n= 45)	3	6,6	29	64,4	7	15,5

N- Número absoluto; % porcentagem

Tabela 2 - Número médio de crescimento de colônias de 45 culturas de *Candida* isoladas do leite de bovinos apresentando mastite, coletados em quatro estados brasileiros em 2009, e submetidos a diferentes tratamentos térmicos.

Tratamento térmico	Número médio de colônias
Pasteurização lenta (62-65°C / 30 min.)	0,15*
Pasteurização rápida (72-75°C / 20 seg)	413,72
Fervura (100°C / 1-3 seg)	3,54

* Numero correspondente a média de colônias crescendo em placas após o respectivo tratamento térmico.

REFERÊNCIAS

BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeast: Characteristics and Identification**, 2 ed. Cambridge University Press, 1990.

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

CORBO, M. R.; LANCIOTTI, R.; ALBENZIO, M.; SINIGAGLIA, M. 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.

EDELMAN, A.; KRUGER, M.; SCHMID, J. Genetic relationship between human and animal isolates of

- Candida albicans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, p.6164-6166, 2005.
- KIRK, J. H.; BARTLETT, P. C. Bovine mycotic mastitis. **Compendium of Food Animal**, v.8, p.106-110, 1986.
- KOUSTA, M.; MATARAGAS, M.; SKANDAMIS, P.; DROSINOS, H. Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. **Food Control**, v.21, p.805-815, 2010.
- KREGER-VAN RIJ, N. J. W. **The yeast: A Taxonomic Study**, Amsterdam: Elsevier (Ed.), 1984, p.1082.
- KRUKOWSKI, H.; LISOWSKI, A.; ROZANSKI, P.; SKORKA, A. Yeasts and algae isolated from cows with mastitis in the South-eastern part of Poland. **Polish Journal of Veterinary Science**, v.9, p.181-184, 2006.
- MELVILLE, P. A.; WATANABE, E. T.; BENITES, N. R.; RIBEIRO, A. R.; BUENO, J. A.; GARINO, F.; COSTA, E. O. Evaluation of the susceptibility of *Prototheca zopfii* to pasteurization of milk. **Mycopathologia**, v.146, p.83-89, 1999.
- NEDRET KOÇ, A; KOCAGOZ, S.; ERDEM, F.; GUNDUZ, Z. Outbreak of nosocomial fungemia caused by *Candida glabrata*. **Mycoses**, v.45, p.470-475, 2002.
- RICHARD, J. L.; MACDONALD, J. S.; FICHTER, R. E.; ANDERSON, A. J. Identification of yeasts from infected bovine mammary glands and their experimental infectivity in cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v.12, p.1991-1994, 1980.
- RODRIGUES, D.; ALMIRANTE, B.; CUENCA-ESTRELLA, M.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; MENSA, J.; AYATS, J.; SANCHES, F.; PAHISSA, A. and the BARCELONA CANDIDEMIA PROJECT STUDY GROUP. Predictors of candidemia caused by non-*albicans Candida* species: results of a population-based surveillance in Barcelona, Spain. **Clinical Microbiology and Infection**, v.16, p.1676-1682, 2010.
- RUZ-PERES, M.; BENITES, N. R.; YOKOYA, E.; MELVILLE, P. A. Resistência de fungos filamentosos e leveduras isolados de leite cru bovino a pasteurização e fervura. **Veterinária e Zootecnia**, v.17, p.62-70, 2010.
- SEKER, E. Identification of *Candida* species isolated from bovine mastitic milk and their in vitro hemolytic activity in Western Turkey. **Mycopathologia**, v.169, p.303-308, 2010.
- SPANAMBERG, A.; HARTFELDER, C.; FUENTEFRÍA, A. M.; VALENTE, P. Diversity and enzyme production by yeasts isolated from raw milk in Southern Brazil. **Acta Scientiae Veterinaire**, v.32, p.195-199, 2004.
- SPANAMBERG, A.; SANCHES, E. M. C.; SANTURIO, J. M.; FERREIRO, F. Mastite micótica em ruminantes causada por leveduras. **Ciência Rural**, v.39, p.282-290, 2009.
- WATTS, J. L. Etiological agents of bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v.16, p.41-66, 1988.
- ZHOU, Y.; REN, Y.; FAN, C.; SHAO, H.; ZHANG, Z.; MAO, W.; WEI, C.; NI, H.; ZHU, Z.; HOU, X.; PIAO, F.; CUI, Y. Survey of mycotic mastitis in dairy cows from Heilongjiang Province, China. **Tropical Animal Health and Production**, DOI 10.1007/s1250-013-0419-y.