

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Prototecose por *Prototheca wickerhamii* em caprinos

EXPEDITO KENNEDY ALVES CAMBOIM

PATOS-PB

2009



CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS - PB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Prototecose por *Prototheca wickerhamii* em caprinos

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Campina Grande – UFCG em cumprimento dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

EXPEDITO KENNEDY ALVES CAMBOIM

Prof. Dr. Edisio Oliveira de Azevedo

Prof. Dr. Franklin Riet-Correa

Orientadores

PATOS-PB

2009

Nome: CAMBOIM, Expedito Kennedy Alves

Título: Prototecose por *Prototheca wickerhamii* em caprinos

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Campina Grande – UFCG em cumprimento dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Aprovado em 31 de março de 2009

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Edisio Oliveira de Azevedo

Orientador

Prof. Dr. Franklin Riet-Correa

Orientador

Prof. Dr. Leonildo Bento Galiza da Silva

(1º membro)

Prof. Dr. Sérgio Santos Azevedo

(2º membro)

"Uma família feliz nada mais é do que o paraíso antecipado". Aos meus pais Davi e Preta, irmãos Kadmu e Kadna, namorada Priscila, pelo carinho, dedicação e compreensão, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar forças para enfrentar as tarefas do dia a dia, pela oportunidade que tive de continuar meus estudos e por estar presente em minha vida.

Aos meus pais Davi e Maria de Fátima (Preta) e irmãos Kadmu e Kadna pelo carinho e incentivo constantes.

A minha namorada Priscila Rocha pela contribuição, amor dedicado que me fez aprender muito durante o nosso namoro.

Aos meus tios, primos, em especial Getúlio que também é médico veterinário, avós, por fazerem uma família unida e feliz.

Aos meus amigos de graduação Lázaro, Breno, André, Luciano, Antônio Alfredo, Adílio, Daniel Galvão e Adriana.

A todos os professores da Pós-Graduação pelos ensinamentos e sugestões no decorrer da pesquisa.

Aos colegas e amigos de Mestrado: Renault, Kézia, Valéria, Patrícia, Luciano, Gustavo, Nerivaldo, Tales, Tatyane e Rômulo por lutarem pelos seus ideais e darem continuidade ao aprendizado.

Ao professor Eldinê Gomes de Miranda Neto, ao qual devo muitos agradecimentos, pela amizade.

Aos professores Sara, Riet, Rosane, Antônio Flávio, Edisio, Sérgio Santos, José Moraes, Olaf, Pedro Isidro e ao médico veterinário Josemar Marinho pelos ensinamentos profissionais e pessoais.

A toda equipe do laboratório de Biologia molecular: Márcia, Paulo Andrade, Arthur, Aline, Kamila, Gilsane, pela convivência, trabalhos realizados, amizade.

Ao biólogo Felício Garino Júnior, por toda colaboração no desenvolver desta pesquisa e pela amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária por oferecer-me a oportunidade de continuar meus estudos.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

A todos os amigos que tenho e os que conheci.

Todas estas pessoas foram muito importantes para mim durante esta caminhada.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

	Pag.
Introdução	9
Referências	9
CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA	
Prototecose: uma doença emergente em animais domésticos e no homem	12
Abstract	12
Resumo	13
Introdução	13
Etiologia	14
Epidemiologia	17
Aspectos Clínicos	20
Bovinos	20
Caprinos	21
Animais de companhia	22
Humanos	23
Histopatologia	24
Diagnóstico	25
Sensibilidade a antimicrobianos e tratamento	26
Controle e prevenção	27
Referências	29
CAPÍTULO II – Prototecose por <i>Prototheca wickerhamii</i> em caprino	
Resumo	37
Introdução	38
Material e Métodos	39
Resultados	41
Discussão	48
Referências	50
Conclusões	53

LISTA DE TABELAS

	Pag.
Tabela 1 Resultado do estudo hematológico em caprino com prototecose realizado em diferentes períodos	43
Tabela 2 Resultado do estudo de bioquímica sérica em caprino com prototecose realizado em diferentes períodos	43
Tabela 3 Resultado da concentração de proteínas totais, albumina, α_1 , α_2 , β_1 , β_2 e γ globulinas, relação entre albumina e globulinas (relação A/G) de caprino com prototecose realizado em diferentes períodos.	44

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
CAPITULO I – Prototecose: uma doença emergente em animais domésticos e no homem	
Figura 1 <i>Prototheca wickerhamii</i> . (A) Colônias de <i>Prototheca wickerhamii</i> em ágar sangue ovino 5% e (B) em agar Sabouraud dextrose. (C) Morfologia em azul de algodão, observam-se esporangiósporos dentro de um esporângio, que dá o aspecto de mórula e, (D) em coloração de Gram	16
Figura 2 <i>Prototheca wickerhamii</i> . (A) Lesão histológica contendo esporângio medindo de 3 a 15µm de diâmetro, algumas com vários esporangiósporos, formando estruturas semelhantes a mórula (setas) ou flor de margarida (“daisy-like”), coradas pelo PAS e, (B) em hematoxilina-eosina.....	25
CAPITULO II - Prototecose por <i>Prototheca wickerhamii</i> em caprinos	
Figura 1 Condição corporal da cabra (A) no momento que chegou ao Hospital Veterinário e (B) dez meses após apresentando melhor condição corporal; (C e E) lesões observadas ao exame inicial, apresentado nódulos na junção muco-cutânea, mucosa nasal e lábio, (D e F) lesões observadas dez meses após, com presença de vários nódulos ulcerados no vestíbulo nasal, junção muco-cutânea e lábio, e um nódulo maior, ulcerado na pele acima do osso nasal.....	42
Figura 2 (A) Colônias de <i>P. wickerhamii</i> em meio agar Sabouraud dextrose, após 48 horas de incubação medindo 2-5 mm de diâmetro, com pigmento amarelo claro, bordas irregularmente onduladas com elevação central, (B) coloração azul de algodão, presença de células esféricas, com 2,5 a 13 µm de diâmetro, múltiplos esporangiósporos, com aspecto de mórula, característico de <i>P. wickerhamii</i>	45
Figura 3 Corte sagital da cabeça, vestíbulo nasal apresentando múltiplas massas irregulares, localizando-se do assoalho da mucosa nasal até a porção inicial dos meatos	46
Figura 4 (A) Estruturas arredondadas medindo de 3 a 15µm de diâmetro com vários esporangiósporos, aspecto de mórula, característica de <i>P. wickerhamii</i> , coradas por hematoxilina - eosina-HE, (B) esporângio central rodeado por esporangiósporos corados pelo ácido periódico de Schiff-PAS	47
Figura 5 Açude com pouca água, presença de muita lama e severa proliferação de organismos semelhantes a alga.....	47

LISTA DE QUADROS

	Pag.
Quadro 1 Testes de assimilação de carboidratos e álcool para a diferenciação de espécies do gênero <i>Prototheca</i>	16

INTRODUÇÃO

Prototecose é uma doença incomum de animais e humanos causada por microrganismos do gênero *Prototheca*, que são algas aclorofiladas, unicelulares, de distribuição cosmopolita. Ocorre, especialmente, em zonas úmidas onde se concentra matéria orgânica, apresenta um elevado grau de resistência a diferentes condições ambientais, agentes químicos e físicos (Pore et al. 1983).

O gênero é composto por cinco espécies, *Prototheca zopfii*, *P. moriformis*, *P. wickerhamii*, *P. ulmea* e *P. stagnora* (Pore 1998). As espécies patogênicas, *P. zopfii* e *P. wickerhamii*, afetam principalmente hospedeiros com algum comprometimento do sistema imunológico. Em bovinos, mastite é o principal quadro apresentado (Costa et al. 1997). Em cães e gatos, a doença apresenta-se nas formas cutânea, ocular e entérica (Siqueira et al. 2008). Em humanos, a doença pode se apresentar como infecção cutânea e/ou subcutânea, bursites e infecção sistêmica (Lass-Flörl & Mayr 2007). Em caprinos, um único relato ocorreu no Estado da Paraíba, o animal apresentava dermatite com nódulos proeminentes na junção muco-cutânea do focinho (Macedo et al. 2008).

Esta dissertação é constituída por dois trabalhos. O primeiro refere-se a uma revisão de literatura intitulada por Prototecose uma doença emergente em animais e humanos e será submetida à Revista Pesquisa Veterinária Brasileira. O segundo trabalho, Protothecosis by *Prototheca wickerhamii* in goat (Prototecose por *Prototheca wickerhamii* em caprino), será enviado à revista Mycosis, descreve um caso espontâneo de infecção por *Prototheca wickerhamii* em caprino, causando lesões nodulares ulcerativas na junção mucocutânea da narina e porção inicial do vestíbulo nasal em animal proveniente da cidade de Catingueira no Estado da Paraíba, Brasil.

REFERÊNCIAS

- Costa E.O., Melville P.A., Ribeiro A.R., Watanabe E.T. & Parolari C.F.F. 1997. Epidemiologic study of environmental sources in a *Prototheca zopfii* outbreak of bovine mastitis. Mycopathologia 137: 33-36.
- Lass-Flörl C. & Mayr A. 2007. Human protothecosis. Clin. Microbiol. Rev. 20(2): 230-242.
- Macedo J.T.S.A., Riet-Correa F., Dantas A.F.M. & Simões S.V.D. 2008. Cutaneous and Nasal Protothecosis in a Goat. Vet. Pathol. 45: 352-354.

Pore R.S., Barnett E.A., Barnes JR W.C. & Walker J.D. 1983. *Prototheca* ecology. *Mycopathologia* 81: 49-62.

Pore R.S. 1998. *Prototheca*, a yeastlike alga In.: Kurtzman C.P. & Fell J.W. (ed). *The yeasts - A taxonomic study*. Elsevier, New York, p. 883–887.

Siqueira A.K., Ribeiro M.G. & Salerno T. 2008. *Prototecose em animais de companhia e aspectos da doença no homem*. *Ciência Rural* 38(6): 1794-1804.

CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

Prototecose: uma doença emergente em animais domésticos e no homem

O presente trabalho foi formatado segundo as normas da **Revista Pesquisa Veterinária Brasileira**, de acordo com o que estabelece a Norma nº 01/2007 de 09 de Abril de 2007, do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural – Campus de Patos - PB.

Prototecose: uma doença emergente em animais domésticos e no homem¹

Expedito K.A. Camboim², Patrícia B. Neves², Felício Garino Júnior³, Josemar M.

Medeiros³ e Franklin Riet-Correa^{3*}

Páginas

Abstract.....	
Resumo.....	
Introdução.....	
Etiologia.....	
Epidemiologia.....	
Aspectos clínicos.....	
Bovinos.....	
Caprinos.....	
Animais de Companhia.....	
Humanos.....	
Histopatologia.....	
Diagnóstico.....	
Sensibilidade a antimicrobianos e tratamento.....	
Controle e Prevenção.....	
Referências.....	

ABSTRACT.- Camboim E.K.A., Neves P.B., Garino Jr F., Medeiros J.M. & Riet-Correa F. 2009. [Protothecosis: an emergent disease in domestic animals and human] Prototecose: uma doença emergente em animais domésticos e no homem. *Pesquisa Veterinária Brasileira*.....Hospital Veterinário, CSTR, Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Patos, 58700-970 Patos, Paraíba, Brasil. E-mail: franklin.riet@pq.cnpq.br

Protothecosis, caused by *Prototheca zopfii* or *P. wickerhamii* is an emergent disease of human and animals. In cattle, *P. zopfii* is an important cause of environmental mastitis. In dogs and cats protothecosis is caused mainly by *P. zopfii*, causing cutaneous infections or a systemic form affecting many organs in dogs, and cutaneous infection affecting mainly the skin of the face and nose in cats. In humans, protothecosis, caused mainly by *P. wickerhamii*, occurs in three forms: cutaneous; olecran bursitis; and disseminated. The lesion is usually localized in the site of inoculation in immunocompetent individuals; however, in immunocompromised patients, it can become widespread. Protothecosis caused by *P. wickerhamii* was recently reported in goats causing rhinitis and dermatitis of the face and pinna. This paper reviews *Prototheca* etiology, epidemiology, clinical signs,

¹ Recebido em ...

Aceito para publicação em ...

² Mestrando em Medicina Veterinária, Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Patos, PB 58700-000, Brasil. E-mail: expeditok@hotmail.com

³ Hospital Veterinário, CSTR, UFCG, Patos, PB 58700-000. *Autor para correspondência: franklin.riet@pq.cnpq.br

pathology, diagnosis, susceptibility to antimicrobials, treatment, control and prevention of the disease.

INDEX TERMS: *Prototheca*, protothecosis, mastitis, bovines, dogs, cats, goats, human.

RESUMO.-Prototecose, causada por *Prototheca zopfii* ou *P. wickerhamii*, é uma doença emergente em animais e humanos. Em bovinos, *P. zopfii* é uma importante causa de mastite ambiental. Em cães e gatos, a prototecose é causada principalmente por *P. zopfii*. Em cães causa infecção cutânea ou uma forma sistêmica envolvendo diversos órgãos. Em gatos, predominam as lesões tegumentares na região da face e plano nasal. No homem, a prototecose, causada principalmente por *P. wickerhamii*, manifesta-se sob três formas: cutânea, articular com bursite do olécrano e sistêmica. Pode ocorrer em indivíduos imunocompetentes, os quais podem apresentar bursite e/ou infecções cutâneas localizadas, ou em indivíduos imunossuprimidos, nos quais a enfermidade pode ser disseminada e/ou com envolvimento visceral. A prototecose causada por *P. wickerhamii* foi descrita recentemente em caprinos como causa de rinite afetando o vestíbulo nasal, união mucocutânea, pele da face e orelha. Nesta revisão são abordadas etiologia, epidemiologia, sinais clínicos, patologia, diagnóstico, susceptibilidade a antimicrobianos, tratamento, controle e prevenção da prototecose em animais domésticos e no homem.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Prototheca*, prototecose, bovinos, mastite, cães, gatos, caprinos, humanos.

INTRODUÇÃO

O gênero *Prototheca* foi inicialmente descrito por Wilhelm Krueger, em 1894, como um grupo de microrganismos isolados da seiva de algumas árvores. De acordo com suas características estruturais, histológicas e reprodutivas, esses agentes foram classificados como algas aclorofiladas com afinidades filogenéticas a *Chlorella* spp (Pore et al. 1983). As algas do gênero *Prototheca* perderam o pigmento clorofila e a capacidade de realizar a fotossíntese, havendo necessidade de fonte heterotrófica de nutrientes, o que pode ter conferido potencial patogênico a esse microrganismo (Costa et al. 1998). O gênero está presente na natureza, principalmente em habitats ricos em matéria orgânica (Pore et al. 1983). A prototecose é uma doença emergente em animais e humanos (Costa et al. 1999, Lass-Flörl & Mayr 2007).

Objetivou-se com esse trabalho revisar as características microbiológicas, epidemiologia, sinais clínicos, patologia, diagnóstico, tratamento e controle da protoseose em animais domésticos e no homem.

ETIOLOGIA

Os microrganismos do gênero *Prototheca* são algas unicelulares e imóveis de distribuição mundial. Foram isolados a partir de água do mar, de lagos e rios, da seiva de árvores, de lama, de espécies animais, como porcos, ratos, cães, gatos, bovinos e de leite e fezes (Pore et al. 1983). Utilizam glicose como fonte de carbono, sais de amônio e proteínas como fonte de nitrogênio, além de necessitarem de oxigênio e tiamina para o crescimento (Pore 1985, 1998).

O gênero é composto por cinco espécies, *P. zopfii*, *P. moriformis*, *P. wickerhamii*, *P. stagnora* e *P. ulmea* (Pore 1998). *P. zopfii* e *P. wickerhamii* são patogênicas e têm sido associadas a infecções no homem e em animais na Europa, Ásia, África, Austrália e Américas (Costa et al. 1997, Hollingsworth 2000, Corbellini et al. 2001, Bexiga et al. 2003, Buzzini et al. 2004, Hosaka & Hosaka 2004, Lass-Flörl & Mayr 2007, Macedo et al. 2008, Salvadori et al. 2008).

A reprodução é assexuada por septação interna (endosporulação). Durante o processo reprodutivo, a célula-mãe, denominada esporângio, forma entre duas a dezesseis células-filhas, denominadas endósporos ou esporangiósporos. Os endósporos permanecem dentro do esporângio, envoltos por uma cápsula trilaminar de esporopolenina, que quando se rompe os libera, quando então se desenvolvem e reiniciam o ciclo das células de origem (Pore 1985, Jánosi et al. 2001).

As algas do gênero *Prototheca* crescem em condições de aerobiose. De acordo com o meio de cultura empregado, o isolamento do microrganismo pode variar entre dois e sete

dias, em intervalos de temperatura de 25°C a 37°C. Em ágar sangue ovino a 5% formam colônias pequenas, branco-acinzentadas (fig. 1A) (Ribeiro et al. 1998, Vargas et al. 1998). No ágar Sabouraud, formam colônias de tonalidade branca a dourada, entre 1 a 2 mm de diâmetro (Pore 1985, Jánosi et al. 2001). Após 72 a 96 horas de incubação, as colônias apresentam diâmetro variável entre 3 e 6 mm e bordas irregularmente onduladas com elevação central (Fig. 1B) (Brito & Veiga 1997, Bexiga et al. 2003, Carneiro et al. 2007).

A morfologia da alga pode ser avaliada mediante colorações de Gram (Fig. 1D) (Vargas et al. 1998), Giemsa, Panótico (Ribeiro et al. 1998), além de outras colorações específicas para fungos, como o azul de algodão, em que se observam os esporangiósporos dentro de um esporângio. No caso da *P. wickerhamii* esporangiósporos se distribuem ao redor de um esporangiósporo central dando a célula um aspecto de mórula, flor de margarida ou framboesa (Fig. 1C) (Vargas et al. 1998, Dipersio 2001). Por outro lado, quando corados com azul de metileno ou cristal violeta, visualizam-se apenas corpúsculos relativamente grandes, ovóides ou globosos, sem delimitação dos esporangiósporos (Brito & Veiga 1997, Filippesen et al. 1999). As células de *P. wickerhamii* são esféricas e medem de 2,5 a 13 µm de diâmetro, enquanto as células de *P. zopfii* podem ser esféricas ou ovais, com tamanho variando de 4,5 a 25 µm de diâmetro (Pore 1985).

As espécies são diferenciadas com base nas características morfo-tintoriais e em testes de assimilação de carboidratos e álcoois (Quadro 1). Nas provas de fermentação, *P. zopfii* é positiva para glicose, frutose, 2-propanol, acetato (pH 5,0), glicerol e negativa para lactose, sacarose, trealose, xilose e manose. *P. wickerhamii* assimila glicose, galactose, trealose e levulose, mas não assimila maltose, sacarose, lactose, xilose, dulcitol, rafinose, inositol, melibiose, adonitol, eritritol, propanol, salisina e amido (Pore 1998).

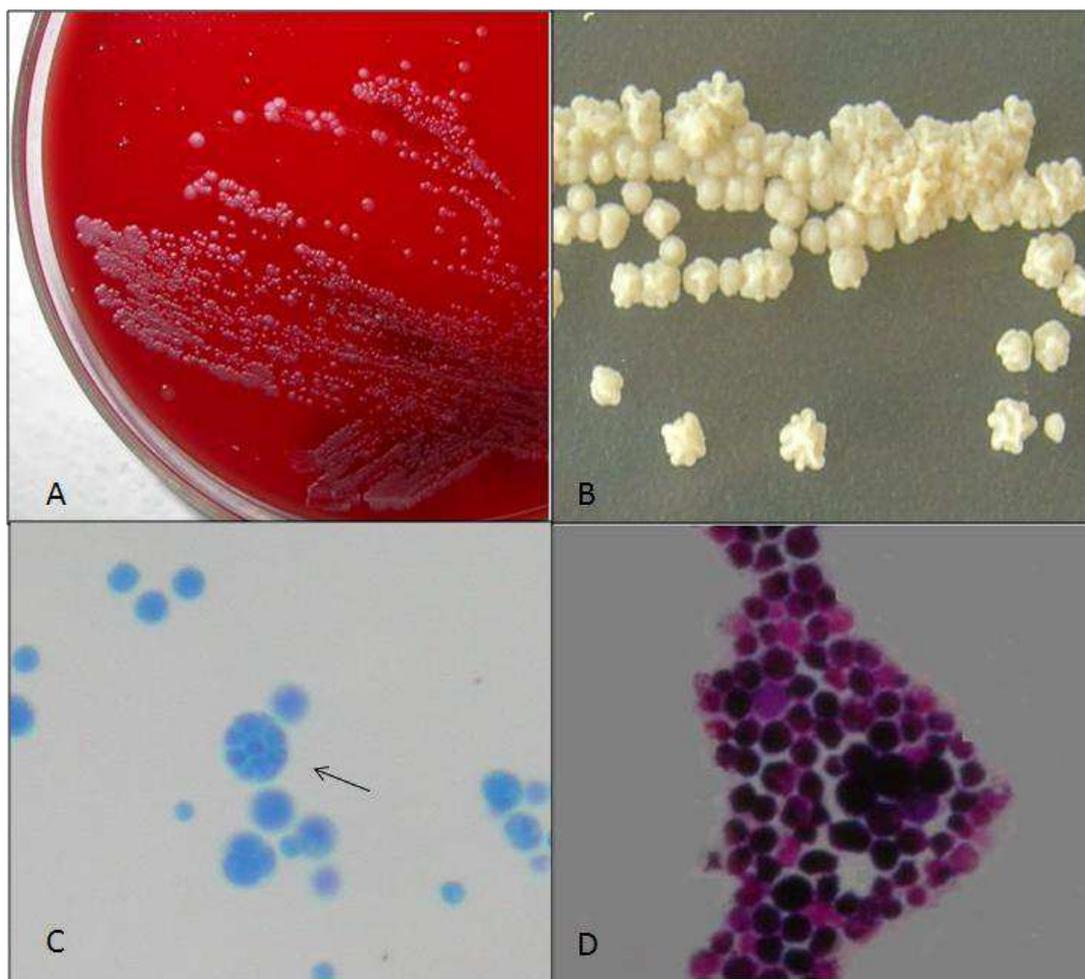


Fig. 1 *Prototheca wickerhamii*. (A) Colônias de *Prototheca wickerhamii* em ágar sangue ovino 5% e (B) em ágar Sabouraud dextrose. (C) Morfologia em azul de algodão, observam-se esporangiósporos dentro de um esporângio, que dá o aspecto de mórula e, (D) em coloração de Gram.

Quadro 1. Testes de assimilação de carboidratos e álcool para a diferenciação de espécies do gênero *Prototheca*.

Espécies	Assimilação			
	Frutose	Galactose	1-Propanol	Trealose
<i>Prototheca moriformis</i>	+	-	+/v	-
<i>P. stagnora</i>	+	+	+/v	-
<i>P. ulmea</i>	-	-	-	-
<i>P. wickerhamii</i>	+	+	-	+
<i>P. zopfii</i>	+	-	+	-

V = variável

Prototheca spp resiste ao tratamento com cloro, tratamento de esgoto e a digestão intestinal, isso contribui para sua persistência em esgotos, permanência no ambiente e disseminação para susceptíveis (Pore 1983). Também é resistente à pasteurização do leite,

tanto lenta quanto rápida, representando um problema para o consumo de leite e de seus produtos derivados, aumentando o potencial zoonótico (Melville et al. 1999). A resistência apresentada por estes microrganismos é explicada pela presença da esporopolenina, um componente da parede celular que confere resistência a vários agentes físicos e químicos (Atkinson et al. 1972). A esporopolenina é um polímero resistente à acetólise, responsável pela resistência da parede celular, encontrada no grão de pólen de angiospermas e gimnospermas, e também nos esporos de pteridófitas, fungos e algas (Gunnison & Alexander 1975, Dickinson 1976).

EPIDEMIOLOGIA

Algas do gênero *Prototheca* estão distribuídas no ambiente, principalmente em locais úmidos e ricos em matéria orgânica, os quais permitem a perpetuação e disseminação do agente. Em ecossistemas aquáticos, como rios e bebedouros, com baixa concentração de nutrientes, as espécies sobrevivem sem crescimento populacional. A partir desses locais, a alga pode ser ingerida por animais e ser disseminada no ambiente pela eliminação através das fezes de vacas, bezerros e de animais silvestres (Pore et al. 1983, Costa et al. 1997, Costa et al. 2001). Pore et al. (1983) e Costa et al. (2000) verificaram que as principais fontes de disseminação para *P. zopfii* nas propriedades leiteiras são bezerros, vacas em lactação, suínos, roedores, cães e gatos.

A presença de *Prototheca* spp nas fezes de animais foi relatada após consumo de alimentos contaminados, pois os esporângios passam livremente através do trato digestivo (Pore & Shashan 1988). Este fato foi constatado por Costa et al. (2000) e Yamamura et al. (2008) onde bezerros alimentados com leite de vacas com mastite por *Prototheca* spp liberam o agente através das fezes.

Do gênero *Prototheca*, somente *P. zopfii* e *P. wickerhamii* são relatadas como causa de infecção em humanos e animais (Costa et al. 1997, Thiele & Bergmann 2002, Van Bezooijen & Newling 2002, Stenner et al. 2007, Salvadori et al. 2008).

Em um surto de mastite bovina, Costa et al. (1997) isolaram *P. zopfii* de amostras de fezes de bezerros e de vacas em lactação, teteiras, amostras de água de bebedouro, esgoto e do solo da pastagem, evidenciando o caráter ambiental da infecção. A descarga fecal aumenta a contaminação ambiental, favorecendo a transmissão do agente para outros hospedeiros. Pore & Shahan (1988) isolaram *Prototheca* spp de fezes de suínos e ratos; estes últimos podem servir de vetores contaminando a alimentação dos animais. Costa et al. (1998) descreveram o isolamento de *P. zopfii* das fezes de um proprietário rural, após consumo de queijo fresco produzido com leite de vacas com mastite por *P. zopfii*. O paciente apresentou distúrbio gastrintestinal, sugerindo que o microrganismo pode causar infecção em indivíduos saudáveis que consumam alimentos contaminados.

O isolamento destes microrganismos de amostras de esgoto demonstra a adaptação a ambientes modificados pelo homem, que contêm nutrientes necessários para o desenvolvimento e multiplicação (Costa et al. 1997). *Prototheca* spp possivelmente não se multiplica no trato digestivo dos animais, a sua multiplicação ocorre no meio ambiente rico em matéria orgânica e úmido. A alga também foi encontrada em alimentos úmidos deteriorados, podendo constituir-se em fonte de infecção para as diversas espécies animais que venham a consumi-los (Pore & Shahan 1988).

Prototecose foi descrita em algumas espécies animais assumindo vários aspectos clínicos, sendo a mastite bovina a que ocorre com maior frequência (Costa et al. 1996), seguida pela infecção em cães (Jagielski & Lagneau 2007). No Brasil, a apresentação clínica mais estudada é a mastite bovina, devido aos prejuízos causados e à ausência de terapia efetiva (Costa et al. 1996, 1997).

P. zopfii foi diagnosticada em rebanhos leiteiros onde ocorreram surtos de mastite. O isolamento de *Prototheca* de teteiras indica que a deficiência na higiene e manutenção do equipamento de ordenha pode ser responsável pela transmissão do microrganismo, mesmo após a imersão das mesmas em solução clorada (Costa et al. 1997).

Há relatos de introdução da enfermidade através da aquisição de animais infectados em rebanhos sem histórico de mastite por *Prototheca* spp (Brito & Veiga 1997).

Até o momento, a doença parece não apresentar importância epidemiológica em outros ruminantes domésticos (búfalos, ovinos e caprinos) e em equinos. A alga pode ser isolada de fezes de suínos, embora pareça não apresentar patogenicidade para a espécie (Siqueira et al. 2008).

Entre os relatos de prototecose em cães e gatos, observa-se que os autores não aprofundaram os estudos sobre os dados epidemiológicos, principalmente, no tocante à origem dos animais e ao ambiente em que vivem (Siqueira et al. 2008).

Infecção da pele por *Prototheca* spp no homem e em cães e gatos é comumente o resultado da contaminação de ferimentos ou áreas traumatizadas (Dipersio 2001, Thiele & Bergmann 2002, Jagielski & Lagneau 2007), mas a possibilidade de mecanismo de transmissão por insetos não pode ser descartada (Pore et al. 1983, Pore & Shashan 1988).

O período de incubação geralmente não é conhecido, mas em situações onde a lesão primária é relatada, acredita-se que seja de aproximadamente duas semanas (Dipersio 2001).

A prototecose humana é rara, mas observa-se o aumento da incidência em pacientes imunocomprometidos. Até 2007, 117 casos foram relatados em todo o mundo, dos quais 66%, 19% e 15% foram associados à infecção cutânea, sistêmica e bursites, respectivamente. Entre os indivíduos com infecção disseminada, 59% obtiveram cura (Lass-Florl & Mayr 2007). O risco de contrair a doença está associado à atividade rural e

de jardinagem, comprovando a importância do ambiente para a infecção (Siqueira et al. 2008).

ASPECTOS CLÍNICOS

Bovinos

Microrganismos do gênero *Prototheca* spp têm sido considerados como causa emergente de mastite em bovinos. A distribuição ubíqua do agente favorece a infecção ascendente da glândula mamária, caracterizando uma mastite ambiental (Bexiga et al. 2003, Buzzini et al. 2004, Vaz et al. 2005).

Os animais infectados podem apresentar mastite subclínica ou clínica (aguda ou crônica), sendo o quadro crônico a forma predominante, e a principal espécie envolvida é *P. zopfii* (Costa et al. 1997, Filippesen et al. 1999, Corbellini et al. 2001, Bexiga et al. 2003, Vaz et al. 2005, Bueno et al. 2006a, Yamamura et al. 2007).

Casos esporádicos de mastite por *Prototheca* spp podem ocorrer mesmo em rebanhos com bom manejo; já a forma endêmica está relacionada com condições inadequadas de higiene e alta contaminação ambiental (Costa et al. 1997, Yamamura et al. 2007).

Em animais infectados, a mastite pode persistir no período seco ou ocorrerem novas infecções que não permitem a regeneração adequada da glândula mamária, comprometendo a próxima lactação (Corbellini et al. 2001). A eliminação do agente no leite ocorre de forma intermitente, tornando difícil a detecção de todos os animais infectados (Costa et al. 1996, 1997).

O quadro subclínico se caracteriza pela baixa produção de leite e elevada contagem de células somáticas (CCS) (Bexiga et al. 2003, Buzzini et al. 2004). No entanto, podem ocorrer mastites com baixa CCS (Bueno et al. 2006a). Os animais com infecções

subclínicas podem apresentar alterações na composição do leite, podendo haver diminuições nos teores de gordura, lactose e sólidos totais, este decréscimo pode ser devido à degradação do glicerol e da glicose e por causa do dano no tecido glandular (Bueno et al. 2006b).

O quadro clínico agudo ocorre principalmente em surtos da enfermidade e se caracteriza pela acentuada redução da produção de leite, podendo ocorrer intenso processo inflamatório do úbere, com secreção glandular apresentando grumos e aspecto seropurulento ou aquoso (Brito & Veiga 1997, Bexiga et al. 2003, Bueno et al. 2006a, Yamamura et al. 2007). As alterações crônicas consistem no aumento da consistência do tecido glandular e alterações do leite (Langoni et al. 1995, Vaz et al. 2005, Bueno et al. 2006a).

Um caso de prototecose disseminada causada por *P. Zopfii* foi descrito em uma vaca. A disseminação ocorreu, provavelmente, pela imunossupressão causada pelo uso prolongado de corticóides e antibióticos para tratamento de retenção de placenta e mastite concomitantes. Do foco primário de infecção na glândula mamária houve disseminação do agente por via hematogênica para o coração, pulmões, rins, língua e diafragma (Taniyama et al. 1994).

Caprinos

A enfermidade em caprinos foi relatada pela primeira vez na região semi-árida do estado da Paraíba, Nordeste do Brasil, por Macedo et al. (2008). O animal apresentava perda de peso progressiva, dispnéia inspiratória, estertores e dermatite com nódulos proeminentes na junção muco-cutânea das narinas. Não apresentava evidência de doença preexistente ou imunossupressão. As lesões se estendiam até o vestíbulo nasal, obstruindo a passagem nasal e resultando em severos sinais respiratórios. O animal apresentou

nódulos amarelados, com cerca de 3 cm de diâmetro no tecido subcutâneo acima do osso nasal. A mucosa do vestíbulo nasal apresentava-se ulcerada com superfície fibrinonecrótica, que se estendia desde a extremidade as narinas até as conchas nasais. O agente foi identificado histologicamente como *P. wickerhamii*.

Recentemente, um novo caso de prototecose por *P. wickerhamii*, com características muito semelhantes ao anterior, foi observado no semi-árido da Paraíba, sugerindo que, em caprinos, a prototecose apresenta uma forma nasal característica. São desconhecidas as condições epidemiológicas nas quais ocorre a doença, mas é provável que os animais se infectem em açudes com pouca água e muita matéria orgânica (Camboim 2009).

Animais de Companhia

A prototecose em cães e gatos apresenta-se sob diferentes manifestações clínicas (cutânea, ocular e entérica). Em cães é causada, principalmente, por *P. zopfii*, sendo a colite hemorrágica a manifestação clínica mais freqüente, sugerindo que a via oral representa a principal porta de entrada do agente nesta espécie (Cook Jr et al. 1984, Hollingsworth 2000, Hosaka & Hosaka 2004, Stenner et al. 2007, Salvadori et al. 2008, Siqueira et al. 2008). Em gatos, *P. wickerhamii* está mais envolvida como agente etiológico da doença, na qual, predominam as lesões tegumentares na região da face e plano nasal. As lesões se caracterizam por nódulos, úlceras, crostas exsudativas e rinite (Dillberger et al. 1988, Ginel et al. 1997, Pérez et al. 1997, Siqueira et al. 2008).

Infecção sistêmica, após uso de terapia imunossupressiva, é relatada em cães com sinais clínicos sugestivos de comprometimento de diversos órgãos como pulmões, baço, fígado, trato digestório, olhos, língua e linfonodos (Pressler et al. 2005, Tsuji et al. 2006), causando diarreia (Hosaka & Hosaka 2004, Stenner et al. 2007, Salvadori et al. 2008,

Sapierzynski & Jaworska 2008), sinais nervosos (Hollingsworth 2000, Stenner et al. 2007, Salvadori et al. 2008), cardiovasculares ou renais (Pressler et al. 2005). Tsuji et al. (2006) diagnosticaram infecção sistêmica em cão causada por *P. wickerhamii*.

Humanos

No homem, a prototecose é causada principalmente por *P. wickerhamii* e se manifesta de três formas: cutânea, articular e sistêmica com curso agudo ou crônico. A infecção pode ocorrer em indivíduos imunocompetentes, os quais podem apresentar bursite e/ou infecções cutâneas localizadas, ou em indivíduos imunossuprimidos, nos quais a enfermidade pode ser disseminada (Thiele & Bergmann 2002, Lass-Flörl & Mayr 2007).

A forma cutânea é a mais observada e a porta de entrada é a pele traumatizada e feridas infectadas por outros agentes (Thiele & Bergmann 2002, Lass-Flörl & Mayr 2007). As lesões têm desenvolvimento lento e não curam espontaneamente; acometem a pele e tecido subcutâneo, principalmente de locais expostos do corpo como cabeça, pescoço e extremidades. A aparência é variável e inclui placas eritematosas, pápulas, crostas, nódulos, úlceras, granulomas cutâneos e erupções eczematosas (Dipersio 2001, Follador et al. 2001, Thiele & Bergmann 2002). A infecção, geralmente, permanece em áreas localizadas, contudo, a disseminação pode ser observada em indivíduos debilitados e imunocomprometidos (Jagielski & Lagneau 2007).

A forma articular apresenta-se principalmente como quadro de bursite do olecrano, que se manifesta por leve sensibilidade, moderado eritema e, ocasionalmente, drenagem. Esta forma da infecção ocorre, geralmente, associada a trauma (Dipersio 2001).

A forma sistêmica é tipicamente oportunista. Ocorre em pacientes com imunossupressão ou doença crônica. Os principais sítios de infecção incluem pele, tecido subcutâneo, intestino, sangue e baço (Lass-Flörl & Mayr 2007). Menos frequentemente

pode ocorrer meningite (Zhang et al. 2007) ou infecção do trato urinário (Van Bezooijen & Newling 2002). Em paciente leucêmico após transplante de células tronco, observou-se envolvimento de pulmões, rins, coração e fígado (Lass-Florl et al. 2004). Em muitos desses relatos são descritos fatores predisponentes como: AIDS, neoplasias, transplante, uso de esteróides, cateterização e intubação endotraqueal prolongada (Long et al. 1990, Dipersio 2001, Thiele & Bergmann 2002, Lass-Florl et al. 2004, Lass-Florl & Mayr 2007).

HISTOPATOLOGIA

No exame histológico, há exsudato inflamatório granulomatoso, com infiltrado de células linfóides, macrófagos, células gigantes e neutrófilos. Ao redor da lesão, há proliferação de tecido fibroso. O mais característico da lesão, principalmente nas colorações especiais para fungos, como ácido periódico Schiff (PAS) e Grocott metanamina de prata (GMS), é a presença de miríades de esporângios, contendo esporangiósporos internamente. Estas estruturas podem estar dentro de macrófagos ou livres entre o exudato. Os esporângios aparecem como estruturas ovais ou esféricas, sem brotamentos e rodeados por uma cápsula ou parede medindo 7-30 μm . Tanto *P. zopfii* quanto *P. wickerhamii* se reproduzem por septação interna resultando em esporangiósporos infectantes. *P. zopfii* tende a ser maior (7-30 μm) que *P. wickerhamii* (3-15 μm). É característico de *P. wickerhamii* a presença de esporangiósporos com um endósporo central arredondado, rodeado por uma coroa de endósporos, descrito como semelhantes à mórula, flor de margarida ou framboesa (Fig. 2A e B) (Lee et al. 1975, Cook Jr et al. 1984, Ginel et al. 1997; Pérez et al. 1997, Dipersio 2001, Bexiga et al. 2003, Pfaller & Diekema 2005, Bueno et al. 2006b, Tsuji et al. 2006, Carneiro et al. 2007, Jagielski & Lagneau 2007, Macedo et al. 2008).

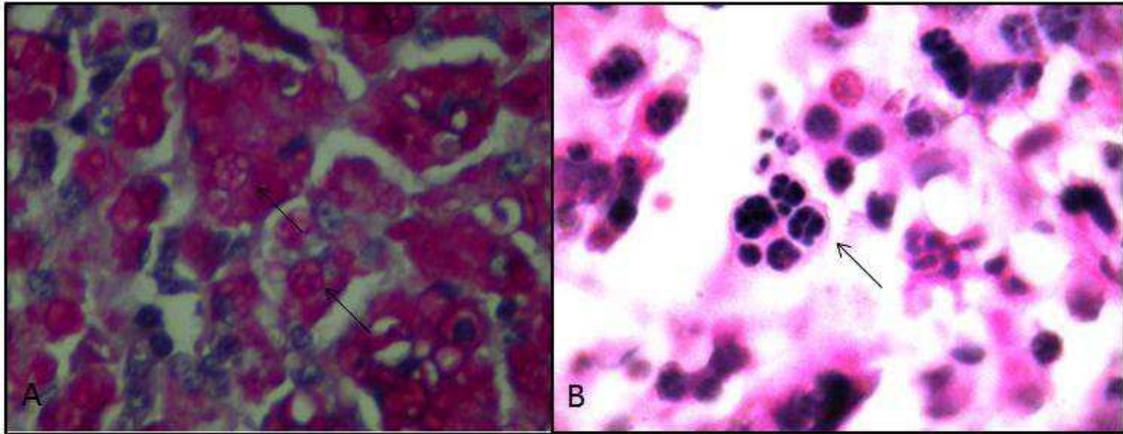


Fig. 2 *Prototheca wickerhamii*. (A) Lesão histológica contendo esporângios medindo de 3 a 15 μ m de diâmetro, algumas com vários esporangiósporos, formando estruturas semelhantes a mórula (setas) ou flor de margarida (“daisy-like”), coradas pelo PAS e, (B) hematoxilina-eosina. Obj 40.

DIAGNÓSTICO

Prototecose é uma doença raramente diagnosticada, provavelmente por ser pouco conhecida. Pode ser confundida com outras enfermidades, principalmente, com infecções fúngicas (Carneiro et al. 2007). Nos tecidos, alguns tipos de fungos podem apresentar aspectos morfológicos semelhantes aos da *Prototheca* spp e, macroscopicamente, as colônias brancas cremosas podem ser facilmente confundidas com leveduras (Thiele & Bergmann 2002).

São importantes para auxiliar no diagnóstico da prototecose informações sobre dados epidemiológicos, forma de apresentação da doença e histórico de falhas no tratamento. Entretanto, o diagnóstico definitivo só é possível com a utilização de recursos laboratoriais específicos.

No diagnóstico laboratorial, métodos convencionais de cultivo e identificação e histopatologia são as formas mais acuradas (Thiele & Bergmann 2002). A identificação é feita com base nas características morfológicas da colônia e microscópicas, mediante coloração de esfregaços com tinta nanquim, Gram, azul de metileno e azul de algodão, além das colorações especiais para fungos (Carneiro et al. 2007, Costa et al. 1999). A

determinação da espécie é realizada utilizando testes bioquímicos de assimilação de carboidratos e alcoóis, utilizando-se a assimilação de trealose para a diferenciação entre *P. wickerhamii* e *P. zopfii* (Pore 1998). Alternativamente, a diferenciação entre espécies pode ser realizada pelo sistema API 20C ou API 50C (Padhye et al. 1979).

Técnicas imunológicas, como a imunofluorescência direta, utilizando anticorpos específicos, são indicadas no diagnóstico (Sudman & Kaplan 1973). O teste imunoenzimático ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) também pode ser utilizado na detecção de imunoglobulinas específicas (IgA e IgG1), no soro de vacas com mastite, mostrando alta sensibilidade e especificidade (Roesler et al. 2001). O diagnóstico molecular, através da PCR e o sequenciamento de DNA, pode também ser empregado na identificação da prototose bovina e canina, visando à caracterização e diferenciação de espécies e biótipos de *Prototheca* spp (Tsuji et al. 2006, Möller et al. 2007, Osumi et al. 2008).

SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E TRATAMENTO

Os testes de susceptibilidade *in vitro* aos antibacterianos estão entre as principais ferramentas para um tratamento efetivo de doenças infecciosas. Vários estudos têm avaliado o perfil de suscetibilidade de *Prototheca* spp frente a antimicrobianos.

Nos testes de susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos, tanto *P. zopfii* quanto *P. wickerhamii* têm demonstrado alta resistência à maioria dos antibióticos (Lee et al. 1975, McDonald et al. 1984, Langoni et al. 1995, Vargas et al. 1998, Filippesen et al. 1999, Bexiga et al. 2003, Buzzini et al. 2004).

Nos testes de sensibilidade a antifúngicos, os resultados são bastante controversos, mas na maioria das pesquisas *Prototheca* spp têm demonstrado sensibilidade moderada

(Segal et al. 1976, McDonald et al. 1984, Bexiga et al. 2003, Buzzini et al. 2004, Lass-Förl et al. 2004, Tortorano et al. 2008).

Em relação ao tratamento de prototecose humana, antifúngicos como cetoconazol, itraconazol, fluconazol e anfotericina B, são as drogas mais comumente usadas, sendo esta última a que apresenta os melhores resultados (Lass-Florl & Mayr 2007). Geralmente, administração de antifúngicos e excisão cirúrgica em casos de lesões superficiais tem sucesso terapêutico, embora falhas no tratamento não sejam incomuns (Follador et al. 2001, Thiele & Bergmann 2002, Lass-Florl et al. 2004, Carneiro et al. 2007, Jagielski & Lagneau 2007, Lass-Florl & Mayr 2007, Zhang et al. 2007).

Em animais, não existe, até o momento, qualquer agente terapêutico eficaz (Bexiga et al. 2003). A resposta à terapia é insatisfatória e pela possibilidade de transmissão para outros animais e o homem não se recomenda o tratamento de animais doentes (Costa et al. 1997, Ginel et al. 1997, Pérez et al. 1997, Vargas et al. 1998, Melville et al. 1999, Bexiga et al. 2003, Stenner et al. 2007).

CONTROLE E PREVENÇÃO

A ação limitada das drogas, a inexistência de medicamentos efetivos e as características biológicas de *Prototheca* spp dificultam a preconização de medidas específicas de controle e reforçam a importância da educação sanitária para reduzir a exposição ao agente infeccioso, o risco zoonótico e a disseminação do agente por indivíduos infectados.

O consumo de leite cru, e de seus derivados contaminados, deve ser evitado, principalmente por indivíduos imunocomprometidos ou subnutridos, que são mais suscetíveis à infecção (Costa et al. 1998).

Separar animais doentes, manter o ambiente seco, limpo e exposto à luz solar, usar luvas no manuseio de animais doentes, além de remover materiais orgânicos, são medidas

higiênico-sanitárias simples e adequadas que podem diminuir as infecções por microrganismos ambientais (Corbellini et al. 2001, Siqueira et al. 2008). Considerando que o agente pode sobreviver na água, a qualidade desta deve ser sempre observada (Pore et al. 1983, Costa et al. 1998, Corbellini et al. 2001

O controle de mastite por *Prototheca* spp em rebanhos é altamente difícil e o descarte dos animais infectados é indicado uma vez que se tornam portadores; a eficiência terapêutica é baixa, as lesões na glândula mamária são irreversíveis e há risco potencial à saúde humana (Costa et al. 1997). Melville et al. (2002) citam que o nitrato de prata, a clorexidina e o sulfato de cobre apresentam propriedades efetivas contra o microrganismo, podendo ser realizado pre-dipping com clorexidina na profilaxia da mastite.

Deve-se manter monitoramento contínuo do rebanho e seguir as recomendações para controle de mastite, com ênfase na correta rotina de ordenha e higiene ambiental (Costa et al. 1999, Corbellini et al. 2001), cuidados relativos à aquisição de animais e encaminhamento de material suspeito para cultura microbiológica, método mais fidedigno de diagnóstico da prototecose (Brito & Veiga 1997, Costa et al. 2004, Bueno et al. 2006a).

REFERÊNCIAS

- Atkinson A.W., Gunning B.E.S. & John P.C.L. 1972. Sporopollenin in the cell wall of *Chlorella* and other algae: ultrastructure, chemistry and incorporation of ¹⁴C-acetate, studied in synchronous cultures. *Planta* 107:1-32.
- Bexiga R., Cavaco L. & Vilela C.L. 2003. Isolamento de *Prototheca zopfii* a partir de leite bovino. *Rev. Port. Ciências Vet.* 98(545):33-37.
- Brito M.A.V.P. & Veiga V.M.O. 1997. Mastite bovina causada por *Prototheca zopfii*: relato de um caso. *Ciência Rural* 27(4):681-684.
- Bueno V.F.F., Mesquita A.J. & Dias Filho F.C. 2006a. *Prototheca zopfii*: importante patógeno na etiologia da mastite bovina no Brasil. *Ciência Anim. Bras.* 7(3):273-283.
- Bueno V.F.F., Mesquita A.J., Neves R.B.S. Souza M.A., Ribeiro A.R., Nicolau E.S. & Oliveira A.N. 2006b. Epidemiological and clinical aspects of the first outbreak of bovine mastitis caused by *Prototheca zopfii* in Goiás State, Brazil. *Mycopathologia* 161:141-145.
- Buzzini P., Turchetti B., Facelli R., Baudino R., Cavarero F., Mattalia L., Mosso P. & Martini A. 2004. First large-scale isolation of *Prototheca zopfii* from milk produced by dairy herds in Italy. *Mycopathologia* 158:427-430.
- Camboim E.K.A. 2009. Prototecose por *Prototheca wickerhamii* em caprinos. Dissertação de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Centro de Saúde e Tecnologia Rural. Universidade Federal de Campina Grande. 71p.
- Carneiro F.P., Moraes M.A.P., Rebêlo A.M.G. & Coutinho A.M. 2007. Prototecose cutânea: relato de caso. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 40(4):466-468.
- Cook Jr. J.R., Tyler D.E., Coulter D.B. & Chandler F.W. 1984. Disseminated protothecosis causing acute blindness and deafness in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 184(10):1266-1272.

- Corbellini L.G., Driemeier D., Cruz C., Dias M.M. & Ferreiro L. 2001. Bovine mastitis due to *Prototheca zopfii*: clinical, epidemiological and pathological aspects in a Brazilian dairy herd. Trop. Anim. Health Prod. 33:463-470.
- Costa E.O., Ribeiro A.R., Melville P.A., Prada M.S., Carciofi A.C. & Watanabe E.T. 1996. Bovine mastitis due to algae of the genus *Prototheca*. Mycopathologia 133:85-88.
- Costa E.O., Melville P.A., Ribeiro A.R., Watanabe E.T. & Parolari C.F.F. 1997. Epidemiologic study of environmental sources in a *Prototheca zopfii* outbreak of bovine mastitis. Mycopathologia 137:33-36.
- Costa E.O., Melville P.A., Ribeiro A.R. & Watanabe E.T. 1998. Relato de um caso de consumo de queijo fresco contaminado com *Prototheca* spp. Revista Napgama (1):9-10.
- Costa E.O., Ribeiro A.R., Watanabe E.T., Garino Jr. F., Silva J.A.B. & Junqueira L. 1999. Controle de surto de mastite por *Prototheca zopfii* em uma propriedade leiteira. Revista Napgama 2(6):12-16.
- Costa E.O., Ribeiro A.R., Watanabe E.T., Garino Jr. F. & Silva J.A.B. 2000. Pesquisa de *Prototheca* sp em fezes de bezerros de propriedades que utilizavam o leite de animais com mastite no manejo alimentar dos mesmos em comparação com as que não utilizavam. Revista Napgama (1):20-22.
- Costa E.O., Garino Jr F., Ribeiro A.R., Watanabe E.T., Silva J.B. & Diniz L.S. 2001. Participação de animais silvestres na cadeia epidemiológica da mastite bovina por *Prototheca zopfii*. Revista Napgama 4(4):6-9.
- Costa E.O., Ribeiro M.G., Ribeiro A.R., Rocha N.S. & Nardi Júnior G. 2004. Diagnosis of clinical bovine mastitis by fine needle aspiration followed by staining electron microscopy in a *Prototheca zopfii* outbreak. Mycopathologia 158:81-85.

- Dickinson H.G. 1976. The deposition of acetolysis-resistant polymers during the formation of pollen. *Pollen & Spores* 18:321-334.
- Dillberger J.E., Homer B., Daubert D. & Altman N.H. 1988. Protothecosis in two cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 192(11):1557-1559.
- Dipersio J.R. 2001. *Prototheca* and protothecosis. *Clin. Microbiol Newsletter.* 23(15):115-120.
- Filippsen L.F., Moreira F.B., Sakashita A.T. & Bittencourt D.R. 1999. Prevalência da mastite bovina causada por *Prototheca zopfii* em rebanhos leiteiros, na região norte do Paraná. *Ciência Rural* 29(1):87-89.
- Follador I., Bittencourt A., Duran F. & Araújo M.G. 2001. Cutaneous protothecosis: report of the second Brazilian case. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 43(5):287-290.
- Ginel P.J., Pérez J., Molleda J.M., Lucena R. & Mozos E. 1997. Cutaneous protothecosis in a dog. *Vet. Rec.* 140(25):651-653.
- Gunnison D. & Alexander M. 1975. Basis for the resistance of several algae to microbial decomposition. *Applied Microbiol.* 29(6):729-738.
- Hollingsworth S.R. 2000. Canine protothecosis. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 30(5):1091-1101.
- Hosaka S. & Hosaka M. 2004. A case report of canine protothecosis. *J. Vet. Med. Sci.* 66(5):593-597.
- Jagielski T. & Lagneau P.E. 2007. General Review: Protothecosis. A pseudofungal infection. *J. Mycol. Méd.* 17:261-270.
- Jánosi S, Ratz F, Szigeti G, Kulcsar M, Kerényi J, Laukó T, Katona F & Huszenicza G. 2001. Review of the microbiological, pathological and clinical aspects of bovine mastitis caused by the alga *Prototheca zopfii*. *Vet. Quart.* 23(2):58-61.

- Langoni H., Domingues P.F., Funari S.R.C. & Dias H.L.T. 1995. *Prototheca zopfii* como agente de mastite bovina. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 47(5):727-732.
- Lass-Flörl C., Fille M., Gunsilius E., Gastl G. & Nachbaur D. 2004. Disseminated infection with *Prototheca zopfii* after unrelated stem cell transplantation for leukemia. J. Clin. Microbiol. 42(10):4907-4908.
- Lass-Flörl C. & Mayr A. 2007. Human protothecosis. Clin. Microbiol. Rev. 20(2):230-242.
- Lee W.S., Lagios M.D. & Leonards A. 1975. Wound infection by *Prototheca wickerhamii*, a saprophytic alga pathogenic for man. J. Clin. Microbiol. 2(1):62-66.
- Long E.G., Ebrahimzadeh A., Whit E.H., Swisher B. & Callaway C.S. 1990. Alga associated with diarrhea in patients with acquired immunodeficiency syndrome and in travelers. J. Clin. Microbiol. 28(6):1101-1104.
- Macedo J.T.S.A., Riet-Correa F., Dantas A.F.M. & Simões S.V.D. 2008. Cutaneous and Nasal Protothecosis in a Goat. Vet. Pathol. 45:352-354.
- McDonald J.S., Richard J.L. & Anderson A.J. 1984. Antimicrobial susceptibility of *Prototheca zopfii* isolated from bovine intramammary infections. Am. J. Vet. Res. 45(6):1079-1080.
- Melville P.A., Watanabe E.T., Benites N.R., Ribeiro A.R., Silva J.A.B., Garino Jr. F. & Costa E.O. 1999. Evaluation of the susceptibility of *Prototheca zopfii* to milk pasteurization. Mycopathologia 146:79-82.
- Melville P.A., Benites N.R., Sinhorini I.L. & Costa E.O. 2002. Susceptibility and features of the ultrastructure of *Prototheca zopfii* following exposure to copper sulphate, silver nitrate and chlorhexidine. Mycopathologia 156(1):1-7.
- Möller A., Truyen U. & Roesler U. 2007. *Prototheca zopfii* genotype 2-The causative agent of bovine *Protothecal* mastitis. Vet. Microbiol. 120:370-374.

- Osumi T., Kishimoto Y., Kano R., Maruyama H., Onozaki M., Makimura K., Ito T., Matsubara K. & Hasegawa A. 2008. *Prototheca zopfii* genotypes isolated from cow barns and bovine mastitis in Japan. *Vet. Microbiol.* 131:419-423.
- Padhye A.A., Baker J.G. & D'amato R.F. 1979. Rapid identification of *Prototheca* species by the API 20C system. *J. Clin. Microbiol.* 10(4):579-582.
- Pérez J., Ginel P.J., Lucena R., Hervás J. & Mozos E. 1997. Canine Cutaneous Protothecosis: an immunohistochemical analysis of the inflammatory cellular infiltrate. *J. Comp. Pathol.* 117:83-89.
- Pfaller M.A. & Diekema D.J. 2005. Unusual fungal and pseudofungal infections of humans. *J. Clin. Microbiol.* 43:1495-1504.
- Pore R.S., Barnett E.A., Barnes Jr W.C. & Walker J.D. 1983. *Prototheca* ecology. *Mycopathologia* 81:49-62.
- Pore R.S. 1985. *Prototheca* taxonomy. *Mycopathologia* 90:129-139.
- Pore R.S. & Shahan T.A. 1988. *Prototheca zopfii*: natural, transient, occurrence in pigs and rats. *Mycopathologia* 101:85-88.
- Pore R.S. 1998. *Prototheca*, a yeastlike alga, p. 883–887. In: Kurtzman C.P. & Fell J.W. (ed). *The yeasts - A taxonomic study*. Elsevier, New York.
- Pressler B.M., Gookin J.L., Sykes J.E., Wolf A.M. & Vaden S.L. 2005. Urinary tract manifestations of protothecosis in dog. *J. Vet. Int. Med.* 19(1):115-119.
- Ribeiro M.G., Langoni H., Silveira A.M., Ruffino S.M. 1998. Mastite bovina por *Prototheca zopfii*. Relato de caso e revisão de literatura. *Ver. Inst. Biol.* 60:1-7.
- Roesler U., Holger S. & Hensel A. 2001. Immunodiagnostic identification of dairy cows infected with *Prototheca zopfii* at various clinical stages and discrimination between infected and uninfected cows. *J. Clin. Microbiol.* 39(2):539-543.

- Salvadori C., Gandini G., Ballarini A. & Cantile C. 2008. Protothecal granulomatous meningoencephalitis in a dog. *J. Small Anim. Pract.* 49(10):531-535.
- Sapierzynski R. & Jaworska O. 2008. Protothecosis as a cause of chronic diarrhoea in a dog. *Poland J. Sci.* 11(3):225-229.
- Segal E., Padhye A.A. & Ajello L. 1976. Susceptibility of *Prototheca* species to antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 10(1):75-79.
- Siqueira A.K., Ribeiro M.G. & Salerno T. 2008. Prototecose em animais de companhia e aspectos da doença no homem. *Ciência Rural* 38(6):1794-1804.
- Stenner V.J., Mackay B., King T., Barrs V.R., Irwin P., Abraham L., Swift N., Lancer N., Bernays M., Hampson E., Martin P., Krockenberger M.B., Bosward K., Latter M. & Malik R. 2007. Protothecosis in 17 Australian dogs and a review of the canine literature. *Med. Mycol.* 45(3):249-266.
- Sudman M.S. & Kaplan W. 1973. Identification of the *Prototheca* species by immunofluorescence. *Appl Microbiol.* 25:981-990.
- Taniyama H., Okamoto F., Kurosowa T., Furuoka H., Kaji Y. & Matsukawa K. 1994. Disseminated protothecosis caused by *Prototheca zopfii* in a cow. *Vet. Path.* 31:123-125.
- Thiele D. & Bergmann A. 2002. Mini-review: Protothecosis in human medicine. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 204:297-302.
- Tortorano M.A.P, Dho G., Piccinini R., Dapra V. & Viviani M.A. 2008. In vitro activity of conventional antifungal drugs and natural essences against the yeast-like alga *Prototheca*. *J. Antimicrob. Chemother.* 61:1312-1314.
- Tsuji H., Kano R., Hirai A., Murakami M., Yanai T., Namihira Y., Chiba J. & Hasegawa A. 2006. An isolate of *Prototheca wickerhamii* from systemic canine protothecosis. *Vet. Microbiol.* 118(3-4):305-311.

- Van Bezooijen B.P.J. & Newling D.W.W. 2002. Protothecosis of the urinary tract. *J. Urol.* 167:252.
- Vargas A.C., Lazzari A., Santurio J.M., Alves S.H., Ferreira G. & Kreutz L.C. 1998. Isolation of *Prototheca zopfii* from a case of bovine mastitis in Brazil. *Mycopathologia* 142:135–137.
- Vaz A.K., Carneiro D.M.V.F., Wolff C., Dick W. & Luciano A.M. 2005. Mastite bovina por *Prototheca* sp. em Santa Catarina: Relato de Caso. *Rev. Ciências Agroveter.* 4(1):72-75.
- Yamamura A.A.M., Muller E.E., Giordano L.G.P., Cosenza M., Silva P.F.N. & Godoy A. 2007. Isolamento de *Prototheca* spp. de vacas com mastite, de leite de tanques de expansão e do ambiente dos animais. *Ciências Agrárias, Londrina*, 28(1):105-114.
- Yamamura A.A.M., Müller E.E., Freire R.L., Freitas J.C., Giordano L.G.P., Toledo R.S. & Ribeiro M.G. 2008. Fatores de risco associados à mastite bovina causada por *Prototheca zopfii*. *Ciência Rural* 38(3):755-760.
- Zhang Q.Q., Zhu L.P., Weng X.H., Li L. & Wang J.J. 2007. Meningitis due to *Prototheca wickerhamii*: rare case in China. *Med. Mycol.* 45(1):85-88.

CAPÍTULO II

Prototecose por *Prototheca wickerhamii* em caprinos

O presente trabalho foi formatado segundo as normas da **Revista Mycoses**, de acordo com o que estabelece a Norma n° 01/2007 de 09 de Abril de 2007, do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural – Campus de Patos - PB.

Prototecose por *Prototheca wickerhamii* em caprino

Exedito K. A. Camboim,¹ Felício Garino Júnior,¹ Antônio F. M. Dantas,¹ Sara V. D. Simões,¹ Márcia A. Melo¹, Edisio O. Azevedo¹, Rinaldo A. Mota² e Franklin Riet-Correa⁴

¹ Hospital Veterinário, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Patos, Patos, Paraíba, 58700-000, Brasil. ² Universidade Rural de Pernambuco. Rua Manuel de Medeiros S/N, Dois Irmãos, Recife, Brasil

Resumo. O objetivo deste trabalho é descrever um caso de prototecose por *P. wickerhamii* em caprino, caracterizar a prototecose como uma doença de caprinos e estudar os aspectos epidemiológicos, clínicos, patológicos e microbiológicos da doença nesta espécie. O animal apresentava acentuada dificuldade respiratória e lesões proliferativas nodulares na junção muco-cutânea e no interior da cavidade nasal. Na avaliação da susceptibilidade “*in vitro*” foi observada alta resistência aos antimicrobianos testados. O animal não apresentou cura após o tratamento com fluconazol. As lesões histológicas foram dermatite piogranulomatosa necrosante, rinite e osteomielite com miríades de esporângios, característico de *P. wickerhamii* e confirmado pelo exame microbiológico. A doença pode ser caracterizada como uma infecção crônica, rara, lentamente progressiva, que afeta caprinos imunologicamente competentes, causando lesões multifocais nodulares, ulcerativas, piogranulomatosas e necrosantes da mucosa do vestíbulo nasal e união muco-cutânea das narinas, que pode se estender aos tecidos circundantes, pele, mucosa e osso nasal.

Palavras-chaves: caprina, *Prototheca wickerhamii*, prototecose, semi-árido.

Correspondência: Franklin Riet-Correa, Hospital Veterinário, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Patos, Patos, Paraíba, 58700-000, Brasil.

E-mail: franklin.riet@pq.cnpq.br

Aceito para publicação em

Introdução

Prototecose é uma doença incomum de animais e humanos causada por microrganismos do gênero *Prototheca*, que são algas aclorofiladas, unicelulares e de distribuição cosmopolita. Já foram isolados em amostras de ambiente, de várias espécies animais, bem como de suas excreções e secreções (leite e fezes). Ocorre, especialmente, em zonas úmidas onde se concentra matéria orgânica e apresenta um elevado grau de resistência a diferentes condições ambientais, agentes químicos e físicos.¹⁻³

O gênero é composto por cinco espécies, *P. zopfii*, *P. moriformis*, *P. wickerhamii*, *P. ulmea* e *P. stagnora*.⁴ As espécies patogênicas, *P. zopfii* e *P. wickerhamii*, afetam principalmente hospedeiros com algum comprometimento do sistema imunológico. A maioria dos casos, em humanos, é causada pela *P. wickerhamii*^{5,6} e a *P. zopfii* afeta, principalmente, animais.⁷⁻⁹ A prototecose é uma doença emergente de animais e humanos.^{6,7}

Em bovinos, *P. zopfii* é responsável por causar mastite, subclínica ou clínica, refratária ao tratamento.^{7,9-11} Embora um caso disseminado com envolvimento da glândula mamária, coração, pulmões, rins, língua e diafragma tenha sido descrito.¹² Em cães e gatos, a enfermidade apresenta-se sob diferentes manifestações clínicas (cutânea, ocular e entérica) e é causada principalmente por *P. zopfii*. Infecções disseminadas apresentam-se envolvendo diversos órgãos.^{8,13-15}

Nos humanos, a doença pode se apresentar como infecção cutânea e/ou subcutânea, bursites e infecção sistêmica. A infecção pode ocorrer em indivíduos imunocompetentes causando bursite e/ou infecções cutâneas localizadas, ou indivíduos imunossuprimidos, nos quais a enfermidade pode ser disseminada.^{5,6,16}

Em caprinos, o único relato clínico ocorreu no Estado da Paraíba, nordeste do Brasil. O animal apresentava dispnéia inspiratória, estertores e dermatites com nódulos proeminentes na junção muco-cutânea do focinho. As lesões histopatológicas foram dermatite piogranulomatosa necrotizante e rinite com grande quantidade de esporos, característicos de *P. wickerhamii*.¹⁷

Objetivou-se com esse trabalho descrever um novo caso de prototecose causada por *P. wickerhamii* em caprinos e caracterizar a prototecose como uma doença de caprinos analisando os aspectos epidemiológicos, clínicos, patológicos e microbiológicos da doença nesta espécie.

Material e Métodos

Descrição do caso clínico

O animal em estudo era um caprino com três anos de idade, sem raça definida, proveniente de uma propriedade do município de Catingueira no Estado da Paraíba, Brasil e foi atendido no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande em novembro de 2007, com histórico de dificuldade respiratória há aproximadamente 3 meses e apresentado lesões proliferativas nodulares na junção muco-cutânea e no interior da cavidade nasal.

Os exames complementares realizados foram: hemograma, bioquímica sérica, histopatológico e cultura microbiológica de secreções, lesões e tecidos.

Foram coletadas duas amostras de sangue, com intervalo de nove meses, para contagem do número de hemácias, leucócitos, determinação do volume globular e determinação do teor de hemoglobina. Os níveis séricos de proteínas plasmáticas totais, uréia, creatinina e atividades séricas de gama glutamil transferase (GGT), fosfatase alcalina (FA) e aspartato amino transferase (AST) foram avaliadas utilizando analisador bioquímico automático (BIOPLUS® 2000).¹⁸

O perfil eletroforético de proteínas séricas foi realizado no Laboratório de Análises Clínicas Hermes Pardini, em Belo Horizonte – MG.

Foram coletadas amostras em *swabs* da cavidade nasal, do reto e secreção da glândula mamária e lesões para realização de cultivos microbiológicos. Estas amostras foram semeadas em ágar sangue ovino 5% (Blood Agar base – HiMedia, Mumbai, Índia), ágar Sabouraud dextrose (Sabouraud dextrose agar – HiMedia, Mumbai, Índia), ágar Sabouraud cloranfenicol (Sabouraud chloramphenicol agar – HiMedia, Mumbai, Índia), incubados a 30°C por 24-96 horas. Para isolamento e identificação de *Prototheca* spp. foram seguidas recomendações de Pore.⁴

Avaliou-se a eficácia do tratamento com antifúngico (fluconazol®; Claris Lifesciences Limited, Ahmedabad, Índia), na dose de 10 mg/kg/dia, utilizando-se inicialmente a via oral (60 dias) e, posteriormente, a via endovenosa (40 dias).

Em Setembro de 2008, o animal foi eutanasiado, em seguida, realizou-se a necropsia. Fragmentos das lesões observadas nas narinas e de diferentes tecidos (pulmão, coração, fígado, rim, baço, intestino, glândula mamária, linfonodos, sistema nervoso central, osso nasal, músculo e pele) foram coletados e acondicionados em recipientes

contendo formol tamponado a 10%, corados com hematoxilina-eosina, além de colorações especiais, como Metenamina Nitrato de Prata (GMS) e Ácido Periódico de Schiff (PAS).

Simultaneamente, fragmentos das lesões e de outros tecidos (pulmão, fígado, rim, baço, coração, glândula mamária, intestino e linfonodos) foram triturados e semeados nos mesmos meios de cultura citados para as amostras de *swabs* e secreção da glândula mamária.

Com o microrganismo isolado, foram realizados antibiogramas em meio Müller Hinton (Mueller Hinton Ágar – Difco, Detroit, USA), pelo método de difusão Kirby e Bauer conforme as Normas do CSLI.¹⁹ Foram utilizados os seguintes antimicrobianos (SENSIBIODISC - CECON, São Paulo, Brazil): tetraciclina (30mcg), cloranfenicol (30mcg), cefalotina (30mcg), cefoxitina (30mcg), ampicilina (10mcg), cefalexina (30mcg), gentamicina (10mcg), neomicina (10mcg), penicilina (10 UI), oxacilina (1 mcg), aztreonam (30mcg), amicacina (30mcg), norfloxacina (10mcg), cefotaxima (30mcg) e bacitracina (10 UI).

Foi realizado teste de concentração inibitória mínima (CIM) com 4 antifúngicos (PHARMA NOSTRA- São Paulo, Brazil): fluconazol (0.25 - 128 mg/L), anfotericina B (0.03 - 16 mg/L), itraconazol (0.03 - 16 mg/L) e nistatina (10 - 5000 UI/ ml) conforme as Normas do CSLI.¹⁹ Os antifúngicos foram diluídos em tubos de ensaio contendo BHI (Brain Heart Infusion – HiMedia, Mumbai, India). Foram inoculados em cada tubo 0,1 ml de solução de *P. wickerhamii*, na concentração 0,5 da escala de turvação de MacFarland. Os tubos foram incubados a 30°C por 48h. Após o período de incubação, as diluições foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose para verificação da inibição do crescimento.

Pesquisa de *Prototheca* spp. no ambiente, em bovinos e caprinos da propriedade de origem do animal

Na propriedade de origem do animal, avaliou-se a alimentação, o regime de criação e foi pesquisada a presença do agente nos demais animais e no ambiente. Foram realizadas três visitas com intervalos médios de 60 dias, sendo em cada visita, coletadas amostras de fezes, *swabs* nasais e leite dos animais da propriedade, assim como água e solo para realização de exames microbiológicos.

Foram coletadas amostras de leite de todas as vacas (10) e cabras (8) em lactação. Antes da coleta das amostras, os tetos foram lavados, secos e desinfetados com álcool 70%, coletando-se posteriormente 10 ml de leite de cada teto em tubos de ensaio

esterilizados e cultivados em ágar sangue ovino 5%, ágar Sabouraud dextrose e ágar Sabouraud cloranfenicol, incubadas a 30°C, por 24-96 horas.

Amostras em *swabs* da cavidade nasal e do reto das cabras foram armazenadas em tubos de ensaio esterilizados. As amostras em *swabs* foram inoculadas em BHI, incubados a 30°C por 24 horas e, posteriormente, cultivados de acordo como descrito para o cultivo e identificação de microrganismos nos tecidos.

Foram coletados 300 ml de amostras de água de açude e dos bebedouros dos animais, da qual, alíquotas de 50 ml foram centrifugadas a 3000 rpm, durante 10 minutos e o sedimento foi semeado em BHI e incubado por 24 horas a 30° C. Amostras de solo dos currais e áreas próximas ao açude foram coletadas em 5 pontos, para verificação da presença de *Prototheca* spp. no ambiente. As amostras foram diluídas em solução salina 0,9 %, homogeneizadas e cultivadas em BHI por 24 horas a 30° C. Após o enriquecimento, as amostras de água e solo foram cultivadas seguindo a técnica utilizada para amostras de leite e tecidos.

Resultados

Os sinais clínicos observados no exame inicial do animal com prototecose foram perda da condição corporal, respiração ruidosa, fluxo de ar expirado reduzido, insuflação das bochechas na expiração, secreção nasal muco-purulenta, lesões proliferativas nodulares de 0,3 a 0,5 cm de diâmetro na junção muco-cutânea e no interior da cavidade nasal (Fig. 1C e E). Durante o período de internamento do animal no HV, observou-se o agravamento dos sinais clínicos (Fig. 1D e F), apresentados inicialmente e, dez meses após, observou-se que o animal passou a apresentar marcante esforço inspiratório e expiratório, evidenciado por afundamento dos espaços intercostais durante a inspiração e contração da musculatura abdominal na expiração. Mesmo apresentando severos sinais respiratórios, o animal melhorou sua condição corporal (Fig. 1A e B).

Os resultados do estudo hematológico e de bioquímica sérica estão apresentados nas tabelas 1 e 2. Os resultados do perfil eletroforético de proteínas séricas estão apresentados na tabela 3.



Fig. 1 – Condição corporal da cabra (A) no momento que chegou ao Hospital Veterinário e (B) dez meses após apresentando melhor condição corporal, (C e E) lesões observadas ao exame inicial, apresentando nódulos na junção muco-cutânea, mucosa nasal e lábio, (D e F) lesões observadas dez meses após, com presença de vários nódulos ulcerados no vestibulo nasal, junção muco-cutânea e lábio, e um nódulo maior, ulcerado, na pele acima do osso nasal.

Tabela 1 Resultado do estudo hematológico em caprino com prototecose realizado em diferentes períodos

Parâmetros	Etapa	
	1ª avaliação	2ª avaliação *
Hemácias ($\times 10^6 \text{ mm}^3$)	11,5	9,8
Hemoglobina (g/dl)	6,6	7,6
Hematócrito (%)	23	23
VCM (μ^3)	20,2	23,8
CHCM (%)	28,7	33,1
Leucócitos (n/ml)	15.400	13.400
Neutrófilos (n/ml)	8.470	4.020
Eosinófilos (n/ml)	2.002	670
Linfócitos (n/ml)	4.774	8.710
Monócitos (n/ml)	154	0
PPT g/dl	8,4	10,0

*Intervalo de nove meses entre a realização dos exames, VCM = volume corpuscular médio, CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média.

Tabela 2 Resultado do estudo de bioquímica sérica em caprino com prototecose realizado em diferentes períodos

Parâmetros	Etapa	
	1ª avaliação	2ª avaliação *
Uréia (mg/dl)	18	35
Creatinina (mg/dl)	1,1	0,7
Proteínas Totais (g/dl)	7,4	8,2
Gama glutamil transferase (U/l)	44	50
Aspartato amino transferase (U/l)	124	119
Fosfatase Alcalina (U/l)	136	132

*Intervalo de nove meses entre a realização dos exames

Tabela 3 Resultado da concentração de proteínas totais, albumina, α_1 , α_2 , β_1 , β_2 e γ globulinas, relação entre albumina e globulinas (relação a/g) de caprino com prototecose realizado em diferentes períodos

Parâmetros	Etapa	
	1ª avaliação	2ª avaliação *
Albumina (g/dl)	2,25	2,95
Alfa 1 (g/dl)	0,14	0,06
Alfa 2 (g/dl)	0,64	1,07
Beta 1 (g/dl)	0,69	0,81
Beta 2 (g/dl)	0,60	0,60
Gama (g/dl)	3,78	3,82
Relação A/G	0,39	0,46
Proteínas Totais (g/dl)	8,10	9,30

*Intervalo de nove meses entre a realização dos exames

Não foi observada cura clínica, e nem microbiológica, após o tratamento, visto que, não houve melhora do quadro clínico e também o agente permanecia viável no animal.

No cultivo microbiológico das amostras das lesões coletadas no animal vivo e dos fragmentos das lesões na necropsia, foi isolada *P. wickerhamii*. No meio Sabouraud dextrose, foram observadas colônias com pigmento amarelo claro, bordas irregularmente onduladas com elevação central, com cerca de 2 a 5 mm de diâmetro (Fig. 2A). A observação microscópica na coloração azul de algodão revelou a presença de células esféricas, com 2,5 a 13 μ m de diâmetro, múltiplos esporangiósporos no seu interior, com aspecto de mórula, característico de *P. wickerhamii* (Fig. 2B). Nas provas de assimilação de carboidratos e alcoóis (auxonograma), obteve-se resultado negativo para propanol e positivos para frutose, galactose e trealose. Desta forma, o isolado foi classificado como *P. wickerhamii*. O agente não foi isolado em pulmão, fígado, rim, baço, coração, glândula mamária, intestino e linfonodos.

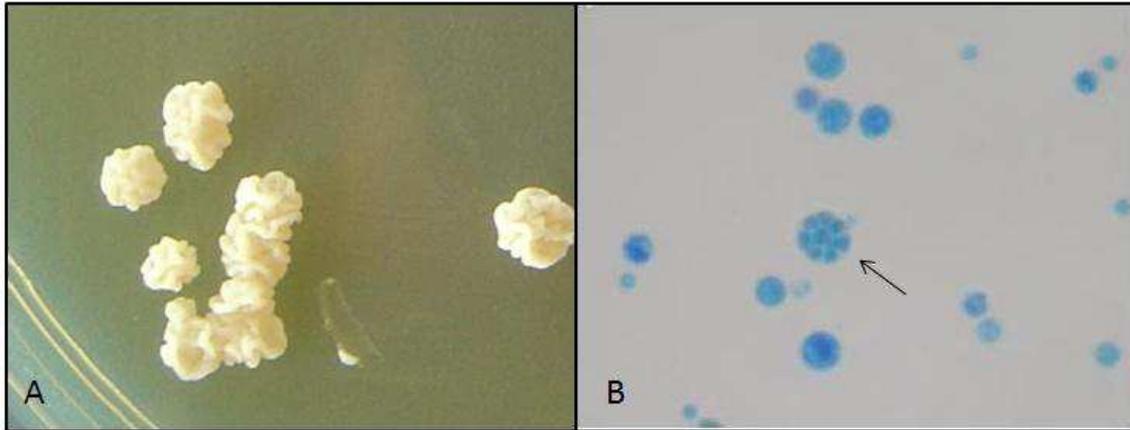


Fig. 2 - (A) Colônias de *P. wickerhamii* em meio agar Sabouraud dextrose, após 48 horas de incubação, medindo 2-5 mm de diâmetro, com pigmento amarelo claro, bordas irregularmente onduladas com elevação central, (B) coloração azul de algodão, presença de células esféricas, com 2,5 a 13 μ m de diâmetro, múltiplos esporangiósporos, com aspecto de mórula, característico de *P. wickerhamii*.

A susceptibilidade *in vitro* da amostra de *P. wickerhamii* demonstrou resistência aos antimicrobianos testados. Em relação aos testes de concentração mínima inibitória frente aos antifúngicos não foi observada efetividade a nenhuma das drogas testadas.

Na necropsia, foram observadas áreas ulceradas nodulares, amarelo-acinzentadas, multifocais a coalescentes, medindo de 0,3 a 1,0 cm de diâmetro, com superfície granular, bordos elevados e irregulares na pele da região muco-cutânea ao redor dos orifícios nasais (Fig. 1C-F). Observou-se também nódulo ulcerado medindo 1,5 x 2,0 x 1,0 cm de extensão, com superfície crostosa, bordos irregulares e centralmente avermelhada na porção medial da pele e tecido subcutâneo sobre o osso nasal (Fig. 1D), atingindo a superfície do perióstio e penetrando no osso nasal até a cavidade nasal. Havia também outros nódulos, não ulcerados, de aspecto semelhante no tecido subcutâneo, variando de 0,3 a 2,0 cm de diâmetro na mesma região. Ao corte sagital da cabeça, havia no vestíbulo nasal múltiplas massas irregulares semelhantes, variando de 0,5 a 2,0 cm de diâmetro, que se estendiam do assoalho da mucosa nasal direita e esquerda, até a porção inicial dos meatos (Fig. 3).



Fig. - 3 Corte sagital da cabeça, vestibulo nasal apresentando múltiplas massas irregulares, localizando-se do assoalho da mucosa nasal até a porção inicial dos meatos.

As lesões histológicas das biopsias e das amostras coletadas na necropsia eram semelhantes. Nas amostras coletadas na necropsia, observou-se dermatite, rinite e osteomielite piogranulomatosa e necrosante, caracterizada por áreas irregulares multifocais a coalescentes com necrose central, contendo miríades de estruturas arredondadas medindo de 3 a 15 μm de diâmetro, coradas fortemente basofílicas pela hematoxilina-eosina. Essas estruturas tinham aspecto de mórula, com vários esporangiósporos no seu interior, formando estruturas semelhantes à flor de margarida (“daisy-like”), morfologia característica de *P. wickerhamii* (Fig. 4A e B), melhor evidenciada pelo GMS e PAS. Circundando as áreas de necrose, observou-se acentuado infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear, constituído de macrófagos epitelióides e células gigantes multinucleadas tipo Langerhans, muitas com atividade fagocitária, contendo esporângios de *P. wickerhamii* no citoplasma. Havia também muitos linfócitos, plasmócitos, neutrófilos e alguns eosinófilos limitados por feixes ou cápsula de tecido conjuntivo fibroso adjacente às áreas de necrose.

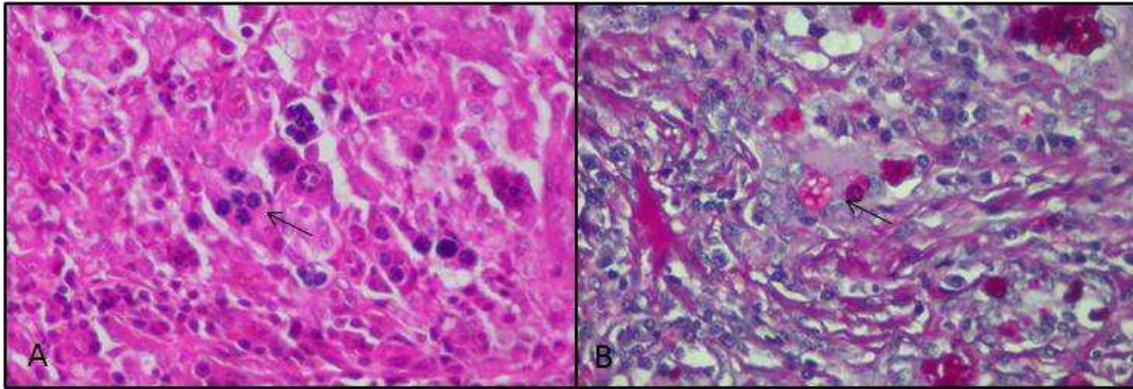


Fig. 4 - (A) Estruturas arredondadas medindo de 3 a 15 μ m de diâmetro com vários esporangiósporos, aspecto de mórula, característica de *P. wickerhamii*, coradas por hematoxilina - eosina-HE, (B) esporângio central rodeado por esporangiósporos corados pelo ácido periódico de Schiff-PAS.

Na propriedade de origem do animal, o rebanho era formado por 40 caprinos e 35 bovinos, sendo que 8 cabras e 10 vacas estavam em lactação e eram ordenhadas uma vez ao dia. Os animais eram criados no mesmo ambiente, alimentavam-se de pastagem nativa e bebiam água de açude. Na primeira visita em Novembro de 2007 o açude estava com pouca água e com grande quantidade de organismos aquáticos (Fig. 5).



Fig. 5 - Açude com pouca água, presença de muita lama e severa proliferação de organismos semelhantes a algas.

Em relação ao exame microbiológico das amostras de leite das vacas e cabras em lactação, verificou-se que *Prototheca* spp. não estava envolvida como agente causador de mastite, no entanto, identificou-se que três vacas apresentaram mastite por *Staphylococcus* spp e *Corynebacterium* spp. Nos caprinos, três animais apresentaram mastite infecciosa por *Staphylococcus* spp.. Nas amostras de swabs nasal e retal não houve crescimento de *Prototheca* spp.

Não foi isolada *Prototheca* spp. nas amostras de água e solo.

Discussão

No presente caso de prototecose causado por *P. wickerhamii*, os sinais clínicos, a evolução da doença e as lesões macro e microscópicas encontradas são muito semelhantes, e na mesma localização, que as descritas por Macedo,¹⁷ que relataram a enfermidade em caprinos pela primeira vez na região semi-árida do estado da Paraíba, Nordeste do Brasil. Isto caracteriza esta infecção como uma doença de caprinos, com características diferentes quanto à localização da lesão, em relação ao descrito em outras espécies e diferentemente ao que ocorre em outras espécies de animais domésticos, nas quais a prototecose é causada predominantemente por *P. zopfii*, em caprinos, esta forma de prototecose nasal é causada pela *P. wickerhamii*.

O animal atendido no Hospital Veterinário estava em deficiente estado nutricional, que melhorou consideravelmente ao longo do tempo, mesmo com a progressão da doença, sugerindo que a infecção não comprometia o estado fisiológico e o status imunológico do animal, comprovado mediante os exames laboratoriais que apresentaram resultados dentro dos padrões normais para a espécie (fórmula leucocitária e diferentes frações de globulinas séricas normais).²⁰⁻²²

O não isolamento de *P. wickerhamii* das amostras do ambiente da propriedade não permite tirar conclusões sobre a fonte de infecção, entretanto, é provável que a infecção tenha iniciado pela contaminação de feridas da região das narinas com água contaminada. O semi-árido brasileiro, onde a doença foi descrita, caracteriza-se por apresentar clima semi-árido tropical, altas temperaturas, baixa precipitação pluviométrica com longos períodos de estiagem durante os quais há uma reduzida oferta de água. Águas de açudes quase totalmente secos apresentam alta concentração de matéria orgânica, condição necessária para o desenvolvimento e multiplicação do agente. Esta situação estava ocorrendo no momento da observação deste caso.

A observação de dois casos de prototecose em caprinos sugere que a prototecose nesta espécie é uma doença esporádica, com baixa frequência. Os dois casos observados representam 0,17% dos 1186 caprinos atendidos pelo HV no período 2000-2007. Além disso, apresenta baixo potencial de disseminação evidenciado pelo aparecimento de apenas um caso clínico em cada rebanho; havia 40 caprinos no rebanho em estudo e 200 no descrito por Macedo¹⁷ e pelo fato da cabra acometida, apesar de ser ordenhada junto com os demais animais do rebanho, ser o único animal a apresentar a infecção.

Não se pode descartar a possibilidade de que a doença ocorra em outras propriedades com frequência maior do que a detectada até o momento, já que casos isolados podem estar ocorrendo em criatórios de caprinos do semi-árido, sem que chegue ao conhecimento dos veterinários.

A resistência a todos os antibióticos e antifúngicos testados, são semelhantes aos encontrados por outros autores para *P. zopfii* e *P. wickerhamii*^{11,23-27} e a não resposta a administração de fluconazol, comprova as dificuldades para o tratamento da doença. Neste aspecto a única recomendação que pode ser feita é a excisão cirúrgica da lesão, se for detectada nos estágios iniciais, ou o descarte do animal, evitando desta forma que o agente esteja sendo disseminado no ambiente de criação dos animais e possa ser transmitido a outros hospedeiros.

Em conclusão, prototecose em caprinos é causada por *P. wickerhamii* é uma infecção crônica, lentamente progressiva, que afeta caprinos imunologicamente competentes, causando lesões multifocais nodulares, ulcerativas, piogranulomatosas e necrosantes da mucosa do vestíbulo nasal, união muco-cutânea das narinas, tecidos circundantes e osso nasal.

Referências

1. Melville PA, Watanabe ET, Benites NR, Ribeiro AR, Silva JAB, Garino Jr. F, Costa EO. Evaluation of the susceptibility of *Prototheca zopfii* to milk pasteurization. *Mycopathologia* 1999; **146**:79-82.
2. Melville PA, Benites NR, Sinhorini IL, Costa EO. Susceptibility and features of the ultrastructure of *Prototheca zopfii* following exposure to cooper sulphate, silver nitrate and chlorexidine. *Mycopathologia* 2002; **156** (1):1-7.
3. Pore RS, Barnett EA, Barnes Jr. WC, Walker JD. *Prototheca* ecology. *Mycopathologia* 1983; **81**: 49-62.
4. Pore RS. *Prototheca*, a yestlike alga. In: Kurtzman CP, Fell JW. *The yeasts - A taxonomic study*. New York: Elsevier 1998: 883–887p.
5. Pfaller MA, Diekema DJ. Unusual fungal and pseudofungal infections of humans. *J Clin Microbiol* 2005; **43** (4) 1495–1504.
6. Lass-Flörl C, Mayr A. Human protothecosis. *Clin Microbiol Rev* 2007; **20** (2): 230-242.
7. Costa EO, Melville PA, Ribeiro AR, Watanabe ET, Parolari CFF. Epidemiologic study of environmental sources in a *Prototheca zopfii* outbreak of bovine mastitis. *Mycopathologia* 1997; **137**: 33-36.
8. Hosaka S, Hosaka M. A Case Report of Canine Protothecosis. *J Vet Med Scienc* 2004; **66** (5): 593–597.
9. Bueno VFF, Mesquita AJ, Neves RBS, Souza MA, Ribeiro AR, Nicolau ES, Oliveira AN. Epidemiological and clinical aspects of the first outbreak of bovine mastitis caused by *Prototheca zopfii* in Goiás State, Brazil. *Mycopathologia* 2006; **161**: 141–145.
10. Corbellini LG, Driemeier D, Cruz C, Dias MM, Ferreiro L. Bovine mastitis due to *Prototheca zopfii*: clinical, epidemiological and pathological aspects in a brazilian dairy herd. *Trop Anim Health Product* 2001; **33**: 463-470.
11. Bexiga R, Cavaco L, Vilela CL. Isolamento de *Prototheca zopfii* a partir de leite bovino. *Rev Port Ciênc Vet* 2003; **98** (545): 33-37.
12. Taniyama H, Okamoto F, Kurosowa T, Furuoka H, Kaji Y, Matsukawa K. Disseminated protothecosis caused by *Prototheca zopfii* in a cow. *Vet Path* 1994; **31**:123-125.
13. Hollingsworth SR. Canine protothecosis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2000; **30** (5): 1091-1101.

14. Tsuji H, Kano R, Hirai A, Murakami M, Yanai T, Namihira Y, Chiba J, Hasegawa A. An isolate of *Prototheca wickerhamii* from systemic canine protothecosis. *Vet Microbiol* 2006; **118** (3-4): 305-311.
15. Salvadori C, Gandini G, Ballarini A, Cantile C. *Protothecal* granulomatous meningoencephalitis in a dog. *J Small Anim Pract* 2008; **49** (10): 531-535.
16. Thiele D, Bergmann A. Mini-review: Protothecosis in human medicine. *Intern J Hyg Environ Health* 2002; **204**: 297-302.
17. Macedo JTSA, Riet-Correa F, Dantas AFM, Simões SVD. Cutaneous and Nasal Protothecosis in a Goat. *Vet Pathol* 2008; **45**: 352–354.
18. Matos MS, Matos PF. *Laboratório Clínico Médico-Veterinário*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu 1988, 238 p.
19. CSLI - *Committee Standards for Clinical Laboratory Institute*. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard. Second edition, document M27-A2. Committee Standards for Clinical Laboratory Institute, Wayne, Pennsylvania 1987-1898, United States, 2002.
20. Kaneko JJ. Serum proteins and dysproteinemias. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 5th ed. San Diego: Academic Press 1997; 317-367.
21. Santarosa KT, Rocha e Silva RC, Silva JBA, Soto-Blanco B. Valores de referência para o perfil eletroforético de proteínas séricas em cabras. *Arch Vet Scienc* 2005; **10** (3): 46-48.
22. Bezerra LR, Ferreira AF, Camboim EKA, Justiniano SV, Machado PCR, Gomes BB. Perfil hematológico de cabras clinicamente sadias criadas no cariri paraibano. *Ciênc agrotec* 2008; **32** (3): 955-960.
23. Segal E, Padhye AA, Ajello L. Susceptibility of *Prototheca* Species to Antifungal Agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1976; **10** (1): 75-79.
24. Langoni H, Domingues PF, Funari SRC, Dias HLT. *Prototheca zopfii* como agente de mastite bovina. *Arq Bras Med Vet Zootec* 1995; **47** (5): 727–732.
25. Vargas AC, Lazzari A, Santurio JM, Alves SH, Ferreira G, Kreutz LC. Isolation of *Prototheca zopfii* from a case of bovine mastitis in Brazil. *Mycopathologia* 1998; **142**: 135–137.
26. Buzzini P, Turchetti B, Facelli R, Baudino R, Cavarero F, Mattalia L, Mosso P, Martini A. First large-scale isolation of *Prototheca zopfii* from milk produced by dairy herds in Italy. *Mycopathologia* 2004; **158**: 427–430.

27. Tortorano MAP, Dho G, Piccinini R, Dapra V, Viviani M A. In vitro activity of conventional antifungal drugs and natural essences against the yeast-like alga *Prototheca*. *J Antimicrob Chemother* 2008; **61**: 1312–1314.

CONCLUSÕES

A elaboração do presente trabalho permite concluir que:

- A prototecose em caprinos, causada por *P. wickerhamii* é uma doença com características diferentes da prototecose em outras espécies;
- Em caprinos, a prototecose é uma doença crônica, nodular, ulcerativa da junção mucocutânea das narinas, porção inicial do vestíbulo nasal e pele da face;
- A prototecose em caprinos apresenta baixa frequência e baixa capacidade de disseminação para os demais animais do rebanho.

• INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Objetivo e política editorial

O objetivo da revista **Pesquisa Veterinária Brasileira** é contribuir, através da publicação dos resultados de pesquisa e sua disseminação, para a manutenção da saúde animal que depende, em grande parte, de conhecimentos sobre as medidas de profilaxia e controle veterinários.

Com periodicidade mensal, a revista publica trabalhos originais e artigos de revisão de pesquisa no campo da patologia veterinária no seu sentido amplo, principalmente sobre doenças de importância econômica e de interesse para a saúde pública.

Apesar de não serem aceitas comunicações ("Short communications") sob forma de "Notas Científicas", não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve porém conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo.

Os trabalhos, em 3 vias, escritos em português ou inglês, devem ser enviados, junto com disquete de arquivos (de preferência em Word 7.0), ao editor da revista **Pesquisa Veterinária Brasileira**, no endereço abaixo. Devem constituir-se de resultados ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, os editores, com a assistência da Assesoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias.

Apresentação de manuscritos

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em **Título, Abstract, Resumo, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões** (ou combinações destes três últimos), **Agradecimentos** e **Referências**:

a) o **Título** do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho;

b) um **Abstract**, um resumo em inglês, deverá ser apresentado com os elementos constituintes observados nos artigos em português, publicados no último número da revista, ficando em branco apenas a paginação, e, no final, terá indicação dos *index terms*;

c) o **Resumo** deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, dando os mais importantes resultados e conclusões; será seguida da indicação dos termos de indexação; nos trabalhos em inglês, **Resumo** e **Abstract** trocam de posição e de constituição (veja-se como exemplo sempre o último fascículo da revista);

d) a **Introdução** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

e) em **Material e Métodos** devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores;

f) em **Resultados** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos; quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições; é conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos, ao invés de apresentá-los em quadros extensos;

g) na **Discussão** os resultados devem ser discutidos diante da literatura; não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

h) as **Conclusões** devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

i) os **Agradecimentos** devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

j) a lista de **Referências**, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando os nomes de todos os autores, o título de cada publicação e, por extenso ou abreviado, o nome da revista ou obra, usando as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT, *Style Manual for Biological Journals* (American Institute for Biological Sciences) e/ou *Bibliographic Guide for Editors and Authors* (American Chemical Society, Washington, D.C.).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as normas abaixo:

a) os trabalhos devem ser apresentados em uma só face do papel, em espaço duplo e com margens de, no mínimo, 2,5 cm; o texto será escrito corridamente; quadros serão feitos em folhas separadas, usando-se papel duplo ofício, se necessário, e anexados ao final do trabalho; as folhas, ordenadas em texto, legendas, quadros e figuras, serão numeradas seguidamente;

b) a redação dos trabalhos deve ser a mais concisa possível, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados um pouco acima da linha de escrita, após a palavra ou frase que motivou a nota; essa numeração será contínua; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada; todos os quadros e todas as figuras serão mencionados no texto; estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes; *Resumo* e *Abstract* serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas;

c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional do(s) autor(es);

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema "autor e ano"; trabalhos de dois autores serão citados pelos nomes de ambos, e de três ou mais, pelo nome do primeiro, seguido de "et al.", mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita pelo acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos; todos os trabalhos citados terão suas referências completas incluídas na lista própria (Referências), inclusive os que tenham sido consultados indiretamente; no texto não se fará menção do trabalho que tenha servido somente como fonte; este esclarecimento será acrescentado apenas ao final das respectivas referências, na forma: "(Citado por Fulano 19...)"; a referência do trabalho que tenha servido de fonte será incluída na lista uma só vez; a menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita, de preferência, no próprio texto, colocada em parênteses, com citação de nome(s) ou autor(es); nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará

apenas por vírgulas, exemplo: (Flores & Houssay 1917, Roberts 1963a,b, Perreau et al. 1968, Hanson 1971);

f) a lista das referências deverá ser apresentada com o mínimo de pontuação e isenta do uso de caixa alta, sublinhando-se apenas os nomes científicos, e sempre em conformidade com o padrão adotado no último fascículo da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As **figuras** (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) deverão ser apresentadas em tamanho maior (cerca de 150%) do que aquele em que devam ser impressas, com todas as letras ou sinais bem proporcionados para assegurar a nitidez após a redução para o tamanho desejado; parte alguma da figura será datilografada; a chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura; desenhos deverão ser feitos com tinta preta em papel branco liso ou papel vegetal, vedado o uso de papel milimetrado; cada figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte superior da figura; fotografias deverão ser apresentadas em branco e preto, em papel brilhante, e sem montagem, ou em diapositivos (*slides*) coloridos; somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras será em cores; para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

4. As legendas explicativas das figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis e serão apresentadas em folha separada que se iniciará com o título do trabalho.

5. Os **quadros** deverão ser explicativos por si mesmos; cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para agrupamento de colunas; não há traços verticais; os sinais de chamada serão alfabéticos, começando de *a* em cada quadro, e as notas serão lançadas logo abaixo do quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto, à esquerda.

Embrapa-CNPAB/PSA
Km 47 - Seropédica
23851-970 Rio de Janeiro RJ Brasil
Tel.: +55 21 2682-2940
Tel./Fax: +55 21 2682-1081



colegio@cbpa.org.br

MYCOSES

Diagnosis, Therapy and Prophylaxis of Fungal Diseases

TopAuthor Guidelines

MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscripts are submitted to *mycoses* online, i.e. electronically, from the corresponding author's *Mycoses* Manuscript Central account. You will need your files in an electronic format, an Internet connection, and a user ID and password for the site. To begin a new submission, go to <http://mc.manuscriptcentral.com/myc> and log in or create an account to get your user ID and password. Full instructions are provided on the site.

If assistance is needed, the Editorial Office can be contacted and will readily provide any help users need to upload their manuscripts.

Electronic

submission

Manuscripts should be uploaded as Word (.doc) or Rich Text Format (.rft) files plus separate figure files. JPEG, TIFF or EPS files are acceptable for submission, but only high-resolution JPEG, TIFF or EPS files are suitable for printing. The files will be automatically converted to a PDF document on upload and will be used for the review process. The text file must contain the entire manuscript including title page, abstract, text, references, tables, and figure legends, but *no* embedded figures. Fig tags should be included in the file. Manuscripts should be formatted as described in *mycoses'* Author Guidelines (below). When preparing your file, please use only standard fonts such as Times, Times New Roman or Arial for text, and Symbol font for Greek letters, to avoid inadvertent character substitutions. In particular, please do not use Japanese or other Asian fonts. Do not use automated or manual hyphenation.

For more information on preparing manuscripts for online submission, please read the detailed instructions at <http://mc.manuscriptcentral.com/myc>. Additional help is available by emailing support@scholarone.com/.

Authors may provide names of potential reviewers for their manuscript. All acceptable material submitted for publication is forwarded to the Deputy Editor in charge of the particular field who together with at least two further referees makes a judgement on the paper. The votes of the independent referees as well a preliminary suggestion of acceptance or rejection is forwarded by the Deputy Editor to the Editor-in-Chief who makes the final decision. Authors must inform the Editor of any possible conflict of interest capable of influencing their judgement, and if necessary, a disclaimer will be included.

Revised manuscripts must be uploaded within 2 months of authors being notified of conditional acceptance pending satisfactory revision. Authors resubmitting manuscripts should follow the same procedures as for submission of new manuscripts. If accepted, papers become the copyright of the journal.

After acceptance please make sure that the final manuscript and figure files are uploaded. **The figures must be high-resolution scans** (JPEG, TIFF or EPS files). Detailed information on our digital illustration standards is available at <http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/illustration.asp>

COPYRIGHT ASSIGNMENT

Authors are no longer required to assign copyright in their paper. Instead authors are required to assign the exclusive licence to publish their paper to Blackwell Publishing and *mycoses*. Assignment of the exclusive licence is a condition of publication and papers will not be passed to the publisher for production unless licence has been assigned. (Papers subject to government or Crown copyright are exempt from this requirement). Please download the [Copyright Transfer Agreement form](#) here and send it to the Production Editor via email: myc@oxon.blackwellpublishing.com or fax: +65 6511 8288.

TEXT

Authors should aim for a concise readable style. Spelling should follow the *Concise Oxford Dictionary*, and *The Oxford Dictionary for Writers and Editors*. The Editor reserves the right to make corrections, both literary and technical, to the papers.

All pages must be numbered consecutively in the upper right-hand corner of each page. Starting with the title page as p.1, the pages should be numbered in the following order: title page, summary and key words, text, acknowledgements, references, tables, figure legends.

The following items should each start on a separate page.

Title

Page

This should bear (1) the title, (2) the names of all authors, (3) the institutions of origin with brief addresses, (4) a short title of not more than 50 characters (including spaces) to be used as a running head, (5) a list of up to eight key words for indexing purposes, and (6) the name and full postal address (with phone and fax numbers and **e-mail address**) of the author who will be responsible for reading the proofs (the corresponding author). The corresponding author must keep the *mycoses* office informed of any change in details until the paper is published. Authors should keep a copy of their manuscript.

Summary

Normally in less than 210 words, this should indicate clearly the scope and main conclusions of the paper. Original articles should have a structured abstract, comprising the five headings: Background, Objectives, Patients/Methods, Results and Conclusions.

Main

Text

Papers should be divided into sections headed (1) introduction, (2) materials and methods (or patients and methods/subjects and methods if human patients/subjects were used), (3) results, (4) discussion and (5) acknowledgements. Avoid an excess of sub-headings - two further divisions, if necessary, should be adequate.

The introduction should explain why the work was done and briefly introduce the scope and contents of the paper. Essential details should be included in materials and methods, including experimental design and statistical analysis. Results should be recorded in the past tense. The discussion should present the author's results in the broader context of other work on the subject. Acknowledgements should be as brief as possible.

REFERENCES

Please verify your references before submission and send them as a plain, unstructured list. We recommend the use of a tool such as EndNote or Reference Manager for reference management and formatting. Avoid using 'endnote' programs for the electronic copy. All references must be cited in numerical order in the text following the Vancouver system. The numbers of references should appear in the text in brackets e.g. [1, 21] or [1-4]. If giving the names of authors in the text the following form should be used: Brown & Smith [1] or Brown *et al.* [2] if there are more than two authors. Unpublished observations and personal communications may be included in the text only.

The reference list should show the references in numerical order as they appear in the text. References should include the following: (1) authors (surname followed by initials), (2) year, (3) title of (a) article or (b) chapter, (4) editors (if a book), (5) title of (a) journal or (b) book, (6) volume number, (7) place of publication and name of publisher (if a book), and (8) first and last page numbers of (a) article or (b) chapter. Journal titles should be abbreviated according to the system adopted in *Index Medicus*.

The following format should be used:

Journal

articles

(List all authors if six or fewer, list the first three then add *et al.* if there are seven or more).

1 Bloch B, Kretzel A. Econazole nitrate in the treatment of *Candida vaginitis*. *S Afr Med J* 1984; **58**: 314-472.

Books

2 Weinstein L, Swartz MN. Pathogenic properties of invading microorganisms. In: Sodeman, W. A. Jr & Sodeman, W. A. (eds) *Pathogenic Physiology: Mechanisms of Disease*. Philadelphia: W. B. Saunders, 1974: 457-72.

Work that has been submitted but not accepted for publication should not appear in the reference list but may appear in the text as unpublished observations. Work that has been accepted but not published should be included in the reference list stating the journal in which it is to appear followed by '(in press)'. Further details should be supplied as soon as possible.

LETTERS TO THE EDITOR

There are no keywords required. The references **must be integrated into the text** (Author AA et al., Journal 2002; 1: 242) or (Book author AA. Book Title, 2nd Edition, Publisher, Place, 1996).

TABLES

These must be numbered consecutively with arabic numerals and typed on separate sheets carrying an appropriate legend and presented in a way that makes the table self-explanatory.

Numerical results should be expressed as means with the relevant standard errors and/or statistically significant differences, quoting probability levels (P-values). Three significant figures are usually sufficient for mean values and standard errors should be quoted two or three more decimals than the mean. The only lines appearing in the table should be horizontal and all decimals should be aligned in columns. The placement of all tables should be indicated in the text, being referred to as Table 1 or Tables 2 and 3.

FIGURES

Figures should be numbered in sequence in Arabic numerals as they appear in the text. Labels, lettering and symbols etc. must be professionally prepared and should be uniform. Lines should be of sufficient thickness to stand reduction (no less than 4 mm wide for a 50% reduction), and letters should be a minimum of 14 pt Times New Roman or an equivalent size. Acceptable symbols for experimental points are μ , r, o, \sim , p, ϕ . The symbols + and \times will not be accepted.

Legends should be typed on a separate sheet and consist of a short title together with a brief explanatory paragraph. The legend must make the meaning of each figure

understandable without further reference to the text. Photomicrographs should state the original magnification.

The position of all figures should be indicated in the text and should be referred to as Fig. 1 or Figs 1 and 3. Figure 1 should be written out in full if at the beginning of a sentence.

Colour photos can be reproduced in black and white (with a possible loss of contrast). It is the policy of *Mycoses* for authors to pay the full cost for the reproduction of their colour artwork. Therefore, please note that if there is colour artwork in your manuscript when it is accepted for publication, Blackwell Publishing require you to complete and return a colour work agreement form before your paper can be published. This form can be downloaded as a PDF from the internet. If you are unable to access the internet, or are unable to download the form please contact the Editorial Office and they will be able to e-mail or fax the form to you. Once completed please return the form to the Editorial Office. **Any article received by Blackwell Publishing with colour artwork will not be published until the form has been returned.**

Electronic

Artwork

Vector graphics (e.g. line artwork) should be saved in Encapsulated Postscript Format (EPS), and bitmap files (e.g. photographs) in Tagged Image File Format (TIFF). Please do not use any pixel-oriented programmes. Scanned figures (only in TIFF format) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size. Colour graphics should be created using the CMYK colour palette (print colours), not RGB (monitor colours). There is a charge for alterations to figures when carried out by the publisher.

Full details of submission of figures in electronic format are available at: <http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/illustration.asp>

If submitted as hardcopy, figures should be submitted as glossy prints in duplicate and preferably with a transparent overlay for protection. The overlay should be used to indicate masking instructions, lettering or arrows. Each figure should bear the number, author's name and an arrow to indicate the top in soft pencil on the reverse. If figures have more than one part, each part should be labelled (preferably) in the top left-hand corner with lower-case letters in parentheses e.g. a figure with two parts would be labelled (a) and (b). In the text this should be referred to as Fig. 1a or Figs 2a, b. Figures should be planned to fit the printed column, i.e. 7.9 cm wide for single column and 16.5 cm wide for double column.

Photographs can be up to twice the reproduction size and must be unmounted glossy prints showing good detail and moderate contrast.

UNITS, SYMBOLS and ABBREVIATIONS

SI (Système International) units should be used and should conform with the lists printed *Units, Symbols and Abbreviations - A Guide for Biological and Medical Editors and Authors* 4th edn as published by the Royal Society of Medicine. Nomenclature of disease should follow the *International Classification of Disease*, published by the World Health Organization, as far as possible.

When first mentioned, cumbersome medical names should be abbreviated for later reference in the text. Latin bi-nominals should abbreviate the genera to the initial letter after the first mention unless it begins a sentence.

Doses of drugs should be given as unit weight per body weight, e.g. mmol kg^{-1} . Rates should be expressed with negative indices. Concentrations should be given in terms of molarity, e.g. mmol l^{-1} , not mM.

Numerals are to be used from 10 upwards; and the 24-hour clock, e.g. 21.00 hours, should be used.

MATERIALS

The source of all materials used should be given stating company, city of location and country.

Verification of the identity of living specimens used must take place through sequencing, or by consultation of taxonomists working at a reference centre. Specimens analyzed must remain accessible for later reference. Strains should be deposited in one of the major culture collections, and sequences in a public data bank. Collection and sequence numbers must be cited in the text. It is recommended that new taxa are deposited in MycoBank. Descriptions of new taxa must comply with the rules of the International Code of Botanical Nomenclature.

PROOFS

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working e-mail address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following web site:
<http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>.

This will enable the file to be opened, read on screen and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately.

OFFPRINTS

A PDF offprint of the online published article will be provided free of charge to the corresponding author, and may be distributed subject to the Publisher's terms and conditions. Paper offprints of the printed published article may be purchased if ordered via the method stipulated on the instructions that will accompany the proofs. Printed offprints are posted to the correspondence address given for the paper unless a different address is specified when ordered. Note that it is not uncommon for printed offprints to take up to eight weeks to arrive after publication of the journal.

AUTHOR MATERIAL ARCHIVES POLICY

Please note that unless specifically requested, **Blackwell Publishing will dispose of all hardcopy or electronic material submitted two months after publication.** If you require the return of any material submitted, please inform the editorial office or production editor as soon as possible if you have not yet done so.

AUTHOR SERVICES

NEW: Online production tracking is now available for your article through Blackwell's Author Services: Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit www.blackwellpublishing.com/bauthor for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

Mycoses c/o Editorial Office

Erika Ratzinger

Vohburgerstraße 13, 80687 München, Germany

Phone: +49 (0)89 546 624 35 Fax: +49 (0)89 583 824

E-mail: mycoses.muenchen@t-online.de