

## Complexo *Cryptococcus humicola* isolado no pré e no pós-tratamento de mastite em vacas\*

Francisco de Assis Baroni<sup>1+</sup>, Daniel Paiva Barros de Abreu<sup>2</sup>, Diego Medeiros Lima<sup>2</sup>, Sergio Gaspar de Campos<sup>1</sup>, Claudete Rodrigues Paula<sup>3</sup> e Rita de Cássia Campbell Machado Botteon<sup>4</sup>

**ABSTRACT.** Baroni F.A., Abreu D.P.B., Lima D.M., Campos S.G., Paula C.R. & Botteon R.C.C.M. [*Cryptococcus humicola* complex isolated before and after treatment of mastitis in cows.] Complexo *Cryptococcus humicola* isolado no pré e no pós-tratamento de mastite em vacas. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 38(Supl.2):17-21, 2016. Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, Km 7, Zona Rural, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: baroni@ufrj.br

The inflammatory reaction of mammary glands or mastitis is one of the main problems of dairy farming in Brazil, with huge financial losses caused to producers. It has several causes, occurring predominantly by microbial action. Although bacterial etiology is the prevalent cause of clinical and subclinical cases, fungi, algae, and viruses also have involvement. Among the fungi, *Candida* spp., *Trichosporon* spp., *Cryptococcus* are the most prevalent. The first involved reports of *Cryptococcus* yeast in cases of mastitis are old, but *Cryptococcus* species has been reported as emerging yeast in several clinical cases, especially in humans. In this paper, we describe the isolation of *Cryptococcus humicola* from milk samples collected from two animals in two different dairy farms before and after the treatment performed for bacterial mastitis and we discuss possible ways and causes of infection.

**KEY WORDS.** Cattle, criptococcosis, yeast.

**RESUMO.** A reação inflamatória de glândulas mamárias ou mastite é um dos principais problemas da pecuária leiteira no Brasil, pelos enormes prejuízos financeiros ocasionados às fazendas. Possui causas diversas, ocorrendo prevalentemente por ação microbiana. Destacam-se as bactérias, mas fungos, algas e vírus também apresentam envolvimento. Dentre os fungos, as leveduras *Candida* spp., *Trichosporon* spp. e *Cryptococcus* spp. estão entre as mais prevalentes. Os primeiros relatos envolvendo *Cryptococcus* spp. em casos de mastites são antigos, mas espécies de *Cryptococcus* (não *neoformans* e não *gattii*) têm sido relatadas como leveduras emergen-

tes em vários casos clínicos, principalmente em humanos. Neste trabalho, descrevemos o isolamento de *Cryptococcus humicola* a partir de duas coletas realizadas em vacas leiteiras de duas propriedades distintas, antes e após o tratamento realizado para mastite bacteriana e discutimos as possíveis vias e causas de infecção.

**PALAVRAS-CHAVE.** Bovino, criptococose, levedura.

### INTRODUÇÃO

A reação inflamatória de glândulas mamárias ou mastite constitui um dos principais problemas

\*Recebido em 8 de setembro de 2016.

Aceito para publicação em 6 de outubro de 2016.

<sup>1</sup> Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR 465, Km 7, Zona Rural, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: gascam@globocom; \*Autor para correspondência, E-mail: baroni@ufrj.br

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (PPGMV), UFRRJ, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: abreudpb@gmail.com, limadmvet@yahoo.com.br

<sup>3</sup> Departamento de Estomatologia, Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 2227, Vila Universitária, São Paulo, SP 05508-000. E-mail: crpmicol@uol.com.br

<sup>4</sup> Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, IV, UFRRJ, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: ritabotteon@gmail.com

da pecuária leiteira, pelos enormes prejuízos financeiros ocasionados às fazendas, apesar dos notórios progressos existentes nas condições sanitárias (Yang et al. 2011). Possui causas diversas, sendo prevalentemente por ação bacteriana, mas também apresentam envolvimento os fungos, algas e vírus. O primeiro relato de mastite fúngica no Brasil é creditado a Minami et al. (1976), caso promovido por levedura. O envolvimento de fungos em mastites encontra-se entre 2 a 13% de forma esporádica ou enzoótica (Piech 2008). Em 95.5% dos casos, prevalece o gênero *Candida* spp., principalmente *C. albicans* (Spanamberg et al. 2008, Zhou et al. 2013). Em sequência ao gênero *Candida*, prevalecem *Trichosporon* e *Cryptococcus* (Chahota et al. 2001). Com uma frequência bem menor, há casos com envolvimento de fungos filamentosos. Dentre estes, pode-se citar o gênero *Aspergillus*, inclusive em associação com *Candida* spp. (Pachauri et al. 2013). Casos de mastites com evolução para óbito são citados quando estes fungos estão envolvidos (Krukowski et al. 2000). Os primeiros relatos de envolvimento do gênero *Cryptococcus* em mastites são de Emons (1952), havendo relato de mastite caprina por *C. neoformans* (Pal & Randhawa 1976) e em búfala (Rahman et al. 1983). Nesta mesma linha, leite coletado de uma vaca que fora tratada com antibióticos devido a prévia mastite bacteriana mostrou-se positivo para *C. neoformans* (Bada et al. 1992). Embora as espécies *C. neoformans* e *C. gattii* sejam consideradas mais patogênicas, outras espécies consideradas emergentes foram relatadas. Um trabalho realizado com 2.078 amostras de leite de casos de mastites de 22 fazendas leiteiras do estado de São Paulo (Costa et al. 1993) revelou 29 espécies de leveduras, prevalecendo o gênero *Cryptococcus* spp. (*C. albidus*, *C. flavus*, *C. laurentii* e *C. luteolus*) em 56.33% dos casos de mastites clínicas e em 8.45% dos casos de mastite subclínicas.

Os sinais clínicos das mastites ocasionadas por leveduras, são inespecíficos e variam de manifestações subclínicas a casos severos que podem incluir risco de vida (Bada et al. 1992). Os fungos, ao invadirem o úbere promovem febre prolongada, dor, reação inflamatória nas glândulas mamárias e nos linfonodos adjacentes, sensibilidade local, seguindo-se diminuição da produção de leite e da qualidade do mesmo (Seker 2010). Alterações microscópicas como a ocorrência de inflamação difusa purulenta evoluindo para a cronicidade, caracterizada pela infiltração de linfócitos, macrófagos e ocorrência de fibrose extensa com o desenvolvimento de granulomas múltiplos foram alterações

já relatadas a partir de mastite experimental por *Cryptococcus neoformans* (Singh et al. 1994).

Leveduras como *Cryptococcus* spp. são micro-organismos encontrados em substratos muito variados, desde plantas, solo, água, principalmente em locais contaminados com fezes de aves. São sapróbios oportunistas e, devido a tal fato, os alimentos para animais, poeira, secreções, solo etc. compreendem situações que podem levar à implantação nos canais dos tetos. Alguns estudos realizados mostram que o uso de muitos antibióticos pode levar a um aumento na colonização por leveduras (Samonis et al. 1994, Cruz 2010). A aplicação de antibióticos para tratamento de mastites bacterianas com a consequente eliminação destas bactérias pode fazer com que os fungos fiquem livres da competição destas e passem a invadir áreas dos canais dos tetos, chegando até ao tecido glandular (Cruz 2010).

O objetivo do presente trabalho é relatar isolamento de fungo com envolvimento em quadro de mastite em amostras de leite coletadas de dois animais de propriedades leiteiras, localizadas em Resende, RJ.

## MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido em duas propriedades leiteiras localizadas no município de Resende, mesorregião do Sul Fluminense (RJ), possuindo rebanhos de animais da raça holandesa e mestiços. A primeira propriedade possuía 35 vacas em lactação com produção diária de aproximadamente 450 litros de leite/dia. A segunda propriedade, com 85 vacas em lactação, somava em média 1.650 litros de leite/dia. Ambas realizavam a ordenha duas vezes ao dia com manejo semi-intensivo dos animais (Figura 1). Havia nas propriedades, relatos concomitantes de diversos animais com doenças respiratórias e quadros de diarreia, indicando possível deficiência no manejo sanitário da propriedade. Em cada uma destas propriedades identificou-se a presença de uma vaca com manifestações clínicas sugestivas de mastite. Através do exame físico realizado pelo médico veterinário responsável, detectou-se a presença de alteração em úbere, hiperemia e alterações no aspecto do leite.

**Coleta de amostras.** Realizou-se uma primeira coleta do leite por meio de ordenha manual e individual, com prévia antisepsia da pele dos tetos e óstio e acondicionamento da amostra biológica em frasco estéril, encaminhada sob refrigeração para processamento. Considerando a suspeita de envolvimento bacteriano no quadro observado, o médico veterinário responsável pelo acompanhamento destes animais iniciou a administração intramamária de sulfato de gentamicina (150 mg/ 10 ml), durante 3 dias. Verificando a manutenção das alterações clínicas anteriormente citadas, realizou-se nova coleta de material. Desta forma, um total de quatro amostras



Figura 1. Rebanho leiteiro de uma das propriedades relatadas, demonstrando a elevada concentração de matéria orgânica presente no local de permanência dos animais.

de leite foi obtido, sendo uma amostra de cada animal no pré e pós-tratamento.

**Cultura fúngica.** As amostras foram semeadas em triplicata no meio Sabouraud dextrose a 4% e em meio contendo dopamina com incubação a 26°C, 32°C e a 37°C. As colônias que surgiram após incubação foram submetidas a análises de suas estruturas microscópicas e a testes de identificação de leveduras compreendidos por microcultivos em *Corn Meal Agar*, teste que permite verificar a formação de estruturas como clamidoconídios e blastoconídios, além da presença de filamentação que pode caracterizar algumas leveduras em particular. Foram submetidas também a provas de produção de urease em meio de Christensen, de síntese de amido e de crescimento em meio contendo diferentes concentrações de cicloheximida, importantes no caso de leveduras pertencentes ao gênero *Cryptococcus*. Foram realizadas provas de zimograma e de auxanograma, que identificam leveduras com base nos perfis de fermentação de carboidratos e perfis de assimilação de fontes carbonadas e nitrogenadas, conforme preconizado por Kurtzman et al. (2011).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das amostras recolhidas no pré-tratamento da mastite bacteriana, semeadas em meio Sabouraud nas temperaturas de 26°C e 32°C, cresceram colônias mucóides e levemente cremes, enquanto nas amostras das placas contendo meio com dopamina, houve grande número colônias suavemente acastanhadas. Estes resultados foram iguais para as amostras da segunda coleta (pós-tratamento com gentamicina), apenas com variação no isolamento de maior número de colônias e também de duas colônias brancas de aspecto seroso em uma das placas. Não verificou-se crescimento nas placas incubadas a 37°C.

A análise micromorfológica evidenciou células de tamanhos e formas variadas (semi-ovais, ovais, esféricas e até com formato de gotas) providas de cápsula tênue, de pequeno tamanho, sugerindo o envolvimento de leveduras do gênero *Cryptococcus*. Cultivos posteriores em *Corn Meal Agar*, além destas formas, evidenciaram pequeníssimo número de curtas pseudo-hifas e filamentos verdadeiros onduliformes. Provas de urease e síntese de amido foram positivas. Não ocorreu crescimento a 37°C. A prova de zimograma e o cultivo em meio com cicloheximida foram negativos. Este gênero não apresenta crescimento na presença desta substância, com exceção de um pequeno crescimento para a espécie *C. gattii* e tampouco é fermentativo. Por outro lado, o gênero é capaz de produzir urease e de sintetizar amido a partir da glicose. Estes testes até aqui descritos classificaram fenotipicamente a levedura como pertencente ao gênero *Cryptococcus* sem evidenciar a espécie. A prova de auxanograma, testando-se 35 fontes, revelou perfil de assimilação compatível com o complexo *Cryptococcus humicola*. As provas de identificação foram norteadas com o preconizado por Kurtzman et al. (2011). Apenas duas colônias brancas isoladas nesta fase foram identificadas como pertencentes ao gênero *Trichosporon*.

O gênero *Trichosporon* é frequentemente isolado de amostras recolhidas de tanques de armazenamento de leite e, embora existam relatos de sua participação em casos de mastites por fungos (Cruz 2010), foram isoladas em número muito reduzido. Os isolamentos de *C. humicola*, no entanto, deram-se em grande quantidade de colônias (média de  $8,7 \times 10^2$  U.F.C./mL) e de modo homogêneo, o que representa provável participação no processo infeccioso. *Cryptococcus humicola* é uma levedura classificada dentro da Ordem Trichosporonales e é hoje referida como pertencente ao Complexo *Cryptococcus humicola*. Este agrupa algumas espécies, filogeneticamente próximas entre si e mais distantes de *C. neoformans* e de *C. gattii* (Takashima et al. 2001).

Segundo Kwon-Chung et al. (2011), *C. humicola* é uma das leveduras que vem sendo isoladas de casos clínicos humanos. Como até recentemente não havia relatos de isolamento, passaram a ser consideradas leveduras emergentes. Casos patológicos variados, ocasionados por esta levedura são descritos em pacientes humanos (Shinde et al. 2004, Baka et al. 2007). Trata-se de micro-organismo inicialmente não patogênico, mas com capacidade de colonizar invasivamente desde que ocorra debilitação do hospedeiro. Doenças crônicas, imunodebili-

tantes favorecem o desenvolvimento e a multiplicação do micro-organismo, tornando-o um agente infeccioso (Perez et al. 1999, Hayashi et al. 2013).

Muitos autores consideram a ocorrência de mastites micóticas, incluindo as promovidas por leveduras, como secundárias às mastites bacterianas (Farnsworth & Sorensen 1972, Krukowski et al. 2000, Spanamberg et al. 2009, Zhou et al. 2013). Um apoio a esta teoria está no fato que largas doses de antibióticos causariam deficiência de vitamina A, levando a problemas epiteliais no úbere, que facilitariam a invasão fúngica (Krukowski et al. 2000, Seker et al. 2010, Hayashi et al. 2013). Outra possibilidade seria pressão seletiva resultante do uso excessivo de antibióticos, assim como corticosteroides e fármacos imunossupressivos (Zhou et al. 2013). O fato de *C. humicola* ter sido isolado no pós-tratamento da mastite bacteriana poderia ter apoio neste fato, mas não explicaria o isolamento também no pré-tratamento, a não ser em caso de tratamento antibacteriano não relatado ou desconhecido realizado anteriormente. Este fato é possível, uma vez que nas propriedades avaliadas, era habitual o uso de formulações intramamárias de modo empírico, não parecendo haver um controle do seu uso. Podemos pensar na infecção por *Cryptococcus humicola* ocorrente devido a estas condições relatadas, inclusive se considerarmos que muitos fungos causadores de mastites, podem compor a biota da pele dos animais e mãos dos ordenhadores, solo e/ou piso onde situam-se os animais por serem de natureza sapróbia e oportunista (Spanamberg et al. 2009, Barnett et al. 2000). As espécies deste complexo têm sido isoladas de vários substratos como plantas, solo e de espécimes clínicos (Fell & Statzell-Tallman 1998). Neste caso, considerando as condições de higiene relatadas, podemos inferir que as mesmas podem ter favorecido a colonização do úbere por *C. humicola*. Tais condições podem traduzir-se em ambiente propício, com possibilidades de entrada no úbere a partir das mãos do ordenhador, do chão ou solo onde os tetos encostam, da parte externa dos próprios tetos, incluindo a possível presença na periferia do ostíolo.

Para justificar especificamente o processo de entrada e de instalação, podemos considerar que a invasividade pode fundamentar-se na capacidade proteolítica, como descrevem Zacchi et al (2003), ocorrendo degradação de proteínas teciduais e de estruturas imunológicas, favorecendo invasividade e patogenicidade. Muitas leveduras apresentam capacidade de produção de proteases que promovem a lise de proteínas. Além disso, *C.*

*humicola* possui estrutura polissacarídica capsular semelhante à de *C. neoformans*, o que também contribui para esta ação. Possibilidades de invasão também poderiam ser favorecidas por mastites bacterianas previamente existentes a estes casos ou mastites mal curadas. Nestes casos, a presença prévia de bactérias promove alterações no parênquima do úbere e no leite. Em adição, *C. humicola* é conhecido por expressar atividade micocida contra um grande espectro de leveduras pertencentes aos Ascomycetos e também Basidiomycetos (Puchkov et al. 1998). Sendo assim, não é difícil inferir que esta levedura possa causar alterações no canal do teto e no parênquima do úbere que facilitem o seu próprio desenvolvimento. Alterações de pH, também devem ser consideradas, pois principalmente a diminuição para valores em torno de 5,5-6,0 pode favorecer o desenvolvimento de *Cryptococcus* spp. A possibilidade de infecção está relacionada à proporção de células de leveduras. Neste caso, chamou-nos a atenção o fato do isolamento desta levedura ter-se dado em grande número de colônias e de forma homogênea, sem a presença de outros micro-organismos fúngicos. Estamos, então, diante de fatos em que os animais apresentam algum grau de debilidade, considerando a possibilidade de mastite bacteriana prévia, possibilidade de doenças respiratórias e gastroentéricas, relativamente comuns, e condições gerais de higiene que deixam a desejar. Muitas vezes as mastites fúngicas evoluem a partir do uso de antibióticos para tratamento de mastites bacterianas (Cruz 2010). As propriedades adotam medidas que apresentam algum grau de tecnificação e preocupação com a higiene, porém insatisfatórias. Existe a possibilidade que esta levedura e outras menos relatadas passem despercebidas dos casos de mastites estudados, uma vez que os casos subclínicos muitas das vezes não são notados. A este fato, acrescentem-se as deficiências de diagnóstico em nível de campo. Muitas vezes os profissionais que poderiam diagnosticar estão distantes, assim como estão distantes os laboratórios de auxílio diagnóstico.

## CONCLUSÕES

*C. humicola* pode ser isolado de casos de mastites e seu isolamento pode dar-se em grande número. Existem várias possibilidades para justificar estes dois casos de envolvimento, mas muito provavelmente ocorreram em função de sua natureza sapróbia, ubiquidade e fácil multiplicação, aliados às condições gerais de higiene e deficiências de manejo. Este é o primeiro relato de implicação do com-

plexo *Cryptococcus humicola* com um quadro clínico de mastite.

## REFERÊNCIAS

- Bada R., Higgins R. & Cécyr A. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from bovine milk. *The Canadian Veterinary Journal*, 33:553, 1992.
- Baka S., Antonopoulou S., Salomidou P., Meretaki S., Kaparos G., Demeridou S., Velegraki A. & Koukouni E. Isolation of *Cryptococcus humicolus* from an immunocompromised hiv-negative patient. In: *17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, Abstract number 1734\_178, 2007, ICC, Munich, Germany. Disponível em: <<http://www.blackwellpublishing.com/eccmid17/abstract.asp?id=58077>>. Acessado em: 27 Setembro, 2016.
- Barnett J.A., Payne R.W., Yarrow D. & Barnett L. Yeasts: characteristics and identification. 3a ed. Cambridge University Press, New York, 2000. 1150p.
- Chahota R., Katoch R., Mahajan A. & Verma S. Clinical bovine mastitis caused by *Geotrichum candidum*. *Veterinarski Arhiv*, 71:197-201, 2001.
- Costa E.O., Gandra C.R., Pires M.F., Coutinho S.D., Castilho W. & Teixeira C.M. Survey of bovine mycotic mastitis in dairy herds in the state of São Paulo, Brazil. *Mycopathologia*, 124:13-17, 1993.
- Costa G.M., Silva N., Rosal C.A., Figueiredo H.C.P. & Pereira U.P. Mastite por leveduras em bovinos leiteiros do sul do estado de Minas Gerais, Brasil. *Ciência Rural*, 38:1938-1942, 2008.
- Cruz L.C.H. Mastites micóticas, p.207-209. In: Cruz L.C.H. (Ed.), *Micologia Veterinária*. 2ª ed. Revinter, Rio de Janeiro, 2010.
- Emmons C.W. *Cryptococcus neoformans* strains from a severe outbreak of bovine mastitis. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, 6:231-234, 1952.
- Farnsworth R.J. & Sorensen D.K. Prevalence and species distribution of yeasts in mammary glands of dairy cows in Minnesota. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 36:329-332, 1972.
- Fell J. & Statzell-Tallman A. *Cryptococcus Vuillemin*, p.742-767. In Kurtzman C.P. & Fell J.W. (Eds), *The Yeasts, a taxonomic study*. 4th Ed. Elsevier, Amsterdam, 1998.
- Hayashi T., Sugita T., Katsuda K., Zhang E., Kiku Y., Sugawara K., Ozawa T., Matsubara T., Ando T., Obayashi T., Ito T., Yabusaki T., Kudo K., Yamamoto H., Koiwa M., Oshida T., Tagawa Y., Kawai K. & Ayashi T. Molecular-Based Identification of Yeasts Isolated from Bovine Clinical Mastitis in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 75:387-390, 2013.
- Krukowski H., Majewski T.M. & Rózanski P. Survey of yeast mastitis in dairy herds of small-type farms in the Lublin region, Poland. *Mycopathologia*, 150:5-7, 2001.
- Kurtzman C., Fell J.W. & Boekhout T. The yeasts, a taxonomic study. 5th ed. Elsevier, New York, 2011. 2354p.
- Kwon-Chung K.J., Boekhout B.L.W. & Fell J.C. Systematics of the genus *Cryptococcus* and its type species *C. neoformans*, p.13-15. In: Heitman J., Kozel T.R., Kwon-Chung K.J., Perfect J.R. & Casadevall A. (Eds), *Cryptococcus from human pathogen to model yeast*. ASM Press, Washington, 2011. 646p.
- Minami P.S., Campelli O., Viana S.S., Mendes M.J.S. & Paula C.R. Presença de *Cryptococcus laurentii* em leite de vaca com mamite. *Atualidades Veterinárias*, 4:8-11, 1976.
- Pachauri S., Varshney P., Dash S.K., Gupta M.K. & Achauri S. Involvement of fungal species in bovine mastitis in and around Mathura, India. *Veterinary World*, 6:393-395, 2013.
- Pal M., Randhawa H.S. Caprine mastitis due to *Cryptococcus neoformans*. *Sabouraudia*, 14:261-263, 1976.
- Perez V., Corpa J.M., Garcia Marín J.F., Adúris J.J., Jensen H.E. & Erez V. Generalized aspergillosis in dairy sheep. *Journal of Veterinary Medicine*, 46:613-621, 1999.
- Piech T. Mastitis mycotica in cows - causes, symptoms, and therapy. *Annales Umcs, Medicina Veterinaria*, 63:8-16, 2008. Disponível em: <<http://wydawnictwo.up.lublin.pl/Annales/Veterinaria/2008/2/2a.html>>. Acesso em: 26 Setembro, 2015.
- Puchkov E.O., Yurkova T.V., Golubev W.I. & Uchkov E.O. Effects of *Cryptococcus humicola* killer toxin upon *Cryptococcus terreus* envelope: combined fluorometric and microscopic studies. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1381:61-67, 1998.
- Rahman H., Patgiri G.P. & Boro B.R. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from a case of mastitis in a buffalo (*Bubalus bubalis*). *Veterinary Records*, 112:16, 1983.
- Samonis G., Gikas A., Toloudis P., Maraki S., Vrentzos G., Tselentis Y., Tsaparas N. & Bodey G.J. Prospective study of the impact of broad-spectrum antibiotics on the yeast flora of the human gut. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 13:665-667, 1994.
- Seker E. Identification of *Candida* species isolated from bovine mastitic milk and their in vitro hemolytic activity in Western Turkey. *Mycopathologia*, 169:303-308, 2010.
- Shinde S.M., Vanarse K.S. & Pandit A.N. Systemic *humicolus* cryptococcosis. *Indian Pediatrics*, 41:1162-4, 2004.
- Singh M., Gupta P.P., Rana J.S. & Jand S.K. Clinico-pathological studies on experimental cryptococcal mastitis in goats. *Mycopathologia*, 126:147-155, 1994.
- Spanemberg A., Sanches E.M.C., Santurio J.M. & Ferreiro L. Mastite micótica em ruminantes causada por leveduras. *Ciência Rural*, 39:282-290, 2009.
- Takashima M., Sugita T., Shinoda T. & Nakase T. Reclassification of the *Cryptococcus humicola* complex. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51:2199-2210, 2001.
- Yang F.L., Li X.S., He B.X., Du Y.L., Li G.H., Yang B.B. & Huang Q.H. Bovine mastitis in subtropical dairy farms, 2005-2009. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10:68-72, 2011.
- Zacchi L., Vaughan-Martini A. & Angelini P. Yeast distribution in a truffle -field ecosystem. *Annals of Microbiology*, 53:275-282, 2003.
- Zhou Y., Ren Y., Fan C., Shao H., Zhang Z., Mao W., Wei C., Ni H., Zhu Z., Hou X., Piao F. & Cui Y. Survey of mycotic mastitis in dairy cows from Heilongjiang Province, China. *Tropical Animal Health and Production*, 45:1709-1714, 2013.