

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA E CONCENTRAÇÃO ALGICIDA  
MÍNIMA “IN VITRO” DA GUANIDINA EM LINHAGENS DE  
*Prototheca zopfii* ISOLADAS DE VACAS COM MASTITE CLÍNICA  
E SUBCLÍNICA

ANA CAROLINA ALVES

Botucatu – SP

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA E CONCENTRAÇÃO ALGICIDA  
MÍNIMA “IN VITRO” DA GUANIDINA EM LINHAGENS DE  
*Prototheca zopfii* ISOLADAS DE VACAS COM MASTITE CLÍNICA  
E SUBCLÍNICA

ANA CAROLINA ALVES

Tese apresentada junto ao  
Programa de Pós-Graduação  
em Medicina Veterinária para  
obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Adjunto Márcio Garcia Ribeiro

Área: Saúde Animal, Saúde Pública Veterinária e Segurança Alimentar

Botucatu – SP

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Alves, Ana Carolina.

Caracterização genotípica e concentração algicida mínima "in vitro" da guanidina em linhagens de Prototheca zopfii isoladas de vacas com mastite clínica e subclínica / Ana Carolina Alves. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Márcio Garcia Ribeiro

Capes: 50500007

1. Bovino - Doenças. 2. Mastite. 3. Algicidas. 4. Antissépticos. 5. Prototheca. 6. Epidemiologia molecular. 7. Genótipo. 8. Desinfetantes.

Palavras-chave: Algicidas; Desinfetantes; Epidemiologia molecular; Genótipo; Prototecose bovina.

Nome do autor: Ana Carolina Alves

Título: CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA E CONCENTRAÇÃO ALGÍCIDA MÍNIMA “IN VITRO” DA GUANIDINA EM LINHAGENS DE *Prototheca zopfii* ISOLADAS DE VACAS COM MASTITE CLÍNICA E SUBCLÍNICA

### **BANCA EXAMINADORA**

Prof. Adjunto Márcio Garcia Ribeiro  
Presidente e Orientador  
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) – UNESP/Botucatu, SP

Prof. Titular Helio Langoni  
Membro  
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, FMVZ - UNESP/Botucatu, SP

Prof. Adjunto Paulo Francisco Domingues  
Membro  
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, FMVZ - UNESP/Botucatu, SP

Prof. Dra. Evelise Oliveira Telles  
Membro  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, FMVZ - USP/ São Paulo, SP

Prof. Dr. Geraldo de Nardi Júnior  
Membro  
Faculdade de Tecnologia de Botucatu  
FATEC/Botucatu, SP

Data da Defesa: 27 de julho de 2016.

## DEDICATÓRIA

*Ao meu pai Sebastião Augusto Alves (in memoriam), meu guerreiro, exemplo de honestidade e dedicação ao trabalho. Não cabe aqui a falta que você me faz. À minha mãe Conceição Aparecida Alves, essencial na minha vida, exemplo de mulher corajosa e batalhadora.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por toda saúde e proteção para realização desse trabalho.

Aos meus pais, por tudo que sempre fizeram por mim e que tanto se esforçaram para realização deste meu sonho.

Ao professor Márcio Garcia Ribeiro, pela confiança, orientação, amizade, ensinamentos e compreensão.

Ao técnico Fernando José Paganini Listoni, pelo tempo, paciência, dedicação, amizade e por me ensinar a gostar de microbiologia.

Ao professor José Carlos de Figueiredo Pantoja, pelos ensinamentos e amostras cedidas. E aos seus orientados Samuel, Arthur e Rodolfo que auxiliaram nas coletas e cultivos.

Aos professores Paulo Francisco Domingues e Helio Langoni pela importante participação na minha formação e contribuição no meu trabalho.

À professa Evelise Oliveira Telles e Geraldo de Nardi Júnior pela participação na minha banca.

Ao professor Geraldo Márcio da Costa e Agueda Vargas pelas amostras cedidas.

À Adriana Pavan pela amizade e grande ajuda durante as análises.

A todos os pós-graduandos do laboratório de Microbiologia (EIA) pela ajuda, amizade e companheirismo: Amanda Bonalume, Carmen Bolaños, Carol Lechinski, Simony Guerra, Rafaela Riseti, Marília Junqueira e Gustavo Lara.

A todos residentes e estagiários que passaram pelo laboratório, e todos colegas de departamento que fiz durante esse período.

À minha irmã Ana Paula, minhas sobrinhas Lara e Alice, tio Paulo, André, Andressa, Márcia, toda minha família e amigos, sei que posso contar com vocês em todos os momentos.

Ao meu namorado Willian, meu amigo, companheiro e incentivador.

Às minhas amigas Mariana Janini Gomes (e a dog Julie), Luciana Maciel, Carol Scott, Gabi Mothé, Tarsila, Fernanda (Mipi) e Marília Caxito que compartilharam momentos felizes comigo e me ajudaram em alguns momentos difíceis.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo do Doutorado.

*É preciso força para sonhar e perceber  
que a estrada vai além do que se vê.  
(Marcelo Camelo)*

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
<b>TABELA 1</b> - Principais características morfológicas e bioquímicas utilizadas na diferenciação das espécies de <i>Prototheca</i> .....	8
<b>TABELA 2</b> - Concentração algicida mínima da guanidina em 75 linhagens de <i>Prototheca zopfii</i> isoladas de mastite bovina. Botucatu, SP, 2016.....	32
<b>TABELA 3</b> - Média, mediana, percentis, erro padrão da média, intervalo de confiança (95%), valores mínimos e máximos para a concentração algicida mínima (CAM) da guanidina em 75 estirpes de <i>Prototheca zopfii</i> isoladas de casos de mastite bovina. Botucatu, SP, 2016.....	32



## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>FIGURA 1 -</b> Concentração algicida mínima da guanidina “in vitro” diante das 75 linhagens da <i>Prototheca zopfii</i> isoladas de mastite bovina e cepas de referência ( <sup>a</sup> <i>P. zopfii</i> genótipo 1 = RZI-3; <sup>b</sup> <i>P. zopfii</i> genótipo 2 = LZ-5; <sup>c</sup> <i>P. blaschkeae</i> = RZIII-3). Botucatu, SP, 2016.....	33
<b>FIGURA 2 -</b> Concentração algicida mínima da guanidina em 74 linhagens da <i>Prototheca zopfii</i> genótipo 2 segundo casos de mastite clínica ou subclínica bovina. Botucatu, SP, 2016.....	34

**LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

Aids = Síndrome da Imunodeficiência Adquirida  
® = marca registrada  
% = porcentagem  
≥ = maior ou igual  
< = menor que  
µg - micrograma  
µL - microlitro  
°C - graus Celsius  
BHI = Brain Heart Infusion (caldo cérebro e coração)  
CAM = concentração algicida mínima  
CEUA = Comissão de Ética no Uso de Animais  
CMT = California Mastitis Test  
CNR = Consiglio Nazionale delle Ricerche  
DNA = Deoxyribonucleic Acid (ácido desoxirribonucleico)  
g = grama  
X g = força gravitacional da centrífuga  
IC95% = intervalo de confiança de noventa e cinco por cento  
mg/L = miligrama por litro  
MIC = Minimum Inhibitory Concentration  
mL = mililitro  
mm = milímetro  
mmol/L = milimolar/Litro  
pb = pares de bases  
PCR = Polymerase Chain Reaction (reação em cadeia pela polimerase)  
pH = pressão de hidrogênio  
pmol = picomolar  
PHMB = Cloridrato de poli-hexametileno biguanida  
RNA = Ribonucleic acid (ácido ribonucleico)  
SAG = Stammsammlung für Algenkulturen der Universität Göttingen  
sp = espécie  
SSCP = single strand conformation polymorphism

\* Em virtude do uso consagrado na literatura técnica, algumas abreviaturas seguem sua grafia no inglês.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>RESUMO</b> .....	xii
<b>ABSTRACT</b> .....	xiv
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	6
2.1 Etiologia e propriedades gerais .....	6
2.1.1 Caracterização genotípica .....	9
2.2 Epidemiologia .....	11
2.3 Prototecose mamária .....	11
2.4 Prototecose humana .....	13
2.5 Tratamento .....	14
2.6 Uso de antissépticos e desinfetantes no controle da mastite .....	15
2.6.1 Guanidina .....	16
<b>3. HIPÓTESES DE ESTUDO</b> .....	19
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	21
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	23
5.1 Animais e diagnóstico de mastite .....	23
5.2 Linhagens de <i>Prototheca</i> .....	23
5.3 Diagnóstico microbiológico das prototecas .....	24
5.4 Caracterização genotípica das linhagens de <i>P. zopfii</i> .....	24
5.4.1 Técnica da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) .....	25
5.4.1.1 Cepas de referência .....	25
5.4.1.2 Extração de DNA e amplificação do material genético .....	25
5.4.1.2.1 Extração de DNA .....	25
5.4.1.2.2 Amplificação do material genético .....	26
5.5 “Concentração Algicida Mínima” (CAM) .....	27
5.5.1 Preparo dos inóculos .....	27
5.5.2 Diluições para avaliação da CAM .....	27
5.5.3 Cepas de referência do gênero <i>Prototheca</i> .....	28
5.6 Universo amostral .....	28
5.7 Análise estatística .....	29

5.8 Comissão de Ética .....	29
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>
6.1 Caracterização fenotípica das linhagens de prototeca.....	31
6.2 Caracterização genotípica das linhagens de prototeca.....	31
6.3 Concentração algicida mínima .....	31
6.4 Análise estatística .....	34
<b>7. DISCUSSÃO .....</b>	<b>36</b>
<b>8. CONCLUSÕES .....</b>	<b>42</b>
<b>9. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>44</b>
<b>10. TRABALHO CIENTÍFICO .....</b>	<b>53</b>
<b>Normas da Revista.....</b>	<b>70</b>
<b>Anexo .....</b>	<b>87</b>

**RESUMO**

ALVES, A.C. **Caracterização genotípica e concentração algicida mínima “in vitro” da guanidina em linhagens de *Prototheca zopfii* isoladas de vacas com mastite clínica e subclínica.** Botucatu, SP, 2016. 88p. Doutorado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## RESUMO

As infecções mamárias por *Prototheca* têm sido registradas, de modo crescente, em todo o mundo, como um dos agentes mais patogênicos de origem ambiental na mastite bovina. Estas algas provocam lesões graves no tecido mamário e, até o momento, não existe protocolo efetivo de tratamento. O objetivo do presente estudo foi investigar o efeito algicida “in vitro” da guanidina em 75 isolados de *Prototheca zopfii* identificados de 60 casos de mastite clínica bovina (80,0%), 14 (18,7%) casos de mastite subclínica e um (1,3%) caso sem o diagnóstico de mastite clínica ou subclínica. Os 75 isolados foram submetidas a testes fenotípicos convencionais e caracterização genotípica por PCR multiplex, permitindo a identificação de todas as estirpes como *P. zopfii* genótipo 2. O efeito “in vitro” da guanidina revelou que todas os isolados mostraram variações na concentração algicida mínima que variaram de 0,001% a 0,035%. A guanidina tem alto efeito microbicida e é considerado um antisséptico/desinfetante da nova geração de microbicidas. O composto não é tóxico para as membranas mucosas e conjuntivas de humanos em baixas concentrações. É utilizado como desinfetante de piscinas e na desinfecção de superfícies, bem como antisséptico em feridas humanas. A ação algicida da guanidina em baixas concentrações indica que poderia ser usada na higienização de ambiente, utensílios e equipamentos de ordenha, no pré e pós-dipping em propriedades com casos de prototecose mamária, assim como na ablação química de quartos mamários acometidos por *P. zopfii*. Dentre a literatura consultada, relata-se pela primeira vez o efeito algicida “in vitro” da guanidina em isolados de *P. zopfii* de origem animal.

**Palavras-chave:** prototecose bovina, genótipo, epidemiologia molecular, algicidas, desinfetantes, antissépticos

# **ABSTRACT**

ALVES, A.C. **Genotypic characterization and *in vitro* minimal algacide concentration of guanidine in *Prototheca* strains isolated from clinical and subclinical bovine mastitis.** Botucatu, SP, 2016. 88p. Doutorado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## **ABSTRACT**

*Prototheca* species have increasingly been reported as the most common opportunistic pathogens causing mastitis worldwide. The protothecal mastitis poses a major health and economic problem in dairy herds. To date, there is any effective therapy against protothecal mastitis. The aim of the present study was to investigate *in vitro* algacide effect of guanidine on 75 *Prototheca zopfii* genotype 2 strains isolated from 75 cases of clinical and subclinical bovine mastitis cases. *In vitro* effect of guanidine revealed that all strains were susceptible to the compound with minimal algacide concentration ranging from 0.001% to 0.035%. Guanidine has high microbicidal effect and is considered a new-generation microbicidal compound. It is non-toxic to human mucous membranes and conjunctivas at low concentrations; it has been used as a disinfectant of surfaces and in swimming pools, as well as antiseptic on human wounds. The algacide action of guanidine at low concentrations indicates that it could be an alternative disinfectant or antiseptic to clean the environment and milking dairy equipment, in pre- and post-dipping solutions, in the chemical dry therapy of bovine teats, and even in intramammary therapy of *P. zopfii* infections. This is the first report of the *in vitro* algacide effect of guanidine on *P. zopfii* strains from animal origin.

**Keywords:** bovine protothecosis, genotype, molecular epidemiology, algacides, disinfectants, antiseptics



# INTRODUÇÃO

## 1. INTRODUÇÃO

Algas do gênero *Prototheca* são micro-organismos eucarióticos, unicelulares e aclorofilados que se reproduzem assexuadamente por endosporulação, descritos primeiramente por Wilhelm Krüger, em 1894, na Alemanha. Têm sido associadas a infecções nos humanos e em animais, no continente europeu, Ásia, África, Oceania e Américas (JAGIELKSKI e LAGNEAU, 2007).

São bem caracterizadas atualmente sete espécies do gênero *Prototheca*, com base em características fenotípicas e genotípicas, denominadas *Prototheca stagnora*, *Prototheca ulmea*, *Prototheca cutis*, *Prototheca miyajii*, *Prototheca blaschkeae* (*P. blaschkeae*), *Prototheca zopfii* (*P. zopfii*) e *Prototheca wickerhamii*, patogênicas para determinadas espécies de animais domésticos e humanos (ROESLER et al., 2006; LASS-FLÖRL e MAYR, 2007; SATOH et al., 2010; AHRHOLDT et al., 2012; MASUDA et al., 2016). *P. zopfii* foi classificada em biotipos I, II e III, de acordo com características fenotípicas (métodos bioquímicos) e auxanográficos. Na última década, os biotipos I e II foram reclassificados, respectivamente, em genótipos 1 e 2, dos quais o genótipo 1 predomina na fezes de bovinos e suínos, enquanto o genótipo 2 é frequente na mastite bovina (MÖLLER et al., 2007; ROESLER et al., 2006; RIBEIRO et al., 2016a). Foi constatado também que o biotipo III encontrava-se filogeneticamente distante, propondo-se nova espécie denominada *P. blaschkeae*. Roesler et al. (2006), na Alemanha, propuseram método de diagnóstico das espécies e genótipos de *P. zopfii* usando técnicas moleculares, baseadas na identificação de fragmentos 18S rDNA, possibilitando estudos de epidemiologia molecular de isolados obtidos de várias regiões e continentes.

*Prototheca* spp. são frequentemente identificadas em áreas úmidas contendo matéria orgânica animal e vegetal, como água e dejetos provenientes da sala de ordenha, bebedouros, solo, fezes de bezerros e de suínos, bem como contaminando equipamentos de ordenha (YAMAMURA et al., 2008). Também foram isoladas do ambiente de laticínios e fezes de ratos capturados em laticínios (PORE et al., 1983; PORE e SHAHAN, 1988). Estes micro-organismos apresentam elevado grau de resistência ao ambiente e suportam pH entre 3 e 11. Possuem relativa resistência a vários desinfetantes e antissépticos (PORE

et al., 1983). A pasteurização não é totalmente eficaz na inativação da alga no leite (MELVILLE et al., 2002). Marques et al. (2010) descreveram a inibição da multiplicação de isolados do gênero *Prototheca* após o tratamento com calor, a partir de temperatura de 100°C.

Nos humanos, a pele é o órgão mais frequentemente acometido. A prototecose humana ocorre principalmente em pacientes imunossuprimidos (LASS-FLÖRL e MAYR, 2007). Relatos recentes da doença têm descrito casos de neuroinfecção (ZAK et al., 2012), bursite (BOSSCHE et al., 2012) e hepatite (MIN et al., 2013).

Na última década, a prototecose tem sido relatada em diversas espécies animais, principalmente em bovinos (SALERNO et al., 2010), cães (RIBEIRO et al., 2009), caprinos (MACEDO et al., 2008) e outros animais silvestres e selvagens como serpentes, peixes, castores e morcegos (HOLLINGSWORTH, 2000). Na Alemanha, Lerche (1952) descreveu pela primeira vez casos de mastite bovina por *P. zopfii*.

No Brasil, Costa et al. (1992) e Langoni et al. (1992a,b) descreveram, contemporaneamente, a ocorrência de mastite bovina por *Prototheca* spp., sob a forma de surtos, em diferentes estados do país.

A manifestação clínica mais frequente da prototecose em animais domésticos é a mastite bovina, determinando sérios prejuízos aos produtores em razão da redução na produção, atrofia alveolar e descarte precoce dos animais (RIBEIRO et al., 2016a).

A mastite, definida como inflamação da glândula mamária, é considerada uma das doenças mais frequentes em animais destinados a produção de leite, causando prejuízos econômicos significativos decorrentes de alterações na composição físico-química, na celularidade do produto e redução da produção (SCHALM et al., 1971). A infecção mamária bovina por *P. zopfii* determina principalmente mastite clínica e, ocasionalmente, subclínica, caracterizada por processos piogranulomatosos, de difícil resolução tecidual (CHEVILLE et al., 1984), levando a alterações no tecido glandular mamário e destruição parcial ou total do parênquima glandular (LANGONI et al., 2013). Neste contexto, *P. zopfii* tem sido referida como patógeno preocupante de origem ambiental na casuística da mastite bovina (SALERNO et al., 2010), principalmente devido à gravidade

das lesões causadas no tecido mamário e das limitações na abordagem terapêutica (JÁNOSI et al., 2001).

Não existe, até o momento, protocolo terapêutico efetivo ou que apresente reprodutibilidade de resultados na abordagem das infecções mamárias em vacas pelo gênero *Prototheca*. Devido aos riscos de transmissibilidade do micro-organismo, tanto no ambiente da ordenha como nas entre-ordenhas, aliado a ausência de tratamento efetivo, o controle da doença tem sido apoiado na segregação dos animais acometidos, na ablação (secagem) química dos tetos, ou mesmo no descarte dos animais (KIRK, 1991; COSTA et al., 1996b; RICCHI et al., 2010; RIBEIRO et al., 2016a).

Diferentes estudos têm submetido isolados de prototeca de origem bovina “in vitro” e “in vivo” (a antimicrobianos e antifúngicos) com resultados variáveis, pouco efetivos ou, no mínimo, controversos (RIBEIRO, 2008; MARQUES et al., 2006; LASSA et al., 2011). A baixa eficiência dos antimicrobianos e antifúngicos comerciais na prototecose mamária tem motivado ensaios com produtos de efeito algicida (peróxido de hidrogênio) [SALERNO et al., 2010], antissépticos e desinfetantes (iodo, hipoclorito, clorexidine, timerosal, sulfato de cobre, nitrato de prata, própolis, ácido peracético) [LANGONI et al., 1995; MELVILLE et al., 2002; RIBEIRO, 2008; GONÇALVES et al., 2015], em isolados de vacas com mastite. Apesar de certa ação algicida, muitos destes produtos provocam reações adversas na glândula mamária, ou mesmo possuem restrições para uso em animais, tendo em vista a presença de resíduos no leite de animais tratados.

Neste contexto, a guanidina é um composto de ação microbicida que desponta como produto promissor da nova geração de desinfetantes para esterilização de superfícies de materiais e como antisséptico para feridas, sem efeito tóxico para o organismo. A guanidina apresenta, simultaneamente, elevado efeito algicida, bactericida e fungicida em baixas concentrações, utilizada como produto único com efeito microbicida para piscinas, e, aparentemente, não apresenta efeito irritante para mucosas e conjuntivas de humanos (YAMADA et al., 2009; SAWINSKI et al., 2013; MACHAT, 2016).

Na literatura consultada, não foram encontrados no Brasil estudos sistematizados, com grande número de linhagens de *P. zopfii*, que investigassem a caracterização genotípica dos isolados. Ademais, devido à ausência de protocolo efetivo de tratamento da prototecose mamária em vacas,

faz-se necessário estudos da sensibilidade “in vitro” de isolados de *P. zopfii* obtidos de mastite, diante de produtos químicos ou fármacos com perspectivas de tratamento intramamário de vacas. Neste contexto, o presente estudo investigou o perfil genotípico e espécies de linhagens de prototeca isoladas de vacas com mastite clínica e subclínica de quatro estados produtores de leite do Brasil, bem como avaliou a concentração algicida mínima (“in vitro”) da guanidina nos isolados.

# **REVISÃO DA LITERATURA**

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Etiologia e propriedade gerais

Algas típicas são organismos eucarióticos, saprófitas, contendo clorofila, capazes de realizar o processo de fotossíntese. O gênero *Prototheca* foi descrito pela primeira vez por Krüger (1894), na Alemanha, e se caracteriza como micro-organismo unicelular e aclorofilado. Atualmente, a classificação taxonômica do gênero *Prototheca* agrupa essas algas no reino Virioplantae, filo Chlorophyta, classe Trebouxiophyceae, ordem Chlorellales e família Chlorellaceae, com base na ultraestrutura e reprodução assexuada, com formação de endósporos (ROESLER et al., 2006). A ausência do pigmento clorofila, perdido provavelmente durante a filogênese, pode ter conferido adaptação patogênica às espécies do gênero *Prototheca*, em virtude da necessidade de fonte heterotrófica de nutrientes (COSTA et al., 1992, 1996b; PORE e SHAHAN, 1988).

São conhecidas atualmente sete espécies bem documentadas do gênero, caracterizadas com base fenotípica e genotípica: *P. stagnora*, *P. ulmea*, *P. cutis*, *P. miyajii*, *P. blaschkeae*, *P. zopfii* e *P. wickerhamii*, das quais as três últimas são reconhecidamente patogênicas para bovinos, caprinos, cães e gatos (PORE, 1985; LACAZ et al., 1998; ROESLER et al., 2003; LASS-FLÖRL e MAYR, 2007, SATOH et al., 2010; MASUDA et al., 2016).

A existência de outras espécies como *P. moriformis* foram propostas em estudos moleculares posteriores, porém, foram estreitamente relacionadas com *P. zopfii* (UENO et al., 2003; ROESLER et al., 2006). *P. cutis*, *P. miyajii* e *P. wickerhamii* têm sido descritas em humanos (SATOH et al., 2010; MASUDA et al., 2016).

*P. zopfii* é imóvel, aeróbia, utiliza a glicose como fonte de carbono, apresenta morfologia celular esférica ou oval, com diâmetro variável entre 7 e 30 µm, com reprodução assexuada. O citoplasma sofre processo de clivagem ou septação interna, culminando com a formação de endósporos ou esporangiosporos. Ocorre divisão múltipla e irregular no interior de cada esporângio (célula-mãe), com formação dos endósporos (células-filhas), organizadas em padrão semelhante a mórulas. Os endósporos se desenvolvem, aumentam de tamanho e exercem pressão sobre a parede da célula-mãe, que

rompe e libera essas estruturas. A liberação dos endósporos pode ocorrer a cada 5 a 6 horas nos tecidos ou no ambiente, dependendo da disponibilidade de nutrientes e outras condições, como temperatura, umidade e pH. Durante o processo reprodutivo, o esporângio forma, por divisão interna, entre 2 a 16 células-filhas, denominadas esporangiosporos ou endósporos. Os esporangiosporos permanecem dentro do esporângio, envoltos por uma cápsula denominada esporopolenina, até a liberação para o meio ambiente (RIBEIRO et al., 2016a).

As prototecas são heterotróficas e necessitam de fontes externas de carbono e nitrogênio. Em meios de cultura convencionais, como o ágar suplementado com sangue ovino ou bovino, se observa o isolamento de colônias após 48 horas de incubação, a temperatura de 37°C em condições aeróbicas. O isolamento da alga pode ser favorecido com o uso de meios contendo glicose ou ágar Sabouraud-dextrose (pH entre 4,5 e 8,0), nos quais se observa o desenvolvimento de colônias de 1 e 2 mm com bordas irregulares e elevadas. Para o isolamento da alga em amostras contaminadas (fezes, solo e leite de tanque de expansão), podem ser utilizados, incorporados ao meio de cultura, inibidores de micro-organismos contaminantes, como o anti-fúngico 5-fluorocitosina (PORE et al., 1983, 1987).

As colônias de *Prototheca* spp. apresentam coloração variável de acordo com a espécie. *P. zopfii* apresenta colônias irregulares, ressecadas, de tonalidade branco-acinzentada, não hemolíticas, no ágar acrescido de sangue ovino ou bovino (5%). No ágar Sabouraud-dextrose as colônias apresentam tonalidade branca. *P. wickerhamii* apresenta colônias de aspecto leveduriforme, de tonalidade creme ou branca, enquanto *P. stagnora* desenvolve colônias translúcidas ou esbranquiçadas, de aspecto mucoso ou viscoso. *P. blaschkeae* revela colônias lisas, de coloração creme (RIBEIRO et al., 2016a).

A assimilação de diferentes substratos foi utilizada como a base da classificação das principais espécies de *Prototheca* ao longo das últimas décadas (Tabela 1).



TABELA 1 - Principais características morfológicas e bioquímicas utilizadas na diferenciação de certas espécies de *Prototheca*<sup>a</sup>

Característica	<i>P. wickerhamii</i>	<i>P. zopfi</i> <sup>b</sup>	<i>P. blaschkeae</i>	<i>P. stagnora</i>	<i>P. ulmea</i>
Diâmetro da colônia (µm)	3-10	7-30	5-7.5	7-14	NI
Presença de cápsula	-	-	-	+	NI
Crescimento a 37 ° C	+	+	+	-	+
Sacarose	-	-	NI	+ <sup>c</sup>	NI
Trealose	+ <sup>d</sup>	-	-	-	-
n-Propanol	-	+	NI	-	-
Arginina	+	+	-	+	NI
Dextrose	+	+	+	+	+
Galactose	±	±	NI	+	-
Sensibilidade ao Clotrimazol (50 µg)	- <sup>e</sup>	+	NI	+	+

<sup>a</sup> Adaptado de Arnold e Ahearn (1972); Pore (1985); Roesler et al. (2006); Lass-Flörl e Mayr (2007)

<sup>b</sup> Incluindo genótipo 1 e 2

<sup>c</sup> Assimilação com 14 dias

<sup>d</sup> Assimilação com 7 dias

<sup>e</sup> Produção de zona de inibição

NI: não informado

### 2.1.1 Caracterização genotípica

Na última década foi proposta a classificação de *P. zopfii* em biotipos I, II e III com base na assimilação de açúcares, álcoois e técnicas moleculares. Posteriormente, com os avanços dos estudos moleculares, o biotipo III foi reclassificado como uma nova espécie denominada *P. blaschkeae* e os biotipos I e II classificados, respectivamente, como genótipos 1 e 2 (MÖLER et al., 2007; ROESLER et al., 2006). O genótipo 1 predomina nas fezes e no ambiente de criação de bovinos e suínos, enquanto o genótipo 2 é isolado frequentemente da mastite bovina e, ocasionalmente, em cães (RIBEIRO et al., 2009). *P. blaschkeae* é encontrada no ambiente de criatórios de bovinos, causando oncomicosose humana (ROESLER et al., 2003) e, mais recentemente, em casos de mastite bovina na Europa (RICHI et al., 2013).

Möller et al. (2007), na Alemanha, detectaram 30 isolados de *P. zopfii* do genótipo tipo 2, sugerindo que este genótipo é o mais prevalente na mastite bovina no país. Estudo realizado no Japão, em 2008, investigando a genotipagem de isolados de *P. zopfii* detectou vacas com mastite pelo genótipo 2, e a presença de isolados do genótipo 1 na água de bebedouros, efluentes e fezes dos animais (OSUMI et al., 2008).

Na Bélgica, Aouay et al. (2008), investigaram o perfil molecular de 30 isolados de *Prototheca* spp. obtidos do leite de vacas com mastite e identificaram 27 isolados como *P. zopfii* genótipo 2 e três *P. blaschkeae*.

Em estudo de infecção experimental na glândula mamária por *P. zopfii* genótipo 1, no Japão, não foram observados sinais clínicos nos animais experimentalmente infectados, embora as características histopatológicas da glândula mamária revelaram infiltrado inflamatório no lúmen tecidual (ITO et al., 2011). Jagielski et al. (2011) em estudo pioneiro na Polônia, identificaram pela primeira vez casos de mastite bovina por *P. blaschkeae* no país e verificaram que, dentre 44 isolados de *P. zopfii*, 43 (98%) foram identificados como genótipo 2 e apenas um da espécie *P. blaschkeae*.

Estudos sobre a genotipagem de *P. zopfii* isoladas de casos de mastite bovina na Europa, evidenciaram perspectivas de melhor entendimento da virulência e da epidemiologia molecular da prototecose mamária bovina (AOUAY et al., 2008), além de investigarem a sensibilidade “in vitro” de isolados dos

genótipos 1 e 2 a diferentes fármacos. Nesse estudo foi observado que os isolados do genótipo 1 foram mais sensíveis à anfotericina B, gentamicina e canamicina quando comparado ao genótipo 2, enquanto certas estirpes do genótipo 1 não foram sensíveis ao itraconazol (SOBUKAWA et al., 2011).

Amplo estudo envolvendo a caracterização genotípica de 342 linhagens de *Prototheca* spp., isoladas de mastite em diferentes países (Áustria, Bélgica, Brasil, França, Alemanha, Itália, Japão, Luxemburgo, Polônia, Portugal e Estados Unidos) revelou maior frequência do genótipo 2 (90,6%), seguido por *P. blaschkeae* (8,8%) e *P. zopfii* genótipo 1 (0,6%), o que reforça o pressuposto de predomínio de patogenicidade do genótipo 2 na mastite bovina, independentemente da região geográfica (AHRHOLDT et al., 2012).

Apesar da maior prevalência da prototecose mamária bovina atribuída a *P. zopfii*, Ricchi et al. (2013) em estudo com 104 amostras de leite, provenientes de 80 vacas na Itália, relataram a ocorrência de 5 casos (4,8%) de mastite por *P. blaschkeae*. No mesmo estudo, *P. blaschkeae* foi identificada também em três amostras isoladas do ambiente e uma do tanque de expansão.

Em 300 amostras de leite e queijo coletadas em mercados da cidade de Qena, no Egito, foram identificados, respectivamente, 55 e 58 isolados de *Prototheca* no leite cru e queijo. *P. zopfii* foi a espécie mais prevalente, isolada em 12% de leite de búfalo, 16% de leite de vaca e 42% das amostras de queijo. A técnica de PCR detectou *P. zopfii* genótipo 1 e genótipo 2 em, respectivamente, 28,88% e 71,11% das amostras, ressaltando a importância do achado no contexto da saúde pública, em razão da identificação do patógeno no leite e derivados (ABDELHAMEED, 2015).

Apesar dos estudos de genotipagem de *P. zopfii* em outros países, são praticamente inexistentes os dados de caracterização genotípica de isolados de *P. zopfii* obtidos de vacas com mastite no Brasil, que poderiam contribuir no esclarecimento da epidemiologia da prototecose bovina no país.

No Brasil, Salerno et al. (2010) descreveram pela primeira vez a identificação exclusivamente do genótipo 2 em 22 linhagens de *P. zopfii* isoladas de vacas com mastite, provenientes dos estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Goiás.

## 2.2 Epidemiologia

As prototecas estão presentes principalmente em locais com grande umidade e presença de matéria orgânica, que favorecem a multiplicação e manutenção do micro-organismo no ambiente. Existem relatos do seu isolamento do esgoto, no ambiente de ordenha (paredes e pisos de estábulos, equipamentos de ordenha), da água (água de mar, rios, córregos, lagos), de animais (fezes, leite, tecidos de abatedouros) e alimentos processados (queijo). Embora não sejam reconhecidas como patogênicas para plantas, foram isoladas do fluxo limoso de árvores (KIRK, 1991; COSTA et al., 1999; YAMAMURA et al., 2008).

Em estudo com 548 vacas em dois rebanhos italianos com prototecose mamária, amostras das fezes, alimentação, material da cama, água, superfícies (antes e depois da ordenha) e da solução de pós-dipping identificou *P. zopfii* nos utensílios de ordenha, no ambiente, nos alimentos e água (SCACCABAROZZI et al., 2008).

As algas do gênero *Prototheca* são micro-organismos oportunistas que podem invadir o organismo dos animais e humanos por mucosas, pequenas lesões ou soluções de continuidade na pele, além do canal do teto das vacas (PORE et al., 1983; HOLLINGSWORTH, 2000).

Os principais fatores de risco associados a ocorrência de mastite causada por *Prototheca* em nível de rebanho incluem o uso indevido de terapia intramamária, e a não utilização de selante de teto para tratamento de vaca seca. Outros fatores predisponentes incluem o número de lactações (maior ocorrência a partir da segunda lactação) e aumento de contagem de células somáticas durante a lactação (PIEPER et al., 2012).

## 2.3 Prototecose mamária

Algas do gênero *Prototheca* estão amplamente distribuídas no ambiente, de ordenha das propriedades. Em ecossistemas aquáticos (como rios e bebedouros) com baixa concentração de nutrientes, as espécies permanecem viáveis por longos períodos. A partir desses locais, a alga pode ser ingerida por animais e eliminada pelas fezes de vacas, bezerros e 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 de *P. zopfii* nas propriedades leiteiras são bezerros, vacas em lactação, suínos, roedores, cães e gatos.

A infecção intramamária por prototecas em vacas causa mastite clínica ou subclínica. No entanto, predomina a manifestação clínica, no decorrer da lactação, com tendência a evolução crônica. Na mastite clínica ocorre alteração visível no aspecto do leite, com presença de grumos de fibrina ou pus e coloração esbranquiçada a amarelada do leite. À palpação, a glândula mamária pode apresentar-se flácida, edemaciada, hiperêmica, com áreas endurecidas ou presença de nódulos, devido à fibrose. As vacas apresentam também redução significativa na produção de leite, geralmente sem comprometimento sistêmico do animal. Na infecção subclínica, também ocorre redução da produção láctea associada ao aumento da contagem de células somáticas, embora sem alterações visíveis no leite, podendo ser diagnosticada por testes indiretos como o California Mastitis Test - CMT e contagem de células somáticas (RIBEIRO et al., 1998; CAMBOIM et al., 2010).

A mastite bovina pelo gênero *Prototheca* tem sido considerada uma infecção emergente, dentre os agentes de origem ambiental, nos principais países produtores de leite (CAMBOIM et al., 2010), ocorrendo de modo esporádico ou em surtos nos rebanhos. A prototecose mamária é responsável por perdas econômicas significativas em razão da redução na produção de leite e na qualidade do produto, bem como pelo descarte precoce das vacas infectadas.

No Brasil, Costa et al. (1992) e Langoni (1992a,b) descreveram, contemporaneamente, pioneiramente no país, *P. zopfii* causando infecções mamárias em vacas. Após esta descrição, a prototecose mamária foi descrita em casos isolados ou em surtos em praticamente todos os estados do Brasil com expressão na produção de leite de vacas (SALERNO et al., 2010; CAMBOIM et al., 2010).

Em rebanhos nos quais a prototecose mamária em vacas se manifesta de maneira endêmica são preconizadas práticas gerais de manejo e higiene de ordenha, com ênfase às ações voltadas a profilaxia e o controle de micro-organismos de origem ambiental. Recomenda-se cuidados com o ambiente, manutenção dos equipamentos de ordenha, controle da qualidade e a cloração

da água do ambiente de ordenha, utilização de antissépticos adequados no pré e pós-dipping, oferecimento de alimento pós-ordenha, drenagem dos solos e destino adequado de excretas, e evitar adquirir animais de propriedades com histórico de prototecose mamária (YAMAMURA et al., 2008; CAMBOIM et al., 2010). No entanto, não existem protocolos terapêuticos eficazes no tratamento da prototecose mamária, permanecendo a recomendação da segregação dos animais infectados, secagem química dos tetos ou descarte dos animais. A ausência de tratamento eficaz tem motivado ensaios “in vitro” com antimicrobianos, antifúngicos, desinfetantes, algicidas e antissépticos com intuito de encontrar fármacos ou produtos químicos com potencial de tratamento para a mastite em vacas (RIBEIRO, 2008; SALERNO et al., 2010; LASSA et al., 2011; GONÇALVES et al., 2015; MORANDI et al., 2016).

#### **2.4 Prototecose humana**

A primeira descrição da prototecose em humanos foi relatada em lesão cutânea (DAVIES et al., 1964). A prototecose humana é considerada de ocorrência rara. Até o momento foram relatados cerca de 140 casos de prototecose humana, principalmente em processos tegumentares, infecções sistêmicas e bursites. Em menor frequência são referidos casos esporádicos de peritonite, gastroenterite, encefalite e hepatite, com isolamento da alga principalmente do sangue, líquido peritoneal e fragmentos de órgãos (AHRHOLDT et al., 2012).

*P. zopfii*, *P. wickerhamii*, *P. cutis* e *P. miyajii* são as espécies associadas a prototecose em humanos, principalmente pacientes imunossuprimidos. As infecções com evolução grave são observadas predominantemente em indivíduos coinfectados com doenças infecciosas debilitantes (síndrome da imunodeficiência adquirida-Aids) ou acometidos por neoplasias, diabetes e transplantados. A infecção pode ser aguda ou crônica, localizada ou disseminada (MAYORGA et al., 2012).

A prototecose aparentemente não é transmissível entre os humanos. Acredita-se que a transmissão da alga para os humanos ocorre pelo contato com água ou solo contaminado, inoculações traumáticas na pele e picadas de insetos. A ingestão de produtos de origem animal, como o consumo de leite e

derivados de animais com mastite por *Prototheca* spp., também foi documentada na transmissão (SIQUEIRA et al., 2008; AHRHOLDT et al., 2012).

No Brasil, a avaliação “in vitro” da termorresistência de linhagens de *P. zopfii* isoladas de vacas com mastite, revelou a viabilidade da alga ao binômio tempo e temperatura utilizados na pasteurização rápida e lenta, indicando o risco do consumo do leite como via de transmissão na prototecose em humanos (COSTA et al., 1992; MELVILLE et al., 2002).

## 2.5 Tratamento

A mastite causada por prototecas é refratária ao tratamento com fármacos convencionais (SOBUKAWA et al., 2011). Devido à ausência de protocolos definidos e efetivos de tratamento nas infecções mamárias em vacas por *P. zopfii*, diferentes antimicrobianos, antissépticos, algicidas, antifúngicos e desinfetantes têm sido ensaiados “in vitro” e “in vivo” em isolados da alga, com intuito de identificar produto com potencial de indicação para o tratamento “in vivo” da prototecose mamária, bem como para a desinfecção de instalações de ordenha ou para o uso como antissépticos na pré e pós ordenha (MELVILLE et al., 2002; RIBEIRO, 2008; SALERNO et al., 2010; SOBUKAWA et al., 2011; LASSA et al., 2011).

Gonçalves et al. (2015) demonstraram que o ácido peracético apresentou maior eficácia “in vitro” em dez isolados de *P. zopfii* provenientes de mastite subclínica quando comparado ao hipoclorito de sódio e solução de iodo. Mais recentemente, tratamentos alternativos na prototecose utilizaram terapia fotodinâmica (SELLERA et al., 2016) e óleos essenciais (GRZESIAK et al., 2016).

Em virtude da baixa eficácia terapêutica na prototecose mamária e dos riscos de transmissão da alga nos rebanhos, permanece a recomendação da segregação dos animais infectados, da ablação química dos tetos acometidos ou mesmo o descarte dos animais infectados (RIBEIRO et al., 2016a).

## 2.6 Uso de antissépticos e desinfetantes no controle da mastite

A limpeza, a desinfecção e antissepsia são considerados métodos fundamentais de prevenção e controle de doenças, indispensáveis para a redução e manutenção de baixa concentração de micro-organismos patogênicos no ambiente, utensílios e equipamentos utilizados no manejo dos animais, reduzindo os riscos de infecções. Estão disponíveis grande número de produtos químicos no comércio para prática da desinfecção e antissepsia. Embora as marcas comerciais sejam variadas, os princípios ativos mais utilizados são compostos fenólicos, álcoois, aldeídos, detergentes, agentes oxidantes, derivados de metais pesados, corantes, álcalis, ácido e compostos orgânico-naturais. Entre as características desejáveis de um antisséptico ou desinfetante podem ser mencionadas a ausência de toxicidade para os humanos e animais, não irritante para a pele e mucosas, ação germicida em baixas concentrações, baixo efeito corrosivo para metais e outras estruturas físicas e ação na presença de matéria orgânica (DOMINGUES e LANGONI, 2001).

Particularmente na mastite são usados antissépticos e desinfetantes visando reduzir a exposição dos tetos a potenciais agentes patogênicos. A imersão dos tetos antes da ordenha em soluções antissépticas a base de cloro, clorexidine ou iodo (pré-dipping) é fundamental para diminuir a ocorrência de mastite causada principalmente por micro-organismos de origem ambiental, enquanto a utilização de antissépticos após a ordenha (pós-dipping), auxilia na prevenção de mastite contagiosa (RIBEIRO et al., 2016b).

Conceitualmente, os antissépticos são substâncias químicas que impedem ou bloqueiam o desenvolvimento, ou a ação dos micro-organismos, tanto pela inibição da multiplicação, quanto por destruição nos tecidos vivos. Existem diversas categorias de antissépticos, incluindo álcoois (etanol), anilidas (triclocarban), biguanidas (clorexidine), bisfenóis (triclosan), compostos de cloro, derivados de iodo, prata, peróxidos e compostos de amônio quaternário. Os antissépticos desnaturam as proteínas e enzimas que constituem a estrutura básica dos micro-organismos, além de alterarem a membrana celular ou induzirem ação deletéria nos ácidos nucléicos (McDONNELL e RUSSELL, 1999).



Os desinfetantes inativam as formas vegetativas, mas não necessariamente as formas esporuladas de micro-organismos patogênicos. São mais comumente utilizados usualmente aplicados em objetos inanimados como superfícies, equipamentos e utensílios (McDONNELL e RUSSELL, 1999).

### 2.6.1 Guanidina

O estudo com novos produtos químicos de ação microbicida é necessário em razão dos diferentes mecanismos de resistência de bactérias, vírus, algas e fungos. A guanidina,  $[(\text{NH}_2)_2\text{C}=\text{NH}]$ , foi sintetizada pela primeira vez em 1861 pela degradação oxidativa de um produto natural aromático denominado guanina, isolado a partir do guano peruano. O guano peruano foi obtido pelo acúmulo de fezes de determinada espécie de pássaro nativo. A guanidina (aminoformamidina) é um composto cristalino fortemente alcalino, formada pela oxidação de guanina (YAMADA et al., 2009).

A estrutura de cristal da guanidina foi elucidada somente 148 anos após a sua primeira síntese. Apesar da simplicidade da molécula, sua atividade biológica tem sido bastante estudada nos últimos anos (GÖBEL e KLAPÖTKE, 2007; SAWINSKI et al., 2013). A molécula de guanidina se caracteriza por possuir uma região hidrofílica (solúvel em meio aquoso), e uma região hidrofóbica (insolúvel em água, porém solúvel em lipídios e solventes orgânicos) e desponta como um representante da nova geração de antissépticos para a esterilização de superfícies de materiais (ZHOU et al., 2013). Atualmente, a guanidina é utilizada como produto de efeito algicida, bactericida e fungicida para piscinas, pois não apresenta efeito irritante para mucosas e conjuntivas de humanos, é eficaz em baixas concentrações e mantém efeito microbicida em ambientes aquosos (MACHAT, 2016).

O cloridrato de poli-hexametileno biguanida (PHMB), derivado da guanidina, é um biocida químico com elevada ação microbicida. Consiste de desinfetante com amplo espectro de ação por induzir a morte celular dos micro-organismos devido ao rompimento da integridade da membrana celular. Além disso, é um produto não corrosivo e atóxico para os humanos e animais. Tem sido utilizado como conservante em cosméticos, produtos de cuidados pessoais, detergente e para a preservação de frutas e legumes (McDONNELL e RUSSELL,

1999). Também usado como antisséptico de feridas, na desinfecção de materiais hospitalares, odontológicos e equipamentos agrícolas. Uma das grandes vantagens deste biocida é a sua alta eficiência em baixas concentrações, com ação rápida e de amplo espectro. Assim, desponta como biocida promissor para desinfecção de ambientes, de alimentos, da água e de superfícies (McDONNELL e RUSSEL, 1999; MACHAT, 2016). No entanto, na literatura consultada, não foi encontrada qualquer referência de uso “in vitro” ou “in vivo” da guanidina e derivados na profilaxia/controle ou terapia de micro-organismos associados a infecções de origem animal, tampouco agentes de mastite bovina, como do gênero *Prototheca*.

# **HIPÓTESES DE ESTUDO**

### 3. HIPÓTESES DE ESTUDO

- ✓ Maior frequência do genótipo 2, incluindo nos casos subclínicos de mastite bovina;
- ✓ Identificação de outras espécies ou genótipos de *Prototheca*, além do genótipo 2;
- ✓ Ação “in vitro” da guanidina em baixas concentrações.

# **OBJETIVOS**

## 4. OBJETIVOS

### Geral:

- ✓ Investigar o perfil genotípico e avaliar a “concentração algicida mínima” da guanidina em linhagens de *P. zopfii* isoladas do leite de vacas com mastite clínica e subclínica.

### Específicos:

- ✓ Detectar os genótipos 1 ou 2 em linhagens de *P. zopfii*, ou outras espécies de *Prototheca*;
- ✓ Avaliar a menor concentração “in vitro” da guanidina com efeito algicida em isolados de *P. zopfii* obtidos de vacas com mastite clínica e subclínica;
- ✓ Comparar a caracterização dos genótipos e a concentração algicida mínima em linhagens de *Prototheca* obtidas de vacas com mastite clínica e subclínica.

# **MATERIAL E MÉTODOS**

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Animais e diagnóstico de mastite

Foram utilizados no presente estudo 75 isolados de *P. zopfi* obtidos de 68 vacas com mastite clínica (n= 60) ou subclínica (n=14) de 15 propriedades leiteiras dos estados de São Paulo, Pernambuco, Rio Grande do Sul e Paraná. Não foi possível obter informação do diagnóstico de mastite clínica ou subclínica em uma vaca amostrada (Anexo 1).

O diagnóstico da mastite clínica foi firmado com base nas alterações macroscópicas do leite na prova da caneca telada de fundo escuro (Tamis), na presença de sinais clínicos da inflamação na glândula mamária (presença de grumos, pus, sangue ou dessora) e/ou sistêmicos nos animais (RADOSTITS et al., 2007; RIBEIRO et al., 2016b). A mastite subclínica foi diagnosticada utilizando o teste clássico do “California Mastitis Test” (CMT) nos escores de 1+ a 3+ (SCHALM et al., 1971).

### 5.2 Linhagens de *Prototheca*

As linhagens utilizadas no estudo foram obtidas da rotina de diagnóstico microbiológico do leite do laboratório de Microbiologia, do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública (DHVSP), da FMVZ - UNESP/ Botucatu, SP, além de isolados cedidos pelo Prof. Dr. José Carlos de Figueiredo Pantoja, do DHVSP da FMVZ – UNESP/ Botucatu, SP, e do laboratório do Núcleo de Pesquisas em Mastites (NUPEMAS) sob responsabilidade do Prof. titular Helio Langoni, também do DHVSP da FMVZ - UNESP/ Botucatu, SP. Foram utilizados, ainda, isolados do laboratório e da bacterioteca da Disciplina de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Santa Maria, RS, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Agueda Castagna de Vargas e do Laboratório de Microbiologia, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal de Lavras, MG, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Geraldo Márcio da Costa.



### 5.3 Diagnóstico microbiológico das prototecas

O leite de todos animais com mastite foi cultivado em meio de ágar (Oxoid™) suplementado com sangue bovino desfibrinado (5%). As culturas foram mantidas em condições de aerobiose, a 37°C, por até 72 horas de incubação. Colônias compatíveis com prototeca foram classificadas com base nas características morfo-tintoriais (coloração de Gram) e de cultivo, aliado ao teste de assimilação de carboidratos utilizando trealose, glicose, sacarose e n-propanol (CAMARGO e FISCHMAN, 1979; PORE, 1985; 2005), no laboratório de Microbiologia da FMVZ - UNESP/Botucatu, SP.

As linhagens isoladas foram estocadas em triplicata no meio de Lignières, mantidas como segue: (1) em temperatura ambiente (25°C), (2) congeladas (-20°C) em BHI (Brain Heart Infusion/caldo cérebro coração) acrescido de glicerol (15%), e (3) mantidas em meio de ágar sangue bovino (5%) desfibrinado e refrigeradas (4 - 8°C), com subculturas mensais.

### 5.4 Caracterização genotípica das linhagens de *P. zopfi*

A caracterização genotípica dos isolados foi realizada no Instituto de Biologia e Biotecnologia Agrária (IBBA) do Conselho Nacional de Pesquisa (CNR) de Lodi, Itália, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Emanuele Capra. Todas as cepas foram encaminhadas para a Itália, após autorização de exportação do Departamento de Saúde Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), do Brasil, e de importação pelo Conselho Italiano de Pesquisa, do Instituto de Biologia e Biotecnologia Agrária, localizado na cidade de Lodi.

Foi utilizado a técnica de reação em cadeia pela polimerase multiplex para análise simultânea de duas regiões diferentes do gene 18S rDNA.

## 5.4.1 Técnica da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

### 5.4.1.1 Cepas de referência

Para a técnica de PCR foram utilizadas as seguintes cepas de referência: *Prototheca zopfii* genótipo 2 (SAG2021<sup>T</sup>); *P. zopfii* genótipo 1 (SAG2063<sup>T</sup>) e *P. blaschkeae* (SAG2064<sup>T</sup>) pertencentes a Coleção de Cultura de Algas (SAG) da Universidade de Göttingen, Alemanha. Todas as linhagens foram cultivadas em meio de Sabouraud a 37°C, por 48 horas, em condições de aerobiose, para análise de pureza, antes do uso como cepas de referência.

### 5.4.1.2 Extração de DNA e amplificação do material genético

O material genético (DNA) foi extraído conforme descrito por Cremonesi et al. (2012) e a PCR multiplex para detecção de espécies e genótipos de acordo com Capra et al. (2014).

#### 5.4.1.2.1 Extração de DNA

Para a extração do DNA dos isolados e cepas de referência, 4 a 5 colônias típicas foram diluídas em 400 µL de solução tampão de lise (3 mol/L de tiocianato de guanidina, 20 mmol/L de EDTA, 10 mmol/L de Tris-HCl, pH 6,8, 40 mg/mL de Triton X-100, 10 mg/mL de ditiotretitol). O material foi agitado em vórtex durante 30 segundos para se obter uma solução emulsificada. Após a adição de 500 µL de solução de ligação (40 mg/mL de sílica), a amostra foi incubada durante 5 min, entre 20 e 24°C. Após centrifugação (30 segundos a 550 x g), o sobrenadante foi descartado e o sedimento de DNA-sílica obtido foi lavado duas vezes com 200 µL de solução tampão de lise, duas vezes com 200 µL de solução de lavagem (etanol absoluto a 25%, 25% de isopropanol, 100 mmol/L de NaCl, 10 mmol/L de Tris-HCl, em pH 8) e uma vez com 200 µL de etanol absoluto. Depois de cada lavagem e agitação em vórtex, o sedimento de DNA-sílica foi centrifugado (30 segundos a 550 x g) e o sobrenadante descartado. O sedimento foi seco a vácuo (56°C) num bloco de aquecimento durante 10 minutos. Após a adição de 100 µL de tampão de eluição (10 mmol/L de Tris-HCl, pH 8, 1 mmol/L de EDTA), o sedimento de DNA-sílica foi suavemente agitado em vórtex e incubado durante 15 minutos a 65°C. Após 5 minutos de centrifugação

(550 x g), o sobrenadante contendo o DNA foi recuperado e armazenado a -20°C.

#### 5.4.1.2.2 Amplificação do material genético

Para a detecção molecular das prototecas, todos os isolados foram submetidos a análise de Polimorfismo de conformação de filamento único (*PCR-single strand conformation polymorphism - SSCP-PCR*), descrito previamente por Cremonesi et al. (2012). Esta técnica é baseada na análise simultânea de duas regiões diferentes do gene 18S rDNA, possibilitando a identificação das espécies de *Prototheca*.

Duas regiões específicas do gene 18S rDNA que distinguem as espécies foram alvo para a concepção de iniciadores utilizando o software Primer3 (ROZEN e SKALETSKY, 2000), disponível em: <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>. Com base em sequências conhecidas do GenBank (número de acesso AY973040 para *P. zopfii* genótipo 1, AY940456 para *P. zopfii* genótipo 2, AB096930 para *P. stagnora*, X74003 para *P. wickerhamii*, AB096929 para *P. ulmea*, AY973041 para *P. blaschkeae* e AB470468 para *P. cutis*), foram utilizados dois pares de primers com dois fragmentos de amplificação: 313 bp (Fw 5' TGCTGCAGTTAAAAAGCTCGT3' e Rv 5' TCCAAGAATTTACCTCTGACA3') e 290 pb (Fw 5' GCCTGCGGCTTAATTTGAC 3' e Rv 5' CGGCCAGAACATCTAAGG 3'). Todas as reações de PCR foram realizadas no sistema GeneAmpPCR 2700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) em tubos de 0,2 mL contendo 12,5 µL de 2x PCR Master Mix (Fermentas, SRL-H médica, Milão, Itália), 20 pmol de cada iniciador, 30 ng de DNA extraído e água estéril em total de 25µL da reação. Um procedimento de pré-PCR foi executado a 94°C durante 5 min seguido por 30 ciclos de PCR sob as seguintes condições: desnaturação a 94°C durante 1 min, anelamento a 56° C durante 1 min, e extensão a 72°C durante 1 min. Após o ciclo final, a preparação foi mantida a 72°C durante 10 min para completar a reação. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese com 10% de gel de poliacrilamida.

## 5.5 “Concentração Algicida Mínima” (CAM)

### 5.5.1 Preparo dos inóculos

Todas as linhagens de prototeca foram cultivadas no meio de ágar acrescido de sangue bovino desfibrinado (5%), mantidas em condições de aerobiose, a 37°C, por 72 horas (PORE, 2005; SALERNO et al., 2010). Duas a três colônias isoladas de cada linhagem foram repicadas em tubos contendo 10mL de caldo infusão cérebro e coração – BHI (Oxoid™), e incubadas em aerobiose, a 37°C. A turvação dos tubos foi ajustada por densidade óptica equivalente ao tubo 1 da escala de Mac Farland, que corresponde a aproximadamente 300 milhões de micro-organismos/mL (BIER, 1984).

### 5.5.2 Diluições da guanidina para avaliação da CAM

Foi utilizado como princípio ativo da guanidina a 18,10% (Solo<sup>®</sup>, Sandet Química Ltda) disponível na forma líquida para avaliação da “concentração algicida mínima”.

Para cada linhagem de *P. zopfii* foram utilizados 15 tubos esterilizados, em duplicata. No primeiro tubo foi depositado 1mL de guanidina à 18,10%. Nos 14 tubos subsequentes foram distribuídos 0,5mL de água Mili-Q esterilizada. Em seguida, transferiu-se 0,5mL de guanidina a 18,1% do primeiro para o segundo tubo e realizou-se a homogeneização. Este mesmo procedimento foi realizado sucessivamente nos demais tubos com descarte de 0,5mL do tubo 15. Logo após, foi acrescido em cada tubo 0,5mL do inóculo de *P. zopfii*, perfazendo as seguintes diluições: 9,050%, 4,525%, 2,262%, 1,131%, 0,565%, 0,282%, 0,141%, 0,070%, 0,035%, 0,017%, 0,008%, 0,004%, 0,002%, 0,001% e 0,0005%. Os tubos foram incubados em condições de aerobiose, mantidos a 37°C, por aproximadamente 12 horas. Em seguida, uma alíquota (10µL) de cada respectiva diluição foi semeada no meio de ágar (Oxoid™) acrescido de sangue bovino desfibrinado (5%) e incubado em condições de aerobiose, a 37°C, mantidos por cinco dias. Foram realizadas leituras dos cultivos de cada diluição a cada 24 horas, visando a avaliação do efeito algicida do produto. A “concentração algicida mínima” foi avaliada, por analogia, com base no conceito

---

\*Solo<sup>®</sup>: Sandet Química Ltda, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil

clássico da concentração bactericida mínima (QUINN et al., 2011), substituindo, no entanto, as bactérias por algas. A concentração algicida mínima foi considerada a menor concentração da guanidina capaz de inativar as prototecas após o cultivo, de cada diluição, no meio de ágar suplementado com sangue bovino (5%).

Como soluções controle foram preparadas também suspensões em tubos previamente esterilizados, contendo 0,5mL de água Mili-Q esterilizada e de 0,5mL do inóculo, ajustado a turbidez da escala 1 de Mac Farland.

Para efeito de cálculo da CAM, para cada linhagem, foram admitidos somente isolados que apresentaram, no máximo, duas diluições de discrepância entre os resultados da duplicata. Nas linhagens que apresentaram divergência de uma ou duas diluições na duplicata, para efeito de cálculo, foi utilizado o tubo com menor diluição (maior concentração de guanidina). Os resultados de linhagens com três ou mais diluições de divergência, na duplicata, foram descartados.

### **5.5.3 Cepas de referência do gênero *Prototheca***

A CAM também foi realizada conforme procedimento supracitado, utilizando cepas de referência de *P. zopfii* genótipo 1 (RZI-3), genótipo 2 (LZ-5) e *Prototheca blaschkeae* (RZIII-3), cedidas gentilmente pelo professor Dr. Tomaz Jagielski, do Institute of Microbiology, Departamento of Applied Microbiology, University of Warsaw (Varsóvia), Polônia.

### **5.6 Universo amostral**

O número de prototecas utilizados no estudo foi obtido por amostragem de conveniência, em razão da inconsistência de isolamento de prototeca nos rebanhos, dificultando, portanto, uma amostragem representativa dos estados nos quais foram obtidos os isolados.

### **5.7 Análise estatística**

Para avaliar a ação algicida (CAM) da guanidina diante das linhagens de prototecas foi realizada uma análise descritiva dos dados. O teste Mann-Whitney foi utilizado para comparar a mediana da CAM entre casos de mastite clínica e subclínica. As análises foram realizadas utilizando o programa estatístico GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA), considerando diferença significativa para valores de  $P < 0,05$ .

### **5.8 Comissão de Ética**

O estudo proposto foi aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animais da FMVZ – UNESP/Botucatu, SP, protocolo número 181/2013-CEUA.

# **RESULTADOS**

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Caracterização fenotípica das linhagens de prototeca

Foram isoladas 75 linhagens de prototecas das quais, 60 (80,0%) provenientes de mastite clínica e 14 (18,7%) de casos subclínicos. Não foi possível obter informação do diagnóstico de mastite clínica ou subclínica em uma (1,3%) vaca amostrada. Dos 14 casos subclínicos, 10 foram isolados de 4 propriedades que também apresentavam casos clínicos de mastite (variando de 3 a 21 casos clínicos entre as propriedades). Em três propriedades foram observados somente casos subclínicos (variando de um a dois casos).

A caracterização fenotípica das 75 linhagens revelou que todos os isolados foram identificados preliminarmente como *P. zopfii*.

### 6.2 Caracterização genotípica das linhagens de prototeca

A caracterização genotípica das 75 linhagens de prototeca submetidas a técnica de PCR multiplex detectou que todos os isolados apresentaram o mesmo padrão de migração, possibilitando a identificação como *P. zopfii* genótipo 2.

### 6.3 Concentração algicida mínima

Das 75 linhagens de prototecas, todas apresentaram variação na CAM em, no máximo, duas diluições, permanecendo todos os isolados no estudo.

O teste “in vitro” utilizando guanidina revelou que as 75 linhagens de prototeca apresentaram CAM variando entre 0,001% a 0,035%. A Tabela 2 sumariza os resultados da CAM dos 75 isolados de *P. zopfii* submetidos a ação algicida “in vitro” da guanidina.



TABELA 2 - Concentração algicida mínima da guanidina em 75 linhagens de *Prototheca zopfii* isoladas de mastite bovina. Botucatu, SP, 2016.

Número de linhagens (%)	CAM (%)
2 (2,7%)	0,001
7 (9,3%)	0,002
17 (22,7%)	0,004
38 (50,7%)	0,008
10 (13,3%)	0,017
1 (1,3%)	0,035

As cepas de referência de *P. zopfii* genótipo 1 (RZI-3), *P. zopfii* genótipo 2 (LZ-5) e *P. blaschkeae* (RZIII-3) quando submetidas a ação “in vitro” da guanidina apresentaram CAM, respectivamente, de 0,008%, 0,035% e 0,002%. Valores de percentis, média e erro padrão da média da CAM da guanidina nas 75 linhagens de *P. zopfii* estão representados na Tabela 3.

TABELA 3 - Média, mediana, percentis, erro padrão da média, intervalo de confiança (95%), valores mínimos e máximos\* para a concentração algicida mínima (CAM) da guanidina em 75 estirpes de *Prototheca zopfii* isoladas de casos de mastite bovina. Botucatu, SP, 2016.

Valor Mínimo	0,001
25º Percentil	0,004
Mediana	0,008
75º Percentil	0,008
Valor máximo	0,035
Média	0,008
Erro padrão	0,0006
IC (95%)	0,007 - 0,010

\* Valores em percentuais

A Figura 1 representa os valores de CAM da guanidina nos isolados de *P. zopfii* considerando os valores estabelecidos nas diluições. É possível observar que 50% da ação algicida “in vitro” da guanidina nos isolados situa-se nas concentrações entre 0,004 e 0,008%.

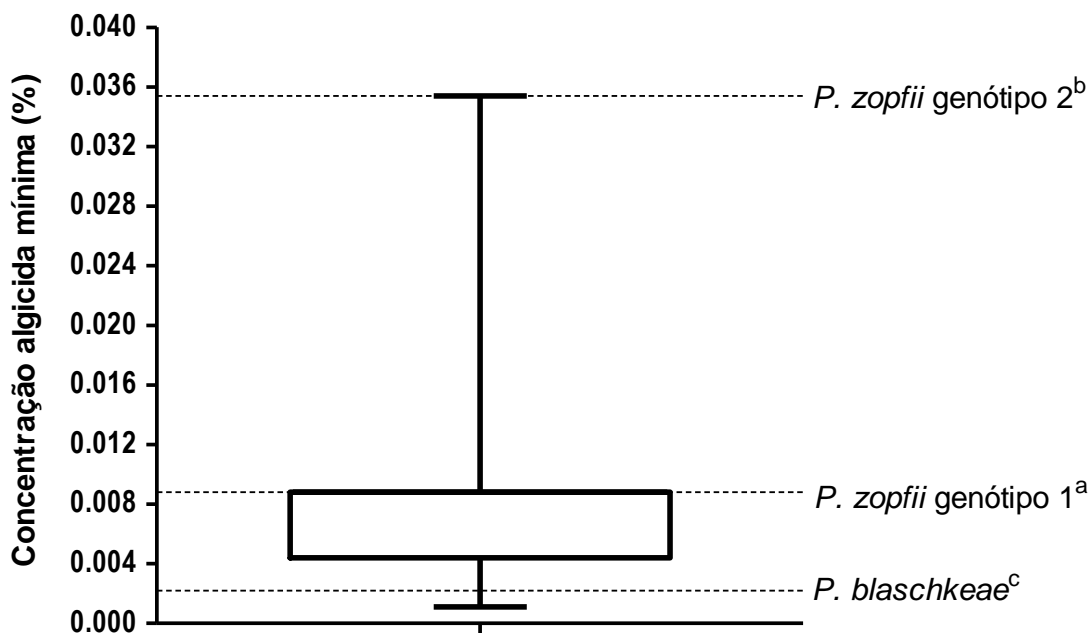


FIGURA 1 - Concentração algicida mínima da guanidina “in vitro” diante das 75 linhagens da *Prototheca zopfii* isoladas de mastite bovina e cepas de referência (<sup>a</sup>*P. zopfii* genótipo 1 = RZI-3; <sup>b</sup>*P. zopfii* genótipo 2 = LZ-5; <sup>c</sup>*P. blaschkeae* = RZIII-3). Botucatu, SP, 2016.

Observou-se que a cepa de referência de *P. zopfii* genótipo 2 apresentou CAM no limite da menor diluição (mais concentrado) dos isolados do presente estudo, enquanto as cepas de referência de *P. zopfii* genótipo 1 e *P. blaschkeae* apresentaram CAM em concentrações próxima às obtidas para cerca de 50% das linhagens testadas (Figura 1).

A Figura 2 confronta os achados da CAM e a frequência dos casos clínicos ou subclínicos nas infecções mamárias por *P. zopfii* genótipo 2.

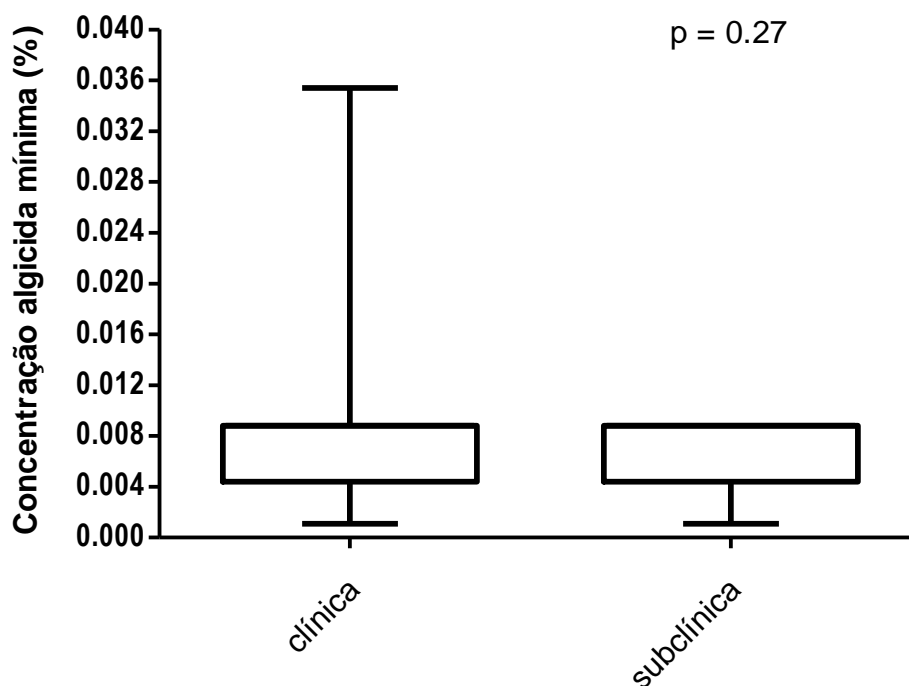


FIGURA 2 - Concentração algicida mínima da guanidina em 74 linhagens da *Prototheca zopfii* genótipo 2 segundo casos de mastite clínica ou subclínica bovina. Botucatu, SP, 2016.

#### 6.4 Análise estatística

Como todas as linhagens foram identificadas como *P. zopfii* pertencentes ao genótipo 2 não foi possível observar influência da espécie de prototeca no efeito algicida “in vitro” da guanidina. Não houve diferença entre casos clínicos ou subclínicos de mastite e a concentração algicida mínima entre os 74 isolados ( $p=0,27$ ).

**DISCUSSÃO**

## 7. DISCUSSÃO

Nas últimas duas décadas, *Prototheca* spp. tem sido referida como um dos principais patógenos de mastite clínica bovina de origem ambiental, em razão dos prejuízos causados nos rebanhos acometidos, com aumento considerável da ocorrência em diferentes países de todos os continentes (AHRHOLDT et al., 2012), incluindo o Brasil (BUENO et al., 2006; LANGONI et al., 2013). A ampla distribuição geográfica do micro-organismo e a presença do patógeno no ambiente são fatores que limitam a adoção de medidas efetivas específicas de controle e profilaxia da prototecose mamária. Soma-se, o provável subdiagnóstico em laboratórios não veterinários e a resistência da alga aos protocolos terapêuticos convencionais, dificultando, sobremaneira, o controle da prototecose mamária em vacas (SOBUWAKA, 2011; RIBEIRO et al., 2016a).

Dos 75 isolados de prototeca utilizados no estudo, 60 (80,0%) foram obtidos de vacas com mastite clínica. Este achado concorda com diferentes estudos em outros países (MARQUES et al., 2010; JAGIELSKI et al., 2011; AHRHOLDT et al., 2012) e no Brasil (COSTA et al., 1997; COSTA et al., 2000; BUENO et al., 2006; SALERNO et al., 2010) que também descreveram maior ocorrência de casos de mastite clínica por *P. zopfii* na espécie bovina. O predomínio da manifestação clínica em vacas infectadas por micro-organismos de origem ambiental, tem sido atribuída a pouca adaptabilidade deste grupo de agentes à mucosa e ao epitélio glandular. Ao contrário, os micro-organismos causadores da mastite contagiosa são encontrados na microbiota de pele, mucosas e conjuntivas (considerados mais adaptados ao epitélio e mucosas) e, portanto, são associados mais frequentemente a mastite subclínica. Contudo, os agentes ambientais, incluindo *P. zopfii*, após invadirem a glândula mamária por via ascendente canal do teto, comumente desencadeiam graves processos inflamatórios, que geralmente se exteriorizam como manifestações clínicas de mastite, alterando as características macroscópicas do leite, desencadeando manifestações clínicas na glândula mamária e/ou sistêmicas nos animais (PHILPOT e NICKERSON, 2002; RIBEIRO et al., 2016b).

Apesar da maior ocorrência de casos clínicos na prototecose mamária bovina, infecções subclínicas também têm sido relatadas (HODGES et al., 1985;

COSTA et al., 1996a, GONÇALVES et al., 2015). Em estudo com 26 casos de mastite em duas propriedades leiteiras no Brasil, com 155 animais em lactação, foram identificados 16 (61,5%) de casos de mastite subclínica por *P. zopfii* (COSTA et al., 1996a). No presente estudo foram diagnosticados cerca de 20% de casos de mastite subclínica por *P. zopfii*, dos quais 10 casos foram isolados de quatro propriedades que também apresentavam vacas com casos clínicos. Esse resultado alerta para a necessidade de considerar também *P. zopfii* como patógeno de mastite subclínica, com intuito de evitar o subdiagnóstico ou mesmo otimizar o diagnóstico precoce da alga, visando adotar ações de profilaxia e controle nos rebanhos minimizando a disseminação do patógeno entre os animais. Assim, de posse do isolamento microbiológico de algas do gênero *Prototheca* de vacas com mastite clínica, recomenda-se que seja realizado também o cultivo microbiológico do leite de quartos mamários com mastite subclínica, de animais do mesmo rebanho, devido a possibilidade de isolamento também da alga em infecções mamárias subclínicas.

Algas do gênero *Prototheca* recuperadas do leite de vacas com mastite são isoladas, usualmente, a partir de 48 horas de incubação. Apesar das características bem definidas das colônias - que possibilitam o diagnóstico presuntivo em meios convencionais como ágar suplementado com sangue ovino ou bovino (5%) - é comum a prática do descarte de placas de cultivo microbiológico após 24 horas de incubação em laboratórios humanos ou não especializados na lactocultura de amostras de origem animal (RIBEIRO et al., 2016b). Assim, ressalta-se a importância do encaminhamento do leite de vacas com mastite para laboratórios especializados de microbiologia veterinária, com o intuito de otimizar o diagnóstico, evitando o subdiagnóstico, que pode agravar o problema de mastite nos rebanhos, incluindo por prototecas (YAMAMURA et al., 2008; SALERNO et al., 2010).

A caracterização molecular e dos genótipos das prototecas nas últimas décadas tem possibilitado melhor compreensão dos fatores de virulência (GONÇALVES et al., 2015) e da epidemiologia da doença, principalmente no que tange a distribuição geográfica do patógeno (ROESLER et al., 2006; AHRHOLDT et al., 2012; MORANDI et al., 2016). No presente estudo, foram detectados exclusivamente isolados de *P. zopfii* genótipo 2. Esse resultado concorda com a maioria de estudos similares de caracterização molecular de

prototecas isoladas de mastite bovina conduzidos na Alemanha (MÖLLER et al., 2007) e Polônia (JAGIELSKI et al., 2011), apesar da identificação, em baixa ocorrência, de *P. zopfii* genótipo 1 na Bélgica (AOAY et al., 2008) e *P. blaschkeae* na Polônia (JAGIELSKI et al., 2011) causando mastite bovina. Esses resultados confirmam que o genótipo 2 de *P. zopfii* pode ser considerado o mais patogênico dentre as espécies de *Prototheca* na ocorrência da mastite bovina em todo o mundo (AHRHOLDT et al., 2012), incluindo o Brasil (SALERNO et al., 2010).

O aumento global da ocorrência da prototecose mamária bovina (AHRHOLDT et al., 2012), somado aos insucessos de protocolos terapêuticos não efetivos utilizando antimicrobianos e antifúngicos convencionais (provavelmente devido a rígida parede celular da alga e indução de reações piogranulomatosas) [SOBUWAKA, 2011; GRZESIAK et al., 2016; RIBEIRO et al., 2016a], têm justificado estudos “in vitro” com novos fármacos, algicidas, desinfetantes e antissépticos em vários países (SOBUKAWA et al., 2011; MORANDI et al., 2016), incluindo no Brasil (MELVILLE et al., 2002; SALERNO et al., 2010; SOBUKAWA et al., 2011). Nesse contexto, o presente estudo investigou o efeito “in vitro” da guanidina em isolados de *P. zopfii* obtidos de mastite bovina. A guanidina, é considerado produto microbicida promissor, em razão da sua ação eficaz de morte celular de micro-organismos por ruptura das membranas celulares. Esse produto é comercializado em dias atuais como microbicida de ação algicida, fungicida e bactericida para piscinas de entretenimento humano. A guanidina apresenta ausência de toxicidade para mucosas e conjuntivas de humanos e elevado efeito algicida em baixas concentrações. No presente estudo, a guanidina mostrou efeito algicida “in vitro” para as 75 linhagens de *P. zopfii* em diluições que variaram de 0,001% a 0,035%, demonstrando a ação do produto em concentrações extremamente baixas. De maneira similar, outros estudos “in vitro” têm demonstrado ação algicida de desinfetantes como tintura de iodo (0,15 a 0,62%), hipoclorito de sódio (0,03 a 0,15%) [SALERNO et al., 2010] e ácido peracético ( $MIC_{90} \geq 0.019$  g/L) [GONÇALVES et al., 2015]. Nos isolados do presente estudo, a guanidina mostrou efeito algicida em 50% das prototecas em concentrações inferiores (0,004 a 0,008%) às obtidas utilizando outros produtos antissépticos ou desinfetantes testados anteriormente em linhagens de *P. zopfii* (SALERNO et

al., 2010; SOBUKAWA et al., 2011; LASSA et al., 2011). Com efeito, os resultados do presente estudo indicam que, hipoteticamente, a guanidina poderia ser utilizada para a obtenção de efeito algicida em estudos prospectivos visando a desinfecção de superfícies e equipamentos de ordenha ou mesmo compondo soluções de pré e pós-dipping. Neste contexto, estudos “in vitro” na Polônia descreveu a eficácia do iodo, amônia quaternária e ácido dodecilbenzeno em isolados de *P. zopfii* obtidos de mastite bovina (LASSA et al., 2011). Esses produtos também são utilizados comercialmente para o procedimento rotineiro de pré e pós-dipping em vacas. No mesmo estudo, foi observado que após 12 horas de exposição, nenhum isolado foi capaz de suportar as concentrações de 0,01% para solução de iodo, 0,1% para amônia quaternária e 3% para o ácido dodecilbenzeno.

Em estudo recente, Morandi et al. (2016) ao testarem “in vitro” 13 isolados de *Prototheca* da Itália e 33 isolados do Brasil, observaram que todos os isolados apresentaram resistência à lisozima e sorbato de potássio, apesar da ineficiência de outros desinfetantes e antissépticos. Curiosamente, neste mesmo estudo, 31 isolados de *P. zopfii* genótipo 2 (73,8%) exibiram sensibilidade à nisina, uma bacteriocina produzida por linhagens do probiótico *Lactococcus lactis*, com MIC variando entre 18,5 a 26,7 UI/g.

No Brasil, Salerno et al. (2010) descreveram a eficácia da tintura de iodo e hipoclorito em linhagens de *P. zopfii*, embora esses produtos sejam de uso comum na rotina de ordenha como antissépticos para soluções de pré e pós-dipping para profilaxia da mastite bovina.

Os achados do presente estudo mostraram sensibilidade “in vitro” dos isolados de prototeca para guanidina em baixas concentrações (0,001 a 0,035%), indicando que esse produto poderia ser empregado como alternativa de solução antisséptica principalmente para o pré-dipping em rebanhos com histórico de prototecose mamária. No entanto, é necessário considerar que a efetividade dos antissépticos nas soluções de pré-dipping é influenciada pela presença de matéria orgânica e tempo de exposição do teto ao produto (DOMINGUES e LANGONI, 2001). Assim, são necessários estudos para comprovar a eficiência da guanidina como antisséptico para imersão de tetos ou como desinfetante na higienização de ambientes e utensílios de ordenha em vacas, particularmente em rebanhos com casos de prototecose mamária.



O efeito algicida “in vitro” da guanidina nos isolados de prototeca, em baixas concentrações, suporta a evidência que esse produto possa ser ensaiado em estudos futuros envolvendo o tratamento “in vivo” da prototecose, por via intramamária; posto que a guanidina não causa efeitos nocivos em conjuntivas e mucosas de humanos e é utilizada comercialmente em piscinas de entretenimento humano com ação algicida, bactericida e fungicida.

Não foi observada diferença entre a CAM da guanidina entre casos de mastite clínica e subclínica, mostrando que o efeito algicida do produto não sofreu influência da gravidade do processo inflamatório na glândula mamária causado pelas prototecas. Não foram encontradas também outras espécies da alga causando mastite nos animais amostrados, incluindo o genótipo 1 de *P. zopfii*, que aparentemente apresenta baixa ocorrência na mastite (AHRHOLDT et al., 2012) ou mesmo *P. blaschkeae*, mais associada com o ambiente dos criatórios de animais de produção (PIEPER et al., 2012).

Nas últimas duas décadas, relatos de casos de mastite bovina por *P. zopfii* e episódios de surtos têm sido descrito de modo crescente no Brasil e em vários países de todos os continentes. O estudo de 75 isolados de *P. zopfii* obtidos de mastite bovina, procedentes de animais de diferentes estados do Brasil, reforça a preocupação com a prototecose mamária no país (COSTA et al., 1996a; BUENO et al., 2006; SALERNO et al., 2010), devido aos prejuízos na queda na produção e descarte precoce de animais infectados. Nesse contexto, a investigação de compostos que possibilitem tratamentos efetivos, com reprodutibilidade de resultados, e ausência de toxicidade para os animais e humanos, representa objeto relevante de estudo para agentes de mastite bovina refratários aos tratamentos convencionais, particularmente por espécies do gênero *Prototheca*.

# **CONCLUSÕES**

## 8. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo permitiram inferir que:

- ✓ A maior frequência da mastite clínica nas vacas por *P. zopfii* reforça o predomínio da prototecose clínica mamária nessa espécie; embora a presença de cerca de 20% de casos subclínicos evidencie a necessidade do cultivo microbiológico de amostras subclínicas – particularmente em propriedades com casos clínicos – evitando o subdiagnóstico da alga nos rebanhos;
- ✓ Todas as linhagens de *P. zopfii* foram caracterizadas como pertencentes ao genótipo 2, em concordância com o perfil genotípico de isolados da alga encontrados na mastite bovina em diversos países, o que confirma o predomínio deste genótipo em linhagens isoladas do leite de vacas com prototecose mamária;
- ✓ Observou-se efeito algicida “in vitro” da guanidina em todos os isolados, em baixas concentrações, que indica a possibilidade do uso deste composto na higienização de ambiente e utensílios de ordenha, em soluções de pré e pós-dipping em propriedades com casos de prototecose mamária, assim como no tratamento intramamário e ablação química de quartos mamários acometidos por *P. zopfii*.
- ✓ Não houve diferença entre casos clínicos ou subclínicos de mastite e a concentração algicida mínima da guanidina entre os isolados de *P. zopfii*, mostrando que o efeito algicida do produto não sofreu influência da gravidade do processo inflamatório na glândula mamária causado pelas prototecas.

## **REFERÊNCIAS**

## 9. REFERÊNCIAS

ARNOLD, P.; AHEARN, D. G. The systematics of the genus *Prototheca* with a description of a new species *P. filamenta*. *Mycology*, v. 64, p. 265-275, 1972.

AHRHOLDT, J.; MURUGAIYAN, J.; STRAUBINGER, R. K.; JAGIELSKI, T.; ROESLER, U. Epidemiological analysis of worldwide bovine, canine and human clinical *Prototheca* isolates by PCR genotyping and MALDI-TOF mass spectrometry proteomic phenotyping. *Medical Mycopathology*, v. 50, p. 234-243, 2012.

ABDELHAMEED, K. G. Detection of *Prototheca zopfii* in raw milk and cheese with special reference to their antibiogram. *Journal of Safety Food*, v. 36, n. 2, p. 214-219, 2015.

AOUAY, A.; COPPÉE, F.; CLOET, S.; CUVELIER, P.; BELAYEW, A.; LAGNEAU, P.E.; MULLENDER, C. Molecular characterization of *Prototheca* strains isolated from bovine mastitis. *Journal of Medical Mycology*, v. 18, p. 224-227, 2008.

BIER, O. *Bacteriologia e Imunologia*. 23. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1984. 1234 p.

BOSSCHE, V. D.; HAAN, R.; BOSCH, J. V. W.; HECKE, W. V.; SYMOENS, F.; BORRE, I. V.; ALLARD, S. A. Case report: infrapatellar bursitis caused by *Prototheca wickerhamii*. *Medical Mycology Case Reports*, v. 1, p. 13-16, 2012.

BUENO, V. F. F.; MESQUITA, A. J.; NEVES, R. B. S.; SOUZA, M. A.; RIBEIRO, A. R.; NICOLAU, E. S.; OLIVEIRA, A. N. Epidemiological and clinical aspects of the first outbreak of bovine mastitis caused by *Prototheca zopfii* in Goiás State, Brazil. *Mycopathologia*, v. 161, p. 141-145, 2006.

CAMARGO, Z. P.; FISCHMAN, O. Use of morpho-physiological characteristics for differentiation of the species of *Prototheca*. *Sabouradia*, v. 17, p. 275-278, 1979.

CAMBOIM, E. K. A.; NEVES, P. B.; GARINO JR., F.; MEDEIROS, J. M.; RIET-CORREA, F. Prototecose: uma doença emergente. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 30, p. 94-101, 2010.

CAPRA, E.; CREMONESI, P.; CORTIMIGLIA, C.; BIGNOLI, G.; RICCHI, M.; MORONI, P.; PESCE, A.; LUINI, M.; CASTIGLIONI, B. Simultaneous identification by multiplex PCR of major *Prototheca* spp. isolated from bovine and buffalo intramammary infection and bulk tank. *Letters in Applied Microbiology*, v. 59, p. 642-664, 2014.

CHEVILLE, N. F.; McDONALD, J.; RICHARD, J. L. Ultrastructure of *Prototheca zopfii* in bovine granulomatous mastitis. *Veterinary Pathology*, v. 21, p. 341-348, 1984.

COSTA, E. O.; CARCIOFI, A. C.; MELVILLE, P. A.; PRADA, M. S.; SCHALCH, U. *Prototheca* spp. Outbreak of bovine mastitis. In: CONGRESSO PAMERICANO DE BUIATRIA DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 13., 1992, Santiago. *Anais ...* Santiago, 1992.

COSTA, E. O.; CARCIOFI, A. C.; MELVILLE, P. A.; SCHALCH, U. *Prototheca* sp outbreak of bovine mastitis. *Journal Veterinary Medicine*, v. 43, p. 321-324, 1996a.

COSTA, E. O.; RIBEIRO, A. R.; MELVILLE, M. A.; PRADA, M. S.; CARCIOFI, A. C.; WATANABE, E. T. Bovine mastitis due to algae of the genus *Prototheca*. *Mycopathologia*, v. 133, p. 85-88, 1996b.

COSTA, E. O.; MELVILLE, P. A.; RIBEIRO, A. R.; WATANABE, E. T.; PAROLARI, M. C. Epidemiologic study of environmental sources in *Prototheca zopfii* outbreak of bovine mastitis. *Mycopathologia*, v. 137, p. 33-36, 1997.

COSTA, E. O.; RIBEIRO, A. R.; WATANABE, E. T.; GARINO JR., F.; SILVA, J. A. B.; JUNQUEIRA, L. Controle de surto de mastite por *Prototheca zopfii* em uma propriedade leiteira. *NAPGAMA*, v. 2, p. 12-16, 1999.

COSTA, E. O.; RIBEIRO, A. R.; WATANABE, E. T.; GARINO JR., F.; SILVA, J. A. B. Pesquisa de *Prototheca* sp em fezes de bezerros em propriedades que utilizam o leite de animais com mastite no manejo alimentar dos mesmos em comparação com as que não utilizam. *NAPGAMA*, v. 1, p. 20-22, 2000.

COSTA, E. O.; GARINO JR., F.; RIBEIRO, A. R.; WATANABE, E. T.; SILVA, J. B.; DINIZ, L. S. Participação de animais silvestres na cadeia epidemiológica da mastite bovina por *Prototheca zopfii*. *NAPGAMA*, v. 4, p. 6-9, 2001.

CREMONESI, P.; POZZI, F.; RICCHI, M.; CASTIGLIONI, B.; LUINI, M.; CHESSA, S. Identification of *Prototheca* species from bovine milk samples by PCR-single strand conformation polymorphism. *Journal of Dairy Science*, v. 95, p. 6963-6968, 2012.

DAVIES, R. R.; SPENCER, H.; WAKELIN, P. O. A case of human protothecosis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 58, p. 448-451, 1964.

DOMINGUES, P. F.; LANGONI, H. *Manejo sanitário animal*. Rio de Janeiro: EPUB, 2001.

GRAPHPAD Prism, release 5.0. San Diego, USA: Graphpad Prism Software Inc., 2007.

GRZESIAK, B.; GLOWACKA, A.; KRUKOWSKI, H.; LISOWSKI, A.; LASSA, H.; SIENKIEWICZ, M. The in vitro efficacy of essential oils and antifungal drugs against *Prototheca zopfii*. *Mycopathologia*, 2016. No prelo.

GÖBEL, M.; KLAPÖTKE, T. M. First structural characterization of guanidine,  $\text{HN}=\text{C}(\text{NH}_2)_2$ . *Chemical Communications*, v. 30, p. 3180-3182, 2007.

GONÇALVES, J. L.; LEE, S. H. I.; ARRUDA, E. P.; LEE, S. I.; ARRUDA, E. P.; GALLES, D. P.; CAETANO, V. C.; OLIVEIRA, C. A. F.; FERNANDES, A. M.; SANTOS, M. V. Biofilm-producing ability and efficiency of sanitizing agents against *Prototheca zopfii* isolates from bovine subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, v. 98, p. 3613-3621, 2015.

HODGES, R. T.; HOLLAND, J. T.; NEILSON, F. J.; WALLACE, N. M. *Prototheca zopfii* mastitis in a herd of dairy cows. *New Zealand Veterinary Journal*, v. 33, p. 108-111, 1985.

HOLLINGSWORTH, S. R. Canine protothecosis. *Veterinary Clinical North American Small Animal Practice*, v. 30, p. 1091-1101, 2000.

ITO, T.; KANO, R.; SOBUKAWA, H.; OGAWA, J.; HONDA, Y.; HOSOI, Y.; SHIBUYA, H.; KAMATA, H. Experimental infection of bovine mammary gland with *Prototheca zopfii* genotype 1. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 73, p. 117-119, 2011.

JAGIELSKI, T.; LAGNEAU, P. E. Protothecosis: a pseudofungal infection. *Journal Mycology and Medical*, v. 17, p. 261-270, 2007.

JAGIELSKI, T.; LASSA, H.; AHRHOLDT, J.; MALINOWSKI, E.; ROESLER, U. Genotyping of bovine *Prototheca* mastitis isolates from Poland. *Veterinary Microbiology*, v. 149, p. 283-287, 2011.

JÁNOSI, S.; RÁTZ, F.; SZIGETI, G.; KULCSÁR, M.; KERÉNYI, J.; LAUKÓ, T.; KATONA, F.; HUSZENICZA, G. *Prototheca zopfii* mastitis in dairy herds under continental climatic conditions. *Veterinary Quarterly*, v. 23, p. 80-83, 2001.

KIRK, J. H. Diagnosis and treatment of difficult mastitis cases. *Agri-Practice*, v. 12, p. 15-18, 1991.

KRÜGER, W. Beiträge zur Kenntniss der Organismen des Saftflusses (sog. Schleimflusses) der Laubbäume. Parts I and II. *Zopf's Beitr. Physiologie zat Morphologia Niedaren der Organismen*, v. 4, p. 69-116, 1894.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. *Guia para identificação: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico*. São Paulo: Sarvier, 1998.

LANGONI, H.; DOMINGUES, P. F.; FUNARI, S. R. C.; DIAS, H. L. T.; MOTA, R. A.; SFORCIN, A. Mastite bovina por *Prototheca* sp. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, 4., 1992, Araçatuba. *Anais ... Araçatuba*, 1992a.

LANGONI, H.; DOMINGUES, P. F.; FUNARI, S. R. C.; DIAS, H. L. T.; MOTA, R. A.; ROCHA, N.S.; SFORCIN, A. *Prototheca zopfii* e mastite bovina: clínica e

terapêutica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 22., 1992, Curitiba. *Anais ... 1992b*.

LANGONI, H.; DOMINGUES, P. F.; FUNARI, S. R. C.; DIAS, H. L. T. *Prototheca zopfii* como agente de mastite bovina: clínica e terapêutica. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 47, n. 5, p. 727-732, 1995.

LANGONI, H.; TRONCARELLI, M. Z.; WANDERLEY, G. G.; SALINA, A. Prototecose mamária: um problema nos rebanhos leiteiros. *Veterinária e Zootecnia*, v. 20, p. 552-566, 2013.

LASSA, H. T.; JAGIELSKI, T. E.; MALINOWSK, E. Effect of different heat treatments and disinfectants on the survival of *Prototheca zopfii*. *Mycopathologia*, v. 171, p. 177-182, 2011.

LASS-FLÖRL, C.; MAYR, A. Human protothecosis. *Clinical Microbiology*, v. 20, p. 230-242, 2007.

LERCHE, M. Eine durch algen (*Prototheca*) hervorgerufene mastitis der kuh. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, v. 65, p. 64-69, 1952.

MACHAT, B. H. Polyhexamethylene biguanide hydrochloride: features and applications. *British Journal of Environmental Sciences*, v. 4, p. 49-55, 2016.

MACEDO, J. T. S. A.; RIET-CORREA, F.; DANTAS, A. F. M.; SIMÕES, S. V. D. Cutaneous and nasal Protothecosis in a goat. *Veterinary Pathology*, v. 45, p. 352-354, 2008.

MARQUES, S.; SILVA, E.; CARVALHEIRA, J.; THOMPSON, G. In Vitro antimicrobial Susceptibility of *Prototheca wickerhamii* and *Prototheca zopfii* isolated from bovine Mastitis. *Journal of Dairy Science*, v. 89, p. 4202-4204, 2006.

MARQUES, S.; SILVA, E.; CARVALHEIRA, J.; THOMPSON, G. Phenotypic characterization of mastitic *Prototheca* spp. isolates. *Research in Veterinary Science*, v. 89, p. 5-9, 2010.

MASUDA, M.; HIROSE, N.; ISHIKAWA, T.; IKAWA, Y.; KAZUKO, N. *Prototheca miyajii* sp. nov., isolated from a patient with systemic protothecosis *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 66, p. 1510-1520, 2016.

MAYORGA, J.; BARBA-GÓMEZ, J. F.; VERDUZCO-MARTÍNEZ, A. P.; MUÑOZ-ESTRADA, V. F.; WELSH, O. Protothecosis. *Clinics in Dermatology*, v. 30, p. 432- 436, 2012.

McDONNELL, G.; RUSSEL, A. D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical and Microbiology Review*, v. 12, p. 147-179, 1999.

MELVILLE, P. A.; BENITES, N. R.; SINHORINI, I. L.; COSTA, E. O. Susceptibility and features of the ultrastructure of *Prototheca zopfii* following exposure to



copper sulphate, silver nitrate and chlorexidine. *Mycopathologia*, v. 156, p. 1-7, 2002.

MIN, Z.; MOSER, S. A.; PAPPAS, P. G. *Prototheca wickerhamii* algemia presenting as cholestatic hepatitis in a patient with systemic lupus erythematosus: A case report and literature review. *Medical Mycology Case Reports*, v. 2, p. 19-22, 2013.

MÖLLER, A.; TRUYEN, U.; ROESLER, U. *Prototheca zopfii* genotype 2. The causative agent of bovine protothecal mastitis. *Veterinary Microbiology*, v. 39, p. 1-7, 2007.

MORANDI, S.; CREMONESI, P.; CAPRA, E.; SILVETTI, T.; BIACHINI, V.; ROMAGNA, D.; ALVES, A. C.; VARGAS, A. P. C.; COSTA, G. M.; RIBEIRO, M. G.; BRASCA, M. Molecular typing and differences in biofilm formation and antibiotic susceptibilities among *Prototheca* strains isolated in Italy and Brazil. *Journal of Dairy Science*, v. 99, 2016. No prelo.

OSUMI, T.; KISHIMOTO, Y.; KANO, R.; MARUYAMA, H.; ONOZAKI, M.; MAKIMURA, K.; ITO, T.; MATSUBARA, K.; HASEGAWA, A. *Prototheca zopfii* genotypes isolated from cow barns and bovine mastitis in Japan. *Veterinary Microbiology*, v. 131, p. 419-423, 2008.

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. Como a mastite se desenvolve. In: \_\_\_\_\_. *Vencendo a luta contra a mastite*. São Paulo: Milkbizz, 2002. cap. 4, p.14-17.

PIEPER, L.; GODKIN, A.; ROESLER, U.; POLLEINCHTNER, A.; SLAVIC, D.; LESLIE, K.E.; KELTON, D.F. Herd characteristics and cow-level factors associated with *Prototheca* mastitis on dairy farms in Ontario, Canada. *Journal of Dairy Science*, v. 95, p. 5635-5644, 2012.

PORE, R. S.; BARNETT, E. A.; BARNES JR., W. C.; WALKER, J. D. *Prototheca* ecology. *Mycopathologia*, v. 81, p. 49-62, 1983.

PORE, R. S. *Prototheca* taxonomy. *Mycopathologia*, v. 90, p. 129-139, 1985.

PORE, R. S.; SHANAN, T. A.; PORE, M. D.; BLAUWIEKEL, R. Occurrence of *Prototheca zopfii*, a mastitis pathogen, in milk. *Veterinary Microbiology*, v. 15, p. 315-323, 1987.

PORE, R. S.; SHAHAN, T. A. *Prototheca zopfii*: natural, transient, occurrence in pigs and rats. *Mycopathologia*, v. 101, p. 85-88, 1988.

PORE, R. S. *Prototheca*, a yeastlike alga. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. The yeasts: a taxonomic study. New York: Elsevier, 1998. p. 883-887.

PORE, R.S. Protothecosis. In: \_\_\_\_\_. *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Medical Mycology*. 10. ed. London: Hodder Arnold, 2005, p. 396-411.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; LEONARD, F. C.; FITZPATRICK, E. S.; FANNING, S.; HARTIGAN, P. J. *Veterinary microbiology and microbial disease*. 2. ed. Oxford: Blackwell Science, 2011. 1231 p.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; HINCHCLIFF, K. W.; CONSTABLE, P. D. *Veterinary medicine: a textbook of the disease of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. 10. ed. Philadelphia: Saunders, 2007. p. 673-762.

RIBEIRO, M. G.; LANGONI, H.; SILVEIRA, A. M.; RUFINO, S. M. Mastite bovina por *Prototheca zopfii*. Relato de caso e revisão de literatura. *O Biológico*, v. 60, p. 1-7, 1998.

RIBEIRO, M. G. Princípios terapêuticos na mastite em animais de produção e de companhia. In: ANDRADE, S. F. *Manual de terapêutica veterinária*. 3. ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 759-771.

RIBEIRO, M. G.; RODRIGUES DE FARIAS, M.; ROESLER, U.; ROTH, K.; RODIGHIERI, S. M.; OSTROWSKY, M. A.; SALERNO, T.; SIQUEIRA, A. K.; FERNANDES, M. C. Phenotypic and genotypic characterization of *Prototheca zopfii* in a dog with enteric signs. *Research in Veterinary Science*, v. 87, p. 479-481, 2009.

RIBEIRO, M. G.; MELVILLE, P. A.; COSTA, E. O. Prototecose. In: \_\_\_\_\_. *Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia*. Rio de Janeiro: Roca, 2016a. cap. 90, p. 958-969.

RIBEIRO, M. G.; LANGONI, H.; DOMINGUES, P. F.; PANTOJA, J. C. F. Mastite em animais de produção. In: \_\_\_\_\_. *Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia*. Rio de Janeiro: Roca, 2016b. cap. 112, p. 1154-1205.

RICCHI, M.; GORETTI, M.; BRANDA, E.; CAMMI, G.; GARBARINO, C. A.; TURCHETTI, B.; MORONI, P.; ARRIGONI, N.; BUZZINI, P. Molecular characterization of *Prototheca* strains isolated from Italian dairy herds. *Journal Dairy Science*, v. 93, p. 4625-4631, 2010.

RICCHI, M.; CICCIO, C.; BUZZINI, P.; CAMMI, G.; ARRIGONI, N.; CAMMI, M.; GARBARINO, C. First outbreak of bovine mastitis caused by *Prototheca blaschkeae*. *Veterinary Microbiology*, v. 162, p. 997-999, 2013.

ROESLER, U.; SCHOLZ, H.; HENSEL, A. Emended phenotypic characterization of *Prototheca zopfii*: a proposal for three biotypes and standards for their identification. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 53, p. 1995-1999, 2003.

ROESLER, U.; MOLLER, A.; HENSEL, A.; BAUMANN, D.; TRUYEN, U. Diversity within the current algal species *Prototheca zopfii*: a proposal for two *Prototheca zopfii* genotypes and description of a novel species, *Prototheca blaschkeae* sp. nov. *International Journal System Evolution Microbiology*, v. 56, p. 1-7, 2006.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: KRAWETZ, S.; MISENER, S. (Ed.). *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*. Totowa: Whitehead Institute for Biomedical Research, Humana Press, 2000. p. 365-386.

SALERNO, T.; RIBEIRO, M. G.; LANGONI, H.; SIQUEIRA, A. K.; COSTA, E. O.; MELVILLE, P. A.; BUENO, V. F.; YAMAMURA, A. A.; ROESLER, U.; DA SILVA, A. V. *In vitro* algacide effect of sodium hypochlorite and iodine based antiseptics on *Prototheca zopfii* strains isolated from bovine milk. *Research Veterinary Science*, v. 88, p. 211-213, 2010.

SATOH, K.; KENJI, O.; NAGAYAMA, H. *Prototheca cutis* sp. nov., a newly discovered pathogen of protothecosis isolated from inflamed human skin. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 60, p. 1236-1240, 2010.

SAWINSKI, P. K.; MEVEN, M.; ENGLERT, U.; DRONSKOWSKI, R. Single-crystal neutron direction study on guanidine, CN<sub>3</sub>H<sub>5</sub>. *American Chemical Society*, v. 3, p. 1730-1735, 2013.

SCACCABAROZZI, L.; TURCHETTI, B.; BUZZINI, P.; PISONI, G.; BERTOCCHI, L.; ARRIGONI, N.; BOETTCHER, P.; BRONZO, V.; MORONI, P. Isolation of *Prototheca* species strains from environmental sources in dairy herds. *Journal of Dairy Science*, v. 91, p. 3474-3477, 2008.

SCHALM, O. W.; CARROL, E.; JAIN, N. C. *Bovine mastitis*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1971. 360 p.

SELLERA, F. P.; SABINO, C. D.; RIBEIRO, M. S.; GARGANO, R. G.; BENITES, N. R.; MELVILLE, P. A.; POGLIANI, F. C. *In vitro* photoinactivation of bovine mastitis related pathogens. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 13, p. 276-281, 2016.

SIQUEIRA, A. K.; RIBEIRO, M. G.; SALERNO, T. Prototecose em animais de companhia e aspectos da doença no homem. *Ciência Rural*, v. 38, p. 1794-1804, 2008.

SOBUKAWA, H.; WATANABE, M.; KANO, R.; ITO, T.; OZONAKI, M.; HASEGAMA, A.; KAMATA, H. *In vitro* algacide effect of disinfectants on *Prototheca zopfii* genótipos 1 e 2. *The Journal of Veterinary Medical Science*, v. 73, p. 1527-1529, 2011.

UENO, R.; URANO, N.; SUZUKI, M. Phylogeny of the non-photosynthetic green micro-algal genus *Prototheca* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) and related taxa inferred from SSU and LSU ribosomal DNA partial sequence data. *Microbiology Letters*, v. 223, p. 275-280, 2003.

YAMAMURA, A. A. M.; MÜLLER, E. E.; FREIRE, R. L.; FREITAS, J. C.; GIORDANO, L. G. P.; TOLEDO, R. S.; RIBEIRO, M. G. Fatores de risco

associados à mastite bovina causada por *Prototheca zopfii*. *Ciência Rural*, v. 38, p. 755-760, 2008.

YAMADA, T.; XIAOHUI, L.; ENGLERT, U.; YAMANE, H.; DRONSKOWSKI, R. Solid-state structure of free base guanidine achieved at last. *Chemistry - A European Journal*, v. 15, p. 5651-5655, 2009.

ZAK, I.; JAGIELSKI, T.; KWIATKOWSKI, S.; BIELECKI, J. *Prototheca wickerhamii* as a cause of neuroinfection in a child with congenital hydrocephalus. First case of human protothecosis in Poland. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 74, p. 186-189, 2012.

ZHOU, Z.; ZHENG, A.; ZHONG, J. Interactions of biocidal guanidine hydrochloride polymer analogs with model membranes: a comparative biophysical study. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, v. 43, p. 729-737, 2013.

# **TRABALHO CIENTÍFICO**

1 Trabalho a ser enviado para a revista Research in Veterinary Science

2 *In vitro* algacide effect of guanidine on *Prototheca zopfii* genotype 2 strains isolated  
3 from clinical and subclinical bovine mastitis

4

5 Ana Carolina Alves<sup>a</sup>, Emanuele Capra<sup>b</sup>, Stefano Morandi<sup>c</sup>, Paola Cremonesi<sup>b</sup>, José  
6 Carlos de Figueiredo Pantoja<sup>a</sup>, Helio Langoni<sup>a</sup>, Agueda Palmira Castagna de Vargas<sup>d</sup>,  
7 Mateus Matiuzzi da Costa<sup>e</sup>, Tomaz Jagielski<sup>f</sup>, Carmen Alicia Daza Bolaños<sup>a</sup>, Simony  
8 Trevizan Guerra<sup>a</sup>, Márcio Garcia Ribeiro<sup>a 1</sup>

9

10

11 <sup>a</sup>Department of Veterinary Hygiene and Public Health, UNESP-Univ. Estadual Paulista,  
12 Botucatu, SP, Brazil

13 <sup>b</sup>Institute of Agricultural Biology and Biotechnology, National Research Council, Lodi,  
14 Italy

15 <sup>c</sup>Institute of Sciences of Food Production, National Research Council, Milan, Italy

16 <sup>d</sup>Department of Preventive Veterinary Medicine, Federal University of Santa Maria, RS,  
17 Brazil

18 <sup>e</sup>Federal University of São Francisco Valley, PE, Brazil

19 <sup>f</sup>Department of Applied Microbiology, Institute of Microbiology, Faculty of Biology,  
20 University of Warsaw, Poland

---

<sup>1</sup> Corresponding author: Márcio Garcia Ribeiro. Infectious Diseases of Domestic Animals, Department of Veterinary Hygiene and Public Health, School of Veterinary Medicine and Animal Sciences (FMVZ), UNESP-Univ. Estadual Paulista. PO Box 560, Code:18618-681, Botucatu, state of Sao Paulo, Brazil. Phone: +55 14 3880 2102. E-mail address: mgribeiro@fmvz.unesp.br

## 21 Abstract

22 *Prototheca* species have increasingly been reported as the most common opportunistic  
23 pathogens causing mastitis worldwide. The protothecal mastitis poses a major health and  
24 economic problem in dairy herds. To date, there is any effective therapy against  
25 protothecal mastitis. The aim of the present study was to investigate *in vitro* algacide  
26 effect of guanidine on 75 *Prototheca zopfii* genotype 2 strains isolated from 75 cases of  
27 clinical and subclinical bovine mastitis cases. *In vitro* effect of guanidine revealed that all  
28 strains were susceptible to the compound with minimal algacide concentration ranging  
29 from 0.001% to 0.035%. Guanidine has high microbicidal effect and is considered a new-  
30 generation microbicidal compound. It is non-toxic to human mucous membranes and  
31 conjunctivas at low concentrations; it has been used as a disinfectant of surfaces and in  
32 swimming pools, as well as antiseptic on human wounds. The algacide action of  
33 guanidine at low concentrations indicates that it could be an alternative disinfectant or  
34 antiseptic to clean the environment and milking dairy equipment, in pre- and post-dipping  
35 solutions, in the chemical dry therapy of bovine teats, and even in intramammary therapy  
36 of *P. zopfii* infections. This is the first report of the *in vitro* algacide effect of guanidine  
37 on *P. zopfii* strains from animal origin.

38

39 **Keywords:** bovine protothecosis, genotype, molecular epidemiology, algacides,  
40 disinfectants, antiseptics

41

## 42 2. Introduction

43 The genus *Prototheca* consists of unicellular eukaryotic achlorophyllous algae,  
44 ubiquitous in nature. At present, seven *Prototheca* species are well-recognized: *P.*  
45 *stagnora*, *P. ulmea*, *P. cutis*, *P. miyajii*, *P. wickerhamii*, *P. blaschkeae*, and *P. zopfii*

46 (Roesler et al., 2006; Satoh et al., 2010; Marques et al., 2015; Masuda et al., 2016).  
47 Among them, the latter three are closely related with bovine mastitis (Ahrholdt et al.,  
48 2012), whereas *P. wickerhamii*, *P. miyajii*, and *P. cutis* have been associated with human  
49 infections (Lass-Flörl and Mayr, 2007; Masuda et al., 2016). *P. zopfii* are classified into  
50 genotypes 1 and 2, with genotype 1 predominantly found in bovine and swine feces, and  
51 genotype 2 isolated from mastitis cases (Roesler et al., 2006).

52 The prevalence of bovine mammary protothecosis has been on the rise worldwide,  
53 and has incurred important losses to the dairy industry (Ahrholdt et al., 2012). *Prototheca*  
54 infections cause substantial damage to the glandular mammary parenchyma, leading to  
55 drastic fall in milk yield, which in turn necessitates culling of affected cows (Möller et  
56 al., 2007). Bovine mastitis is the most common form of protothecosis in domestic animals  
57 (Cremonesi et al., 2012). Bovine mammary infections caused by *Prototheca* species  
58 usually result in clinical manifestations, although occasionally, they manifest as  
59 subclinical disease.

60 To date, there is no effective treatment against protothecal mammary infections.  
61 The resistance of the algae to conventional drugs is attributed to the establishment of  
62 pyogranulomatous inflammation (Melville et al., 2002), pathogen evasion from  
63 phagocytic cells (Marques et al., 2006) and, more recently, to the ability to biofilm  
64 formation (Morandi et al., 2016). Consequently, this scenario has led to a number of  
65 studies assessing the *in vitro* effect of a wide range of antibiotic, antimycotic, antiseptic,  
66 and disinfectant agents against *Prototheca* species isolated from bovine mastitis (Salerno  
67 et al., 2010; Wawron et al., 2013; Morandi et al., 2016). Guanidine is a compound that  
68 shows microbicidal action at low concentrations (Machat, 2016), and comes out as a new-  
69 generation disinfectants to be applied on surface materials as well as an antiseptic on  
70 human wounds. In addition, it shows no toxic or irritant effects in human mucous



71 membranes and conjunctivas, and it is has been used as a disinfectant in swimming pools  
72 (Yamada et al., 2009). In this study, we investigated the *in vitro* algacide effect of  
73 guanidine on 75 *P. zopfii* genotype 2 strains isolated from bovine mastitis.

74

## 75 2. Material and methods

### 76 2.1 Animals and microbiological culture

77 This study was carried out in accordance with guidelines for ethical use of animals  
78 approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA-FMVZ-UNESP/Botucatu,  
79 state of São Paulo), Brazil, protocol 181/2013.

80 A total of 75 *P. zopfii* isolated from 75 mastitic cows from 15 dairy farms located  
81 in Brazilian states of São Paulo (55 isolates), Pernambuco (13 isolates), Minas Gerais (5  
82 isolates), Rio Grande do Sul (1 isolate) and Paraná (1 isolate) were used. A convenience  
83 sample of cases was used in the current study.

84 Among the isolates, 60 (80.0%) were from clinical mastitis, 14 (18.7%) were from  
85 subclinical infections, and 1 (1.7%) was of unknown origin regarding mammary infection  
86 status. All the animals were subjected to the strip cup test and the California Mastitis Test  
87 (CMT, scores 1+ to 3+) for the diagnosis of clinical and subclinical mastitis, respectively  
88 (Radostits et al., 2007).

89 Bacteriological culture was carried out according to standard procedures of the  
90 National Mastitis Council-NMC (NMC, 1999). Briefly, about 10  $\mu$ L of each milk sample  
91 were was subjected to microbiological culture on blood agar (5%) and MacConkey agar  
92 (Oxoid™). Plates were incubated at 37°C under aerobic conditions and evaluated every  
93 24, 48, and 72 h. Mammary infection was defined as the presence of at least ten colonies  
94 of the same type the organism of interest (Andersen et al., 2010). Milk samples that

95 yielded more than three different colonies types were considered to be contaminated and  
96 were discarded (NMC, 1999).

97

## 98 *2.2 Phenotypic speciation*

99 Colonies compatible with the genus *Prototheca* were submitted to Gram and Diff-  
100 Quik staining, as well as subjected to carbohydrate assimilation testing using trehalose,  
101 glucose, saccharose and n-propanol (Pore, 1985).

102

## 103 *2.3 Molecular characterization of the Prototheca species*

104 *Prototheca* spp. isolates had been previously characterized by multiplex  
105 polymerase chain reaction (PCR) (Morandi et al., 2016).

106

## 107 *2.4 In vitro algaecide effect of guanidine*

108 Algaecide action of guanidine was assessed based on the minimal microbicidal  
109 concentration - (MMC) method (M27-A2), as described by Salerno et al. (2010), using  
110 the tube dilution test (Pfaller, 2002), with some modifications. Minimal algaecide  
111 concentration (MAC) of isolates was defined as the lowest concentration of guanidine  
112 able to prevent post-exposure algae growth on blood agar at the microbiological  
113 conditions mentioned in section 2.1.

114

### 115 *2.4.1 Preparation of inoculum*

116 For the preparation of the inoculums, all isolates were cultured on blood agar  
117 (Oxoid™) incubated under aerobic conditions at 37°C for 48 to 72 h. After that, about  
118 two or three typical colonies of each strain were transferred to tubes containing 10 mL of

119 brain–heart infusion broth – BHI (Oxoid™), and incubated in the same microbiological  
120 conditions aforementioned. Turbidity was adjusted using tube 1 of McFarland scale.

121

#### 122 2.4.2 Reference strains of *Prototheca*

123 *P. zopfii* genotype 1 (RZI-3), *P. zopfii* genotype 2 (LZ-5), and *P. blaschkeae*  
124 (RZIII-3), were kindly provided by Dr. Tomaz Jagielski, from the Institute of  
125 Microbiology, University of Warsaw, Poland, to be used as reference strains in the *in*  
126 *vitro* algacide analysis of guanidine.

127

#### 128 2.4.3 Guanidine dilutions

129 Liquid guanidine at an initial concentration of 18.1% (Solo, Sandet Química Ltda,  
130 São Paulo, Brazil) was used to assess the MAC. Initially, one mL of guanidine solution  
131 (18.1%) was added to the first tube of 75 isolates. Next, 0.5 mL of sterilized Milli-Q water  
132 was placed in fourteen subsequent tubes. After that, 0.5 mL of guanidine was transferred  
133 from the first to the second tube, which was homogenized. Subsequently, the same  
134 process was repeated successively to the other tubes. Finally, in last tube (tube 15), 0.5  
135 mL was discarded. Following, 0.5 mL of *P. zopfii* inoculums were added to each 15 tubes  
136 to obtain the following concentrations of guanidine: 9.050%, 4.525%, 2.262%, 1.131%,  
137 0.565%, 0.282%, 0.141%, 0.070%, 0.035%, 0.017%, 0.008%, 0.004%, 0.002%, 0.001%,  
138 and 0.0005%. Tubes were incubated under aerobic conditions at 37°C for 12 h. After that,  
139 an amount of 10 µL from each tube was plated on blood agar (5.0%) and incubated  
140 aerobically at 37 °C for 7 days. Plates were analyzed every 24 h to assess the MAC value  
141 of guanidine. Positive control suspensions were prepared in sterilized tubes containing  
142 0.5 mL of sterile Milli-Q water and 0.5 mL of the inocula, adjusted to McFarland scale  
143 with optical density equivalent to tube 1, and finally cultured as described above. All *in*

144 *in vitro* tests, for all 75 isolates, were carried out in duplicate. When the same isolate  
145 presented a different guanidine algacide effect in the duplicate, the result was that from  
146 on the lowest dilution.

147

## 148 2.5 Statistical analysis

149 The Mann-Whitney test was used to compare the median MAC between clinical  
150 and subclinical mastitis cases. The analysis was performed with GraphPad Prism version  
151 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego) at a significance level of 0.05.

152

## 153 3. Results

### 154 3.1 Phenotypic characterization of *Prototheca* strains

155 Conventional phenotypic methods allowed a preliminary classification of the 75  
156 algae as *P. zopfii*.

157

### 158 3.2 Molecular methods

159 The genotypic characterization based on multiplex PCR confirmed all the isolates  
160 as *P. zopfii*, and identified them as genotype 2.

161

### 162 3.3 Algacide effect of guanidine

163 The *in vitro* algacide effect of guanidine revealed that all isolates showed MAC  
164 ranging from 0.001% to 0.035%. Figure 1 represents MAC of guanidine for the 75 *P.*  
165 *zopfii* isolates. Noteworthy, the MAC values of 50% of the isolates tested were within the  
166 range of 0.004 to 0.008%.

167 When submitted to guanidine, the reference strains of *P. zopfii* genotype 1 (RZI-  
168 3), *P. zopfii* genotype 2 (LZ-5), and *P. blaschkeae* (RZIII-3) showed MAC of 0.008%,

169 0.035%, and 0.002%, respectively. *P. zopfii* genotype 2 reference strain showed MAC  
170 with the limit of the highest dilution, whereas the other reference strains, *P. zopfii*  
171 genotype 1 and *P. blaschkeae*, presented MAC with results close of 50% of Brazilian  
172 isolates (Figure 1).

173         There was no statistical difference ( $p=0.27$ ) between clinical and subclinical cases  
174 and algacide effect of guanidine in our isolates (Figure 2).

#### 175 4. Discussion

176         Findings of the present study showed that all *P. zopfii* genotype 2 strains evaluated  
177 were susceptible *in vitro* to guanidine. The compound, thus, may be considered an  
178 alternative disinfectant or antiseptic for dairy equipment, in pre- and post-dipping  
179 solutions, or for intramammary infusions in infected cows.

180         *Prototheca* species are environmental pathogens of bovine mastitis with  
181 opportunistic behavior. Several reports have described substantial increase in the  
182 frequency of bovine protothecal mastitis worldwide (Jagielski et al., 2011; Ahrholdt et  
183 al., 2012; Morandi et al., 2016), including in Brazil (Melville et al., 2002; Salerno et al.,  
184 2010; Gonçalves et al., 2015). This fact poses a serious health threat to dairy herds,  
185 specially since the algae have a wide distribution in the farm environment, and resist most  
186 of the conventional intramammary therapies (Marques et al., 2006; Wawron et al., 2013).

187         More than two-thirds of the isolates were recovered from clinical mastitis. This is  
188 in agreement with other studies (Costa et al., 1996; Salerno et al., 2010; Marques et al.,  
189 2010; Jagielski et al., 2011; Ahrholdt et al., 2012), describing the predominance of clinical  
190 manifestations of bovine mastitis due to *P. zopfii*. Nevertheless, despite the major  
191 prevalence of clinical cases, protothecal mastitis may evolve slowly (Morandi et al.,  
192 2016), or determine subclinical infections (Costa et al., 1996, Gonçalves et al., 2015).  
193 Indeed, in cows sampled in this study, about 20% were diagnosed with subclinical

194 infections. This circumstantial evidence highlights the need to identify possible  
195 subclinical protothecal infections in endemic herds or in those with clinical cases.

196 In the last decades, comprehensive studies focusing on genotyping of *Prototheca*  
197 spp. have allowed to gain a better knowledge on the epidemiology of protothecosis among  
198 domestic animals, particularly in relation to the geographic distribution of this microalgae  
199 (Roesler et al., 2006; Ahrholdt et al., 2012; Morandi et al., 2016). In this study, only *P.*  
200 *zopfii* genotype 2 was detected. Similar investigations have also reported *P. zopfii*  
201 genotype 2 as the main pathogenic type involved in bovine mastitis around the world  
202 (Möller et al., 2007; Jagielski et al., 2011; Ahrholdt et al., 2012; Capra et al., 2014;  
203 Morandi et al., 2016).

204 *Prototheca* species are refractory to conventional mastitis therapy. The persistence  
205 of algae in bovine mammary infections and resistance to routine therapy is attributed to  
206 the development of pyogranulomatous inflammation (Melville et al., 2002), the pathogen's  
207 evasion of phagocytosis (Marques et al., 2006) and, more recently, its ability biofilm  
208 formation (Gonçalves et al., 2015; Morandi et al., 2016). This has resulted in different  
209 studies *in vitro* to be undertaken on testing susceptibility of *Prototheca* spp. against newly  
210 designed drugs, or commercially available antimicrobial, antimycotic, disinfectant, and  
211 antiseptic agents (Melville et al., 2002; Salerno et al., 2010; Sobukawa et al., 2011;  
212 Morandi et al., 2016). The present study fits into this research stream by evaluating the *in*  
213 *vitro* effect of guanidine on 75 strains of *P. zopfii* genotype 2 isolated from clinical and  
214 subclinical bovine mastitis. Guanidine is a compound with high microbicidal effect that  
215 promotes microorganism death by disrupting the cell membrane. It has no toxic effect on  
216 human mucous membranes and conjunctivas at low concentrations. Currently, it has been  
217 used as a disinfectant in swimming pools, for wide surface materials, and as an antiseptic  
218 on human wounds. It is considered a promising new-generation antiseptic or disinfectant

219 due to combined algaecide, fungicide, and bactericide action (Yamada et al., 2009;  
220 Sawinski et al., 2013; Machat, 2016). Among the *P. zopfii* isolates studied, *in vitro* effect  
221 of guanidine was observed at concentrations ranging from 0.001% to 0.035%. The  
222 algaecide effect against *Prototheca* has been reported for other disinfectant and/  
223 antiseptics, such as quaternary ammonium salts, dodecylbenzene acid (Lassa et al., 2011),  
224 iodine, hypochlorite (Salerno et al., 2010), and peracetic acid (Gonçalves et al., 2015).  
225 Guanidine revealed its algaecide effect in 50% of the isolates at concentrations below  
226 those of other antiseptics or disinfectants (0.004 a 0.008%) used in dairy farms (Salerno  
227 et al., 2010; Sobukawa et al., 2011); indicating that this compound may be an alternative  
228 microbicide in milking routine or cleaning of equipment, as well as in pre- and post-  
229 dipping solutions. However, presence of organic matter, moisture, pH, temperature, time  
230 of exposure, and other factors may influence effectiveness of disinfectants and  
231 antiseptics.

232

## 233 5. Conclusion

234 Overall, our findings indicate that guanidine may be an alternative antiseptic in dipping  
235 solutions for cattle affected by protothecal mastitis. *In vitro* susceptibility of *P. zopfii*  
236 strains to guanidine suggest that this algaecide product may be indicated from milking or  
237 sanitizing routine to cleaning equipment of farms in which bovine protothecosis is  
238 endemic. In addition, the algaecide effect of guanidine at low concentrations is  
239 circumstantial evidence that this compound may be used in chemical dry therapy or *in*  
240 *vivo* studies involving treatment of teats infected by this microalgae, because it is known  
241 to have low irritant potential and non-toxic effect to human mucous membranes and  
242 conjunctivas. To our knowledge, this is the first report of *in vitro* algaecide effect of  
243 guanidine among *P. zopfii* strains from animal origin.

## 244 References

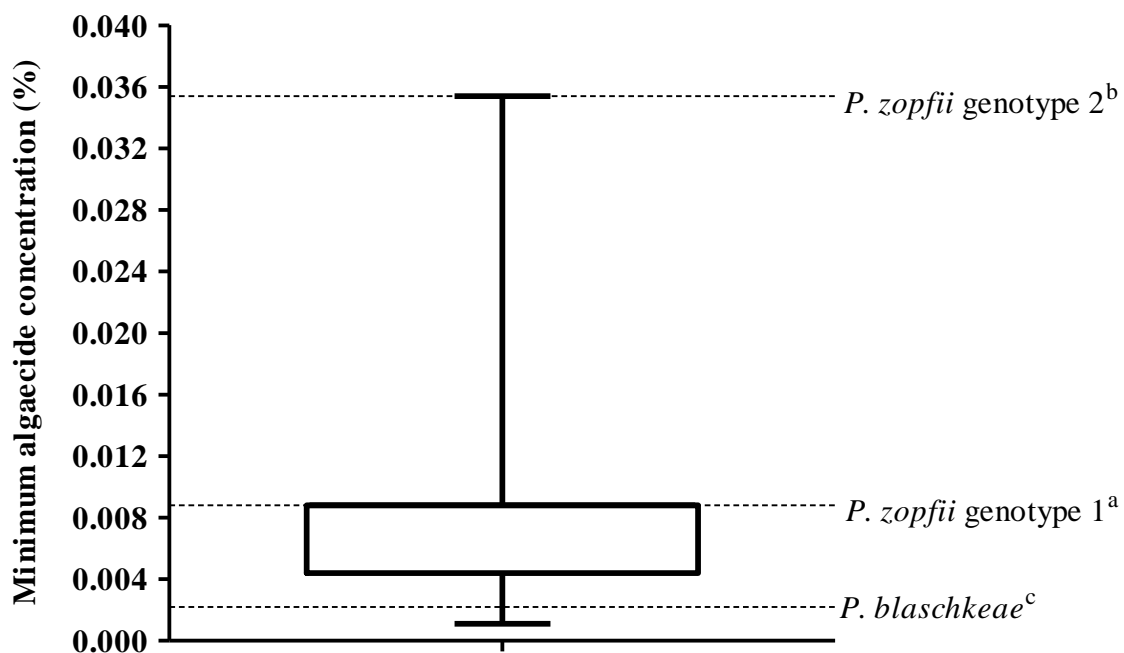
- 245 Ahrholdt, J., Murugaiyan, J., Straubinger, R.K., Jagielski, T. and Roesler, U., 2012.  
246 Epidemiological analysis of worldwide bovine, canine and human clinical *Prototheca*  
247 isolates by PCR genotyping and MALDI-TOF mass spectrometry proteomic  
248 phenotyping. Med. Mycopat. 50, 234-243.
- 249 Andersen, S., Dohoo, I.R., Olde Riekerenk, R., Stryhn, H. and Mastitis Research  
250 Workers' Conference. Diagnosing intramammary infections: evaluating experts opinions  
251 on the definition of intramammary infection using conjoint analysis. J. Dairy Sci. 93,  
252 2966-2975.
- 253 Capra, E., Cremonesi, P., Cortimiglia, C., Bignoli, G., Ricchi, M., P. Moroni, P., A.  
254 Pesce, A., M. Luini, M. and Castiglioni, B. 2014. Simultaneous identification by  
255 multiplex PCR of major *Prototheca* spp. isolated from bovine and buffalo intramammary  
256 infection and bulk tank. Lett. Appl. Microbiol. 59, 642-64.
- 257 Costa, E.O., Carciofi, A.C., Melville, P.A. and Schalch, U. 1996. *Prototheca* sp  
258 outbreak of bovine mastitis. J. Vet. Med. 43, 321-324.
- 259 Cremonesi, P., Pozzi, F., Ricchi, M., Castiglioni, B., M. Luini, M. and Chessa, S.  
260 2012. Identification of *Prototheca* species from bovine milk samples by PCR-single  
261 strand conformation polymorphism. J. Dairy Sci. 95, 6963-6968.
- 262 Gonçalves, J.L., Lee, S.H.I., Arruda, E.P., Galles, D.P., Caetano, V.C., Oliveira,  
263 C.A.F., Fernandes, A.M., Santos, M.V. 2015. Biofilm-producing ability and efficiency of  
264 sanitizing agents against *Prototheca zopfii* isolates from bovine subclinical mastitis. J.  
265 Dairy Sci. 98, 3613-3621.
- 266 Jagielski, T., Lassa, H., Ahrholdt, J., Malinowski, E. and Roesler, U. 2011.  
267 Genotyping of bovine *Prototheca* mastitis isolates from Poland. Vet. Microbiol. 149, 283-  
268 28.



- 269 Lassa, H.T., Jagielski, T.E. and Malinowsk, E. 2011. Effect of different heat  
270 treatments and disinfectants on the survival of *Prototheca zopfii*. *Mycopathologia*. 171,  
271 177-182.
- 272 Lass-Flörl, C. and Mayr, A. 2007. Human protothecosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 20,  
273 230-242.
- 274 Machat, B.H. 2016. Polyhexamethylene biguanide hydrochloride: features and  
275 applications. *B. J. Env. Sci.* 4, 49-55.
- 276 Marques, S., Silva, E., Carvalheira, J., Thompson, G. 2006. In vitro antimicrobial  
277 susceptibility of *Prototheca wickerhamii* and *Prototheca zopfii*. *J. Dairy Sci.* 89, 4202-  
278 4204.
- 279 Marques, S., Huss, V.A.R. Pfisterer, K., Grosse, C. and Thompson, G. 2015.  
280 Internal transcribed spacer sequence-based rapid molecular identification of *Prototheca*  
281 *zopfii* and *Prototheca blaschkeae* directly from milk of infected cows. *J. Dairy Sci.* 98,  
282 3001-3009.
- 283 Masuda, M., Hirose, N., Ishikawa, T., Ikawa, Y. and Kazuko, N. 2016.  
284 *Prototheca miyajii* sp. nov., isolated from a patient with systemic protothecosis *Int. J.*  
285 *Syst. Evol. Microbiol.* 66, 1510-1520.
- 286 Melville, P.A., Benites, N.R., Sinhorini, I.L. and Costa, E.O. 2002. Susceptibility  
287 and features of the ultrastructure of *Prototheca zopfii* following exposure to copper  
288 sulphate, silver nitrate and chlorexidine. *Mycopathologia*. 156, 1-7.
- 289 Möller, A., Truyen, U. and Roesler, U. 2007. *Prototheca zopfii* genotype 2. The  
290 causative agent of bovine protothecal mastitis. *Vet. Microbiol.* 39, 1-7.
- 291 Morandi, S., Cremonesi, P., Capra, E., Silvetti, T., Biachini, V., Romagna, D.,  
292 Alves, A.C., Vargas, A.P.C., Costa, G.M., Ribeiro, M.G. and Brasca, M. 2016. Molecular

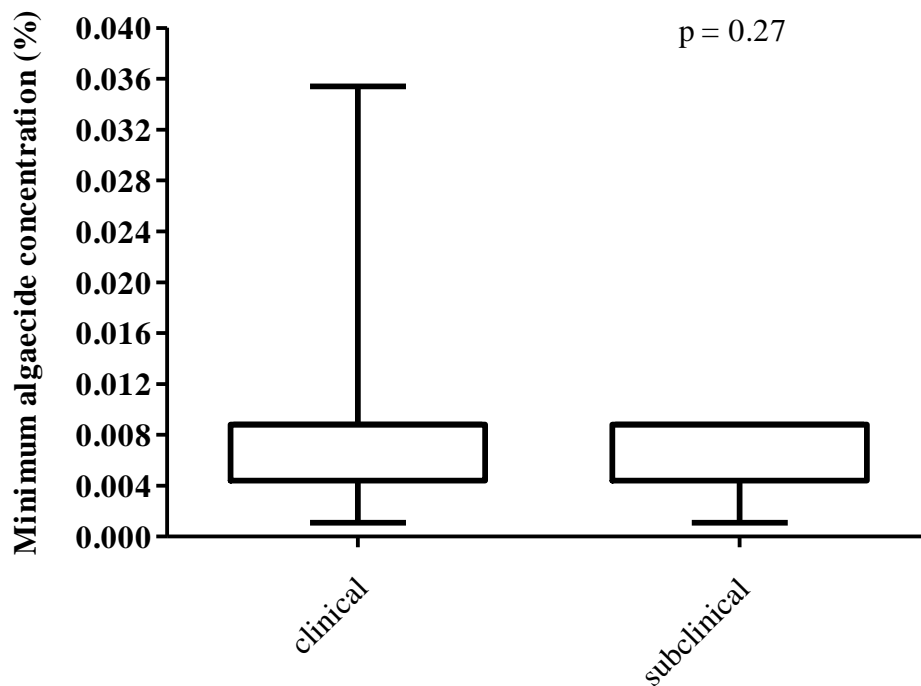
- 293 typing and differences in biofilm formation and antibiotic susceptibilities among  
294 *Prototheca* strains isolated in Italy and Brazil. J. Dairy Sci. 99, 6436-6445.
- 295 NMC (National Mastitis Council). Laboratory handbook on bovine mastitis.  
296 Arlington, 1999, p 222.
- 297 Pfaller, M.A., 2002. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility  
298 Testing of Yeasts; Approved Standard, M27-A2, second ed. Clinical and Laboratory  
299 Standards Institute (CLSI/NCCLS), 30 pp.
- 300 Pore, R.S. 1985. *Prototheca* taxonomy. Mycopathologia. 90, 129-139.
- 301 Radostits, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W., 2007. Veterinary Medicine: a  
302 Textbook of the Disease of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats, 10th ed. Saunders,  
303 Philadelphia. pp. 673–762.
- 304 Roesler, U., Möller, A., Hensel A., Baumann D. and Truyen U. 2006. Diversity  
305 within the current algal species *Prototheca zopfii*: a proposal for two *Prototheca zopfii*  
306 genotypes and description of a novel species, *Prototheca blaschkeae* sp. nov. Int J. Syst.  
307 Evol. Microbiol. 56, 1419-1425.
- 308 Salerno, T., Ribeiro, M.G., Langoni, H., Siqueira A.K., Costa E.O., Melville P.A.,  
309 Bueno V.F., Yamamura, A.A., Roesler U. and da Silva A.V. 2010. *In vitro* algaecide  
310 effect of sodium hypochlorite and iodine based antiseptics on *Prototheca zopfii* strains  
311 isolated from bovine milk. Res. Vet. Sci. 88, .211-213, 2010.
- 312 Sawinski, P.K., Meven, M., Englert, U. and Dronskowski, R. 2013. Single-Crystal  
313 Neutron Diffraction Study on Guanidine, CN<sub>3</sub>H<sub>5</sub>. Am. Chemical Soc. 3, 1730-1735.
- 314 Sobukawa, H., Watanabe, M., Kano, R., Ito, T., Ozonaki, M., Hasegama, A and  
315 Kamata, H. 2011. *In vitro* algaecide effect of disinfectants on *Prototheca zopfii* genótipos  
316 1 e 2. J. Vet. Med. Sci. 73, 1527-1529.

- 317 Wawron, W., Bochniarz, M., Piech, T., Wysocki, J. and Kocik, M.  
318 2013. Antimicrobial susceptibility of *Prototheca zopfii* isolated from bovine mastitis.  
319 Bull. Vet. Inst. Pulawy. 57, 485-488.
- 320 Yamada, T., Xiaohui, L., Englert, U., Yamane, H., Dronskowski, R. 2009. Solid-  
321 State Structure of Free Base Guanidine Achieved at Last. Chemistry. 15, 5651-5655.



322

323 Figure 1 – *In vitro* minimum algaecide concentration of guanidine on 75 *Prototheca zopfii*  
 324 isolates from bovine mastitis and reference strains of *Prototheca* (<sup>a</sup>*P. zopfii* genotype 1 =  
 325 RZI-3; <sup>b</sup>*P. zopfii* genotype 2 = LZ-5; <sup>c</sup>*P. blaschkeae* =RZIII-3). Botucatu, SP, Brazil,  
 326 2016.



327

328 Figure 2 – *In vitro* minimum algacide concentration of guanidine on 74 *Prototheca zopfii*

329 isolates from bovine mastitis clinical and subclinical. Botucatu, SP, Brazil, 2016.

# **NORMAS DA REVISTA**

## **Research in Veterinary Science**

### **Guide for Authors**

*Research in Veterinary Science* publishes original contributions and review articles on research concerning the health and disease of animals, including studies in comparative medicine.

### **Types of contribution**

1. Original research papers (Regular Papers)
2. Short Communications
3. Review articles

### ***Original research papers***

Original research papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

### ***Short Communications***

Short Communications should not exceed 1600 words and include no more than two tables or figures. They should have an abstract but no other divisions. Typescripts should be clearly marked Short Communication.

### ***Review articles***

Review articles on veterinary topics are invited for publication. They should give an update on recent advances in a particular field and be targeted at research veterinarians who are not necessarily working in the same field. The length should not exceed 4000 words.

### **Submission checklist**

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

*Manuscript.*

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

*Graphical Abstracts / Highlights files* (where applicable)

*Supplemental files* (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- Relevant declarations of interest have been made
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

**Before you begin****Ethics in publishing**

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

Before papers describing animal studies are accepted for publication in Research in Veterinary Science, the authors must satisfy the editors that the work conformed to appropriate ethical standards. Whether or not a particular piece of work is accepted for publication will be decided by the editors whose decision will be final.



The authors should provide written assurances that: (i) The project underwent ethical review and was given approval by an institutional animal care and use committee or by appropriately qualified scientific and lay colleagues. (ii) The care and use of experimental animals complied with local animal welfare laws, guidelines and policies.

The editors expect authors to have adhered to the following general principles: (i) Alternative procedures that replace the use of animals should be used if possible. Where this is not possible, the animals used should be carefully selected to be the least sentient species possible and of an appropriate strain. (ii) The minimum number of animals should be used consistent with achieving the scientific objectives of the study. (iii) Pain and distress should be minimised by the use of humane endpoints, sedation, anaesthesia, analgesia and post-operative care. (iv) Access to veterinary care must be available at all times. (v) Investigators and personnel that care for and use animals must be trained and possess relevant expertise and training that should be updated regularly. (vi) If animals have to be killed, this should be done humanely according to local euthanasia regulations, such as the Home Office guidelines in the UK or guidelines of the American Veterinary Association Panel on Euthanasia.

### **Declaration of interest**

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. If there are no conflicts of interest then please state this: 'Conflicts of interest: none'. [More information](#).

### **Submission declaration**

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

### **Authorship**

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted

## Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

## *Article transfer service*

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. [More information.](#)

## Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

### ***Author rights***

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

### ***Elsevier supports responsible sharing***

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

### **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

### ***Funding body agreements and policies***

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of [existing agreements](#) are available online. After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for publication.

### **Open access**

This journal offers authors a choice in publishing their research:

#### ***Open access***

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

#### ***Subscription***

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

***Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)***

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 2500**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

***Green open access***

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form.

This journal has an embargo period of 12 months.

***Language (usage and editing services)***

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

***Submission***

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

**Authors are requested to suggest the names of up to 5 referees (with email addresses) whom they feel are qualified to evaluate their submission.** Submission of such names does not, however, imply that they will definitely be used as referees.

Authors should send queries concerning the submission process or journal procedures to [AuthorSupport@elsevier.com](mailto:AuthorSupport@elsevier.com). Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

### ***Submit your article***

Please submit your article via <http://www.evise.com/evise/jrnl/RVSC>.

## **Preparation**

### **Use of Word Processing Software**

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

### ***Form of papers***

#### ***Introduction***

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

#### ***Material and methods***

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

#### ***Results***

Results should be clear and concise.

#### ***Discussion***

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

#### ***Conclusions***

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions

section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

### **Appendices**

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

### **Essential title page information**

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### **Abstract**

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Abstract, self-contained and embodying the main conclusions. It should note the relevance to veterinary science as well as the aims and objectives of the work. Sentences such as 'the results are discussed', which merely describe the paper, are not allowed.

### **Graphical abstract**

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

### ***Highlights***

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view [example Highlights](#) on our information site.

### **Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### **Abbreviation and symbols**

Authors are asked to explain each scientific abbreviation at its first occurrence in their papers; for example, complement fixation test (CFT). The policy of the journal with respect to units and symbols is that SI (System International) symbols should be used.

### **Acknowledgements**

All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

### ***Formatting of funding sources***

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

### **Nomenclature**

1. Authors and Editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the International Code of Botanical Nomenclature, the International Code of Nomenclature of Bacteria, and the International Code of Zoological Nomenclature. Virologists should consult the latest Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses for proper nomenclature and spelling.
2. All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.
3. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.
4. For chemical nomenclature, the conventions of the International Union of Pure and Applied Chemistry and the official recommendations of the IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature should be followed.

### **Formulae**

1. Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used.
2. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.
3. Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.
4. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Powers of e are often more conveniently denoted by exp.
5. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca<sup>2+</sup>, not as Ca<sup>++</sup>.



6. Isotope numbers should precede the symbols, e.g.  $^{18}\text{O}$ .
7. The repeated writing of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as  $\text{P}_2\text{O}_5$ ).

### **Footnotes**

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

1. Footnotes should only be used if absolutely essential. In most cases it should be possible to incorporate the information in normal text.
2. If used, they should be numbered in the text, indicated by superscript numbers, and kept as short as possible.

### **Artwork**

#### ***Electronic artwork***

##### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

### *Formats*

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

### **Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;

- Supply files that are too low in resolution;

- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

1. All illustrations (line drawings and photographs) should be submitted as separate files, though they may also be embedded within the manuscript file for ease of reading during the review process.

2. Illustrations should be numbered according to their sequence in the text. References should be made in the text to each illustration.

3. Illustrations should be designed with the format of the page of the journal in mind. Illustrations should be of such a size as to allow a reduction of 50%.

4. Lettering should be big enough to allow a reduction of 50% without becoming illegible, any lettering should be in English. Use the same kind of lettering throughout and follow the style of the journal.

5. If a scale should be given, use bar scales on all illustrations instead of numerical scales that must be changed with reduction.
6. Explanations should be given in the figure legend(s). Drawn text in the illustrations should be kept to a minimum.
7. Photographs are only acceptable if they have good contrast and intensity.

### ***Color artwork***

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

### ***Illustration services***

[Elsevier's WebShop](#) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

### **Tables**

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table.
2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.
3. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.
4. Each table should occupy a separate page of the manuscript. Tables should never be included in the text.
5. Each table should have a brief and self-explanatory title.
6. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurement should be added between parentheses.

7. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.

8. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.

## Manuscript Formatting

Manuscripts should have **numbered lines**, with wide margins and **double spacing**, throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. **Every page of the manuscripts, including the title page, references, tables, etc., should be numbered.** However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

## References

### *Reference management software*

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/research-in-veterinary-science>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

*Text:* All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown ....'

*List:* References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

*Examples:*

Reference to a journal publication:

Foster, N., Berndt, A., Lalmanach, A.C., Methner, U., Pasquali, P., Rychlik, I., Velge, P., Zhou, X., Barrow, P., 2012. Emergency and therapeutic vaccination— is stimulating innate immunity an option? *Res. Vet. Sci.* 93, 7–12.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

## **Supplementary material**

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our [artwork instruction pages](#).

## **AudioSlides**

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. [More information and examples are](#)

available. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

## **After acceptance**

### **Online proof correction**

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

### **Offprints**

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on Science Direct. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Webshop. Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

### **Additional information**

Authors can also keep track of the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track your accepted article" option on the journal's homepage <http://www.elsevier.com/locate/rvsc>. For privacy, information on each article is password-protected. The author should key in the "Our Reference" code (which is in the letter of acknowledgement sent by the Publisher on receipt of the accepted article) and the name of the corresponding author.

**ANEXO**

## Anexo 1

<b>Nº</b>	<b>Identificação dos isolados</b>	<b>Propriedades</b>	<b>Estado</b>	<b>Mastite (clínica ou subclínica)</b>
1	288 AD	A	Pernambuco	subclínica
2	264/12-23	B	São Paulo	clínica
3	264/12-04	B	São Paulo	clínica
4	264/12-36	B	São Paulo	clínica
5	239/12-18	B	São Paulo	clínica
6	264/12-33	B	São Paulo	clínica
7	264/12-40	B	São Paulo	clínica
8	264/12-35	B	São Paulo	clínica
9	119/12	C	Paraná	clínica
10	91C	D	São Paulo	clínica
11	264/12-32	B	São Paulo	clínica
12	264/12-34	B	São Paulo	clínica
13	264/12-07	B	São Paulo	clínica
14	239/12-12	B	São Paulo	clínica
15	124-7	E	NI	NI
16	192 AE	A	Pernambuco	subclínica
17	72/13 (181AD)	F	Rio Grande do Sul	clínica
18	287 AD	G	Pernambuco	subclínica
19	267 PE	G	Pernambuco	clínica
20	304 PD	G	Pernambuco	clínica
21	166 AD	G	Pernambuco	clínica
22	172 PD	G	Pernambuco	clínica
23	P2	H	Minas Gerais	subclínica
24	P3	H	Minas Gerais	subclínica
25	P4	H	Minas Gerais	clínica
26	P5	H	Minas Gerais	subclínica
27	SP1	I	São Paulo	subclínica
28	SP2	I	São Paulo	subclínica
29	PJ1	J	São Paulo	clínica
30	239/12-06	K	São Paulo	clínica
31	239/12-17	K	São Paulo	clínica
32	239/12-19	K	São Paulo	clínica
33	239/12-28	K	São Paulo	clínica
34	239/12-4	K	São Paulo	clínica
35	264/12-5	B	São Paulo	clínica
36	264/12-22	B	São Paulo	clínica
37	308AD	G	Pernambuco	clínica
38	172AD	G	Pernambuco	clínica
39	289AD	G	Pernambuco	subclínica
40	287AD	G	Pernambuco	subclínica
41	172AE	G	Pernambuco	clínica
42	172AD2	G	Pernambuco	clínica
43	PJ2	H	São Paulo	clínica
44	PJ3	H	São Paulo	clínica
45	239/12-03	K	São Paulo	clínica
46	239/12-29	K	São Paulo	clínica
47	239/12-1	K	São Paulo	clínica



48	239/12-2	K	São Paulo	clínica
49	264/12 -7	B	São Paulo	clínica
50	PJ4	I	São Paulo	clínica
51	PJ5	I	São Paulo	clínica
52	PJ6	I	São Paulo	clínica
53	PJ7	I	São Paulo	clínica
54	PJ8	I	São Paulo	clínica
55	PJ9	I	São Paulo	clínica
56	PJ10	I	São Paulo	clínica
57	PJ11	I	São Paulo	clínica
58	PJ12	I	São Paulo	clínica
59	PJ13	I	São Paulo	clínica
60	PJ14	L	São Paulo	subclínica
61	PJ15	I	São Paulo	clínica
62	PJ16	I	São Paulo	clínica
63	PJ17	I	São Paulo	clínica
64	PJ18	I	São Paulo	clínica
65	PJ19	M	São Paulo	subclínica
66	PJ20	I	São Paulo	clínica
67	PJ21	I	São Paulo	clínica
68	PJ22	M	São Paulo	subclínica
69	PJ23	N	São Paulo	subclínica
70	PJ24	I	São Paulo	clínica
71	PJ25	I	São Paulo	clínica
72	PJ26	I	São Paulo	clínica
73	PJ27	I	São Paulo	clínica
74	PJ28	I	São Paulo	clínica
75	P1	O	Minas Gerais	clínica

NI: Não Informado