

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 27/01/2018 .

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.

# **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.