CARLOS EDUARDO FIDELIS

Tipagem por MALDI-TOF MS e sensibilidade aos antimicrobianos de *Prototheca* spp. isolados de mastite bovina

Pirassununga

2021

CARLOS EDUARDO FIDELIS

Tipagem por MALDI-TOF MS e sensibilidade aos antimicrobianos de *Prototheca* spp. isolados de mastite bovina

VERSÃO CORRIGIDA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Nutrição e Produção animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção animal

Orientador:

Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos

Pirassununga

2021

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 4131
FMVZ

Fidelis, Carlos Eduardo
Tipagem por MALDI-TOF MS e sensibilidade aos antimicrobianos de *Prototheca* spp. isolados de mastite bovina / Carlos Eduardo Fidelis. – 2021.
77 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2021.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos.

1. Resistência. 2. PCR. 3. Desinfetantes. 4. Sensibilidade. 5. Microalga I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Camila Molgara Gamba, CRB 7070-8, da FMVZ/USP.

São Paulo, 27th October 2021

CERTIFIED

We certify that the Research "Typing by MALDI-TOF MS and sensitivity to antimicrobials of Prototheca spp. isolated from bovine mastitis", protocol number CEUAx 7769040320 (ID 001369), under the responsibility Marcos Veiga Dos Santos, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo), and was approved in the meeting of day April 08, 2020.

Certificamos que o protocolo do Projeto de Pesquisa intitulado "Tipagem por MALDI-TOF MS e sensibilidade aos antimicrobianos de Prototheca spp. isolado de mastite bovina", protocolado sob o CEUAx nº 7769040320, sob a responsabilidade de Marcos Veiga Dos Santos, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e foi aprovado na reunião de 08 de abril de 2020.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: FIDELIS, Carlos Eduardo

Título: **Tipagem por MALDI-TOF MS e sensibilidade aos antimicrobianos de *Prototheca* spp. isolados de mastite bovina.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a minha família (minha mãe Cátia, meu pai Luís, meus irmãos Guilherme e Gabriel, e minha vó Marilda) por todo o apoio e suporte emocional desde sempre e especialmente neste momento tão importante de minha vida. Tenho certeza que nada disso seria possível sem o apoio de vocês.

À minha namorada Fabíola, o melhor presente que a vida me deu e quem tenho a alegria de construir uma história junto. Obrigado por todo companheirismo e paciência durante os momentos difíceis dessa trajetória. Sua doçura, carinho, e palavras de amor amenizaram a dor e me guiaram nos dias difíceis.

Ao meu orientador Prof. Marcos Veiga dos Santos, por toda a confiança nesse tempo em que trabalhamos juntos. Agradeço pela grande oportunidade que tive. Durante estes cinco anos de parceria, foi o grande responsável pelo meu crescimento profissional e pessoal.

Agradeço também a todos aqueles que fazem ou fizeram parte do laboratório Qualileite (Bruna Gomes, Brunna Granja, Camylla Monteiro, Cristian Martins, Danielle Fonseca, Breno Garcia, Gustavo Freu, José Garcia Moreno, Juliana Barreiro, Larissa Martins, Lígia Pereira, Melina Barcelos, Tiago Tomazi, todos os alunos de iniciação científica e todos os estagiários) por me auxiliarem durante essa caminhada.

Quero agradecer especialmente a Renata Leite e Juliano Gonçalves por todo o auxílio nas análises realizadas durante o mestrado. Essa dissertação não seria possível sem o incansável esforço e dedicação que os dois empenharam.

À Universidade de São Paulo, à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e ao Departamento de Nutrição e Produção Animal por toda a infraestrutura necessária para que pudesse concluir este trabalho.
Aos professores do Departamento de Nutrição e Produção Animal: Alexandre Augusto de Oliveira Gobessso, Augusto Hauber Gameiro, Cesar Augusto Pospissil Garbossa, Francisco Palma Rennó, Júlio César de C. Balieiro, Márcio Antônio Brunetto, Paulo Henrique Mazza Rodrigues e Ricardo Ventura.

Agradeço a todos os funcionários (seguranças, secretárias e faxineiras) do departamento VNP FMVZ, sem o auxílio e cooperação destas pessoas, este experimento não seria possível.

Agradeço aos amigos que fiz durante a graduação, os quais posso chamar de irmãos. Nicolas Delega, Renan Storolli, Thiago Lima e Wanderson Silva, muito obrigado por todos os bons momentos que passamos juntos. A amizade de vocês é algo incrível que espero levar por toda minha vida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Por fim, estendo meu agradecimento a todos aqueles que não citei, mas saibam que de alguma forma foram importantes para meu desenvolvimento neste ciclo que se encerra.

Muito obrigado a todos!!

.

“A persistência é o caminho do êxito”.

(Charles Chaplin)

RESUMO

FIDELIS, C. E. **Tipagem por MALDI-TOF MS e sensibilidade aos antimicrobianos de *Prototheca* spp. isolados de mastite bovina**. [Typing by MALDI-TOF MS and sensivity to antimicrobials of *Prototheca* spp. isolated from bovine mastitis]. 2021 77f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Prototheca spp. é uma microalga unicelular que pode causar infecções oportunistas em humanos e animais. Este patógeno apresenta elevada resistência aos antimicrobianos convencionais e os atuais métodos de identificação de *Prototheca* spp. são demorados e com elevado custo. Diante disso, os objetivos do presente estudo foram (a): avaliar o uso da técnica de MALDI-TOF MS para identificação em nível de espécie de isolados de *Prototheca* spp. causadores de mastite bovina; (b) identificar a capacidade de produção de biofilme e (c) a sensibilidade *in vitro* de *Prototheca* spp. diante do polihexametileno biguanida (PHMB) e desinfetantes utilizados antes e após ordenha (hipoclorito de sódio, dicloroisocianurato de sódio, clorexidina e iodo-povidona). Um total de 87 isolados de *Prototheca* spp. foram submetidos a extração de proteínas ribossomais por *beads* de zircônia, e posteriormente identificados por MALDI-TOF MS pelo software Biotyper suplementado com espectros de referência. Para determinação do perfil de sensibilidade *in vitro*, os isolados de *Prototheca* spp. foram submetidos a avaliação de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração algicída mínima (CAM) pelo método de microdiluição em caldo. A capacidade de formação de biofilme foi avaliada pelo método de incubação em microplacas de fundo chato e, posteriormente, os isolados foram classificados como fortes, moderados, fracos e não formadores de biofilme. A MALDI-TOF MS possibilitou a identificação de 73 (73/85) isolados como *P. bovis* e 2 (2/2) isolados como *P. blaschkeae*, sendo que, 12 (12/85) isolados de *Prototheca* foram identificados em nível de gênero. Do total dos isolados de *P. bovis* identificados por PCR, 63,5% (54/85) foram classificados como fortes, 28,2% (24/85) moderados, e 8,2% (7/85) fracos produtores de biofilme. Por outro lado, um isolado de *P. blaschkeae* foi classificado como fraco e o outro como moderado produtor de biofilme. A PHMB (CIM_{90}: ≥2 µg/ml e CAM_{90}: ≥4 µg/ml) e o gluconato de clorexidina (CIM_{90} e CAM_{90}: ≥2 µg/ml), apresentaram os menores valores de CIM e CAM, seguido de dicloroisocianurato de sódio (CIM_{90} e CAM_{90}: ≥1.400 µg/ml), hipoclorito de sódio (CIM_{90} e CAM_{90}: ≥2.800 µg/ml), e iodo-polivinilpirrolidona (CIM_{90} e CAM_{90}: ≥3.200 µg/ml). Concluímos que o uso

da MALDI-TOF MS permite a rápida identificação de isolados de *Prototheca* spp. em nível de espécie. Mais de 90% dos isolados de *P. bovis* apresentaram elevada capacidade de formação de biofilme. Dentre os desinfetantes, PHMB e o gluconato de clorexidina apresentaram os menores valores para inibição e inativação dos isolados de *Prototheca* spp. Sendo assim, estes antimicrobianos podem ser utilizados como alternativa antes e após a ordenha para o controle da disseminação de *Prototheca* spp. no rebanho.

Palavras-chave: resistência, PCR, desinfetantes, sensibilidade, microalga.

ABSTRACT

FIDELIS, C. E. **Typing by MALDI-TOF MS and sensivity to antimicrobials of *Prototheca* spp. isolated from bovine mastitis** [Tipagem por MALDI-TOF MS e sensibilidade aos antimicrobianos de *Prototheca* spp. isolados de mastite bovina]. 2021 77p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Prototheca spp. is a unicellular microalgae that can cause opportunistic infections in humans and animals. This pathogen has high resistance to conventional antimicrobials and the current identification methods for *Prototheca* spp. are time-consuming and presently elevate costly. Due this, the objectives of the present study were (a): to evaluate the use of the MALDI-TOF MS for species-level identification of isolates of mastitis-causing *Prototheca* spp.; (b) evaluate the biofilm production capacity and (c)evaluate the *in vitro* sensibility of *Prototheca* spp. against polyhexamethylene biguanide (PHMB) and disinfectants (sodium hypochlorite, sodium dichloroisocyanurate, chlorhexidine gluconate and iodine-polivinilpirrolidona). A total of 87 isolates of *Prototheca* spp. were subjected to ribosomal protein extraction by zirconia beads, and identified by MALDI-TOF MS by Biotyper software supplemented with reference spectra. To determine the in vitro sensibility, isolates of *Prototheca* spp. were submitted to evaluation of Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Algicidal Concentration (MAC) by broth microdilution method. The biofilm production capacity was evaluated by the method of incubation in flat-bottomed microplates. Then, the isolates were classified as strong, moderate, weak and non-biofilm producers, by optical density values. The MALDI-TOF MS allowed the identification of 73 (73/85) isolates as *P. bovis* and 2 (2/2) isolates as *P. blaschkeae*, with 12 (12/85) isolates of Prototheca being identified at the genus level. Of the total of *P. bovis* isolates identified by PCR, 63.5% (54/85) were classified as strong, 28.2% (24/85) moderate, and 8.2% (7/85) weak producers of biofilm. On the other hand, one isolate of *P. blaschkeae* was classified as weak and the other as moderate biofilm producer. PHMB (MIC_{90}: ≥2 µg/ml and MAC_{90}: ≥4 µg/ml) and chlorhexidine gluconate (MIC_{90} and MAC_{90}: ≥2 µg/ml) had the lowest MIC and MAC values, followed by sodium dichloroisocyanurate (MIC_{90} and MAC_{90}: ≥1400 µg/ml), sodium hypochlorite (MIC_{90} and MAC_{90}: ≥2,800 µg/ml), and iodine-polivinilpirrolidona (MIC_{90} and MAC_{90}: ≥3,200 µg/ml). We conclude that the use of MALDI-TOF MS allows the rapid identification of *Prototheca* spp. at the species level. More than 90% of the *P. bovis* isolates presented

high capacity for biofilm production. Among the disinfectants, PHMB and chlorhexidine gluconate presented the lowest values for inhibition and inactivation of *Prototheca* spp. Therefore, these antimicrobials can be used as an alternative to control the *Prototheca* spp. in the herd.

Keywords: resistance, PCR, disinfectants, sensibility, microalga.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Espectros de massa de isolado de *Prototheca bovis* obtido de vaca com mastite, submetido à extração de proteínas ribossomais pelo método convencional de extração direto em placa (a) e pelo método de extração por *beads* de zircônia (b). 48

Figura 2 - Espectros de massas obtidos das cepas de referência de a) *Prototheca ciferrii* (RZI-3); b) *Prototheca bovis* (LZ-5) e c) *Prototheca blaschkeae* (RZIII-3). 50

Figura 3 – Gel de agarose 1% mostrando os padrões de amplificação de bandas de DNA por PCR de *Prototheca* spp. isolados de mastite bovina: 1 a 13 (exceto 3 e 10): isolados identificados como *P. bovis* (450pb: 18-4f/18-4r; 165pb: 18-4f/PZGT2). 3 e 10: Isolados identificados como *P. blaschkeae* (450pb: 18-4f/18-4r). a) Cepa controle *P. blaschkeae* (RZIII-3); b) Cepa controle *P. ciferrii* (PZI-3); c) Cepa controle *P. bovis* (LZ-5) e CN) Controle negativo. 54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Matriz de *Composite Correlation Index* proveniente da comparação dos espectros das cepas genotipadas de *Prototheca ciferrii*, *Prototheca bovis* e *Prototheca blaschkeae* 52

Tabela 2 - Capacidade de produção de biofilme de isolados de *Prototheca bovis* e *Prototheca blaschkeae* provenientes de casos de mastite clínica e subclínica de vacas leiteiras[1] 55

Tabela 3 – Frequência de isolados de *Prototheca bovis* de mastite bovina inibidos *in vitro* de acordo com as concentrações de desinfetantes[1] 57

Tabela 4 - Frequência de isolados de *Prototheca bovis* de mastite bovina inativados *in vitro* de acordo com as concentrações de desinfetantes[1] 59

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
AF	Ácido fórmico
ATCC	*American Type Culture Collection*
BHI	Caldo cérebro coração
CAM	Concentração Algicída Mínima
CCI	*Composite Correlation Index*
CCS	Contagem de células somáticas
CEUA	Comitê de ética de uso de animais
CHG	Gluconato de clorexidina
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	*Clinical & Laboratory Standards Institute*
DO	Densidade ótica
DP	Desvio padrão
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
GM	Glândula mamária
HCCA	Ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico
MC	Mastite clínica
MSC	Mastite subclínica
MSP	Mais Spectra Profile
NaCLO	Hipoclorito de sódio
NaDCC	Dicloroisocianurato de sódio
NMC	*National Mastitis Council*
PCR	*Polymerase Chain Reaction*
pH	Potencial hidrogeniônico
PHMB	Polihexametileno biguanida
PVP-I	Iodo-povidona
RPM	Rotações por minuto
TSB	Caldo triptona soja
µg/ml	Microgramas por mililitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 18

2 OBJETIVOS 20

2.1 OBJETIVO GERAL 20

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 20

3 REVISÃO DE LITERATURA 21

3.1 MASTITE BOVINA 21

3.2 *PROTOTHECA* SPP. 23

3.3 MASTITE BOVINA POR *PROTOTHECA* SPP. 26

3.4 CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME 28

3.5 ANTISSÉPTICOS E DESINFETANTES 31

3.6 POLIHEXAMETILENO BIGUANIDA 32

3.7 CAPACIDADE DE RESISTÊNCIA DE *PROTOTHECA* SPP. AOS ANTIMICROBIANOS 34

3.8 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE *PROTOTHECA* SPP. 36

4 MATERIAL E MÉTODOS 38

4.1 COMITÊ DE ÉTICA 38

4.2 OBTENÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS E CEPAS DE REFERÊNCIA 38

4.3 IDENTIFICAÇÃO POR MALDI-TOF MS 39

4.3.1 Protocolo de extração de proteínas ribossomais 39

4.3.2 Obtenção dos espectros 39

4.3.3 Construção da biblioteca contendo os espectros de referência 40

4.3.4 Identificação de *Prototheca* spp. por MALDI-TOF MS 41

4.4 IDENTIFICAÇÃO DE *PROTOTHECA* SPP. POR PCR 42

4.4.1 Extração do DNA 42

4.4.2 Purificação do DNA 43

4.4.3 Reação em cadeia de polimerase (PCR) 43

4.4.4 Eletroforese em gel de agarose 44
4.5 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME 44
4.6 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS 45
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA 47
5 RESULTADOS 47
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS 47
5.2 OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS RIBOSSOMAIS 47
5.3 CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA LOCAL DE ESPECTROS DE MASSA 48
5.4 AVALIAÇÃO DE SIMILARIDADE ENTRE OS ESPECTROS DE MASSAS DAS CEPAS DE REFERÊNCIA 51
5.5 IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE *PROTOTHECA* SPP. POR MALDI-TOF .. 53
5.6 IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE *PROTOTHECA* SPP. POR PCR 53
5.7 CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME 54
5.1 PERFIL DE RESISTÊNCIA DE *PROTOTHECA* SPP. AOS DESINFETANTES.... 55
6 DISCUSSÃO 61
6.1 IDENTIFICAÇÃO DE *PROTOTHECA* SPP. POR MALDI-TOF MS E PCR 61
6.2 FORMAÇÃO DE BIOFILME E RESISTÊNCIA DE *PROTOTHECA* SPP. AOS ANTIMICROBIANOS 64
7 CONCLUSÃO 67
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 68

1 INTRODUÇÃO

Algas do gênero *Prototheca* são microrganismos unicelulares, saprófitas, ubíquas, encontradas no ambiente, particularmente em matéria orgânica, fezes e água (JAGIELSKI et al., 2007). Não apresentam capacidade fotossintética, o que provavelmente estimulou o desenvolvimento de um modo de nutrição heterotrófico (SHAVE; MILLYARD; MAY, 2021). Apesar de quinze espécies de *Prototheca* spp. serem conhecidas atualmente (JAGIELSKI et al., 2019a), apenas seis são consideradas patógenos oportunistas para animais vertebrados. Dentre estas, podemos destacar as espécies *Prototheca wickerhamii*, *Prototheca bovis* e *Prototheca blaschkeae,* das quais a primeira mais relacionada a casos de infecção em humanos e animais domésticos, enquanto as duas últimas a casos de mastite bovina (SHAVE; MILLYARD; MAY, 2021).

Durante as últimas duas décadas, aumento significativo de casos de mastite causada por *Prototheca* spp. tem sido relatado em vários países (PIEPER et al., 2012; GONÇALVES et al., 2015; JAGIELSKI et al., 2019b). A maior prevalência de mastite causada por *Prototheca* spp. nos rebanhos leiteiros pode estar relacionada as más condições ambientais e deficiências no processo de higiene da ordenha (SPEROTTO et al., 2021). A mastite causada por *Prototheca* spp. resulta em perdas econômicas em razão da diminuição da produção e qualidade do leite, descarte prematuro das vacas infectadas e dos custos associados ao tratamento e serviços veterinários (JAGIELSKY et al. 2018). Devido à importância deste microrganismo, o diagnóstico rápido permite a adoção de medidas de prevenção e controle eficazes.

Embora a identificação de *Prototheca* spp. em nível de espécie por PCR seja considerada o método padrão-ouro, o elevado tempo de duração e custo dificultam a implementação como rotina laboratorial. Como alternativa, a técnica de Espectrometria de Massas por Ionização e Dessorção à Laser Assistida por Matriz – Tempo de Voo (MALDI-TOF MS) tem sido cada vez mais utilizada para identificação de bactérias e leveduras causadores de mastite, possibilitando rapidez e acurácia no diagnóstico (BARREIRO et al., 2010). No entanto, os protocolos de extração de proteínas ribossomais usados nas análises de MALDI-TOF para identificação de bactérias não são eficazes para identificação de microalgas, devido às diferenças de composição da parede celular da *Prototheca* spp. (VON BERGEN et al., 2009). Outro fator limitante para o uso da MALDI-TOF para a identificação de *Prototheca* spp., é a ausência de espectros de referência de *Prototheca* spp. isoladas de mastite bovina nas

bibliotecas dos softwares usados para análises de espectros e identificação dos microrganismos (e.g., Biotyper, Bruker).

Além das limitações do diagnóstico de *Prototheca* spp., não há protocolos de tratamento eficazes para este microrganismo, que apresenta elevada resistência a vários antimicrobianos e desinfetantes. Assim, antissépticos e desinfetantes que possam ser utilizados para a desinfecção de tetos antes e após a ordenha tem sido investigados para o controle da transmissão ambiental e contagiosa de *Prototheca* spp. Os desinfetantes comumente utilizados para a desinfecção de tetos, como iodo, clorexidina, guanidina e hipoclorito de sódio, apresentam boa atividade antimicrobiana *in vitro* contra *Prototheca* spp. (SALERNO et al., 2010; KRUKOWSKI et al., 2013; GONÇALVES et al., 2015). No entanto, a ação antimicrobiana de polímeros como o polihexametileno biguanida (PHMB) ainda não foi avaliada em isolados de *Prototheca* spp. obtidos de mastite bovina.

Dentre as características antimicrobianas desejáveis da PHMB destaca-se a baixa citotoxicidade e o amplo espectro de ação contra bactérias Gram-positivas, Gram negativas, leveduras e protozoários (FIRDESSA et al., 2015; KAMARUZZAMAN; FIRDESSA; GOOD, 2016; LEITE et al., 2021). A PHMB pode atuar na membrana do microrganismo, o que leva a um aumento da fluidez e permeabilidade, que resulta na perda de integridade celular. Outro modo de ação consiste na condensação de cromossomos dos microrganismos por meio de ligação direta ao DNA (FIRDESSA, et al., 2015).

A alta resistência de *Prototheca* spp. aos antimicrobianos pode estar relacionada à capacidade de produção de biofilme. Biofilme são compostos por comunidades de microrganismos associadas a superfícies de origem biótica ou abiótica e envoltos de matriz extracelular, formada principalmente por exopolissacarídeos (LIAQAT, 2019). Microrganismos no interior do biofilme podem ser mil vezes mais resistentes a antimicrobianos quando comparados a microrganismos planctônicos (LIAQAT, 2019). Embora a capacidade de formação de biofilme seja um fator de redução da chance de cura da mastite, ainda há poucos estudos sobre a capacidade de formação de biofilme isolados de *Prototheca* spp. oriundos de casos de mastite (KWIECINSKI, 2015; GONÇALVES et al., 2015; MORANDI et al., 2016).

Considerando o aumento do número de casos de prototecose mamária, os prejuízos econômicos e as limitações no diagnóstico de *Prototheca* spp., é necessário a busca de novas ferramentas para a rápida identificação deste microrganismo. Além do mais, devido à falta de protocolos de tratamento eficazes, e a capacidade de formação de biofilme apresentada por

Prototheca spp., novos compostos precisam ser avaliados para o uso antes e após a ordenha para o controle da disseminação de *Prototheca* spp. no rebanho.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Os objetivos gerais do presente estudo foram: (a) avaliar a técnica de MALDI-TOF MS para identificação em nível de espécie de isolados de *Prototheca* spp. causadores de mastite bovina; (b) avaliar a sensibilidade antimicrobiana de *Prototheca* spp. em relação a PHMB e a desinfetantes; e (c) avaliar a capacidade de produção de biofilme de *Prototheca* spp. isolados de mastite bovina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Construir biblioteca local no *software* Biotyper com espectros de massas de cepas de referência de *Prototheca* spp. para uso na identificação em nível de espécie por MALDI-TOF MS.
b) Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração algicida mínima (CAM) de PHMB, gluconato de clorexidina, dicloroisocianurato de sódio, iodo-povidona e hipoclorito de sódio frente a isolados de *Prototheca* spp. causadores de mastite bovina.
c) Avaliar a frequência das espécies de *Prototheca* spp. isoladas de casos de mastite clínica e subclínica.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 MASTITE BOVINA

A mastite é um processo inflamatório na glândula mamária (GM), que pode ser de origem fisiológica, traumática, alérgica, metabólica ou, mais comumente, de origem infecciosa (DOWN et al., 2017; LOPES; MANZI; LANGONI, 2018). É a doença que mais acomete as vacas leiteiras, associada com prejuízos econômicos significativos em toda a cadeia de produção do leite (LANGONI, 2013; DOWN et al., 2017).

Os impactos econômicos da mastite estão principalmente relacionados à diminuição de produção de leite; alterações físico-químicas, associadas com menor rendimento industrial; diminuição do tempo de prateleira dos derivados lácteos; custos com tratamentos e honorários de profissionais; descarte de leite durante o período de carência; perda funcional da GM; morte e descarte prematuro de animais (ACOSTA et al., 2016; LANGONI et al., 2017).

A mastite tem implicações em saúde pública, visto que muitos microrganismos encontrados no leite de vacas com mastite podem ser patogênicos ao consumidor de leite e derivados. Além disso, toxinas não inativadas no processo de pasteurização, resíduos de antimicrobiano e o aumento da resistência à antibióticos causam riscos à saúde humana (BRADLEY, 2002; RIBEIRO et al., 2009).

A mastite é uma doença de caráter multifatorial considerando-se a tríade epidemiológica, que inclui: patogenicidade do agente causador, resposta imune do hospedeiro, e fatores ambientais. Esses aspectos influenciam diretamente a resolução ou agravamento da inflamação (OVIEDO-BOYSO et al., 2007; SANTOS; FONSECA, 2019). Em relação ao hospedeiro, vacas mais velhas são mais susceptíveis a novas infecções pela maior facilidade de invasão microbiana, entretanto, a mastite em novilhas também é cada vez mais frequente (LANGONI, 2013; SANTOS; FONSECA, 2019). No quesito ambiente, a temperatura, umidade e pH, são fatores de risco para ocorrência de novos casos de mastite (LANGONI, 2013).

O processo inflamatório se inicia quando os microrganismos invadem a GM pelo canal dos tetos e se multiplicam (ACOSTA et al., 2016). Diferentes fatores de risco são associados à invasão dos microrganismos na glândula mamária: colonização da pele e do canal do teto, inversão do fluxo de leite durante a ordenha e a introdução de cânulas contaminadas (SANTOS; FONSECA, 2019). Os microrganismos podem colonizar a cisterna do teto ou outras regiões mais profundas da GM. Em resposta à multiplicação dos microrganismos, ocorre o efluxo de

leucócitos do sangue para o quarto afetado, a fim de eliminar os patógenos e/ou neutralizar as toxinas para que a GM possa voltar a função normal (ACOSTA et al., 2016; SANTOS; FONSECA, 2019).

A mastite pode ser classificada em clínica ou subclínica de acordo com a presença de sintomatologia. Os casos clínicos são caracterizados por respostas inflamatórias mais graves, quando há sinais visíveis de alterações no leite (presença de grumos) ou do quarto afetado, como edema, aumento de temperatura e dor (BRADLEY, 2002; LANGONI, 2013). Além disso, a mastite clínica pode causar sinais sistêmicos, como febre, apatia, desidratação, anorexia e ocasionalmente morte do animal (RUEGG, 2012; SANTOS; FONSECA, 2019).

Na mastite subclínica, não há mudanças visíveis no leite, na GM, ou sinais sistêmicos. Entretanto, o quarto afetado apresenta redução considerável da produção de leite, juntamente com alterações na composição, como o aumento dos teores de cloro, sódio e proteínas do soro, e diminuição dos teores de caseína, lactose e gordura (SANTOS; FONSECA, 2019). Como a mastite subclínica não apresenta sinais visíveis da inflamação, por vezes é subdiagnosticada, podendo se disseminar de forma silenciosa por todo o rebanho (BRAS; VAL; DIAS, 2007). Assim, para detectar a mastite subclínica é necessário o uso de ferramentas de diagnóstico como a contagem de células somáticas (CCS) ou o California Mastitis Test (CMT) (LANGONI, 2013).

A mastite bovina é conhecida pela elevada diversidade etiológica, posto que mais de 150 espécies de microrganismos já foram relatadas como causadores de infecções intramamárias. Os microrganismos que podem causar mastite incluem fungos, algas, vírus e bactérias, com predomínio deste último grupo (RUEGG, 2012; RABIEE; LEAN, 2013; ACOSTA et al., 2016). Classicamente, os patógenos causadores da mastite podem ser divididos entre agentes ambientais e contagiosos, de acordo com o reservatório principal e as vias de transmissão (BRADLEY, 2002; RUEGG, 2012). Os patógenos contagiosos estão bem adaptados ao desenvolvimento no interior da GM e por isso, dependem deste ambiente para sobrevivência e multiplicação. Estão associados a infecções persistentes e risco de sinais clínicos graves. São transmitidos entre as vacas durante a ordenha, pelas mãos dos ordenhadores ou por equipamentos contaminados. Os principais representantes do grupo dos agentes contagiosos são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium* spp. e *Mycoplasma* spp. (LANGONI, 2013; ACOSTA et al., 2016; SANTOS; FONSECA, 2019).

Já os patógenos ambientais têm como reservatório principal o ambiente dos animais e, de forma oportunista, invadem a GM (BRADLEY, 2002; RUEGG, 2012). Como estes

patógenos não estão adaptados ao interior da GM, há geralmente o desencadeamento de resposta inflamatória aguda no animal (BRADLEY, 2002). Geralmente, a resposta imune da vaca aos agentes ambientais é rápida (LANGONI et al., 2017).

Na etiologia da mastite ambiental, os principais representantes são as bactérias do gênero *Streptococcus*, com exceção de *Streptococcus agalactiae*; bactérias Gram negativas, como *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp. e *Enterobacter* spp; além de algumas espécies de fungos, leveduras e microalgas (RIBEIRO et al., 2009; RUEGG, 2012). Embora a classificação dos patógenos entre agentes ambientais e contagiosos ainda seja muito utilizada, sabe-se que algumas espécies podem apresentar características de transmissão tanto contagiosa quanto ambiental (SANTOS; FONSECA, 2019).

Além da forma de transmissão, os microrganismos podem ser classificados de acordo com a virulência e capacidade de causar lesões na GM. Os agentes maiores ou principais da mastite são: *S. aureus*, *S. agalactia*e, estreptococos ambientais e *Mycoplasma* spp. Já os agentes secundários, são constituídos principalmente por espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa e espécies do gênero *Corynebacterium* spp. (SANTOS; FONSECA, 2019).

3.2 *PROTOTHECA* SPP.

O gênero *Prototheca* foi inicialmente descrito por Krüger em 1894, ao isolar dois microrganismos da seiva de *Tilia* e *Ulmus* spp., nomeando-os como *Prototheca moriformis* e *P. zopfii* (JAGIELSKI; LAGNEAU, 2007; LASS-FLÖRL; MAYR, 2007). Foram descritos como algas unicelulares, aeróbicas, semelhantes a *Chlorella* spp. pelo seu modo de reprodução. No entanto, *Prototheca* spp. se diferencia de *Chlorella* spp devido à perda da capacidade de sintetizar clorofila, o que provavelmente resultou na desenvolvimento de um modo heterotrófico de nutrição (LASS-FLÖRL; MAYR, 2007; MILANOV et al., 2016). Atualmente, o gênero *Prototheca* está incluído na classe Trebouxiophyceae, ordem Chlorellales e família Chlorellaceae (JAGIELSKI; LAGNEAU, 2007; KANO, 2019).

Até o momento, são conhecidas quinze espécies de *Prototheca* spp.: *P. zopfii*, *P. stagnora*, *P. wickerhamii, P. blaschkeae*, *P. cutis*, *P. miyajii, P. tumulicola*, *P. ciferri*, *P. bovis, P. moriformis*, *P. cookei*, *P. pringsheimii*, *P. xanthoriae*, *P. cerasi*, e *P. paracutis* (ROESLER et al., 2006; PORE, 2011; MASUDA et al., 2016; NAGATSUKA et al., 2017; JAGIELSKI et al., 2019a; KUNTHIPHUN et al., 2019). Antes do uso de técnicas moleculares, os isolados de *P. zopfii* eram classificados em três genótipos. Com base em métodos moleculares, o genótipo 3 de *P. zopfii* foi redefinido como uma nova espécie, denominada *P. blaschkeae* (ROESLER et

al., 2006). Mais recentemente, ao utilizar o gene mitocondrial *cytb* como marcador molecular, foi proposto que *P. zopfii* genótipo 1 fosse reclassificada como *P. ciferrii*, enquanto *P. zopfii* genótipo 2 comumente isolada de bovinos, foi renomeada como nova espécie, denominada *P. bovis* (JAGIELSKI et al., 2019a).

As células de *Prototheca* spp. são hialinas, ovoides, ou esféricas e podem medir de 3 a 30 µm de diâmetro, dependendo da espécie e estágio de desenvolvimento. Apresentam pequeno núcleo centralizado, abundância de ribossomos pelo citoplasma, ausência de cloroplastos, e presença de dupla parede celular (JAGIELSKI; LAGNEAU, 2007). A nutrição é heterotrófica e requer fontes externas de carbono e nitrogênio como glicose, frutose e galactose. Todas as espécies requerem tiamina e oxigênio para a multiplicação (LASS-FLÖRL; MAYR, 2007).

A reprodução neste grupo de microrganismos ocorre de forma assexuada. Durante a maturação celular, o citoplasma passa por processo de clivagem interna, para a formação de endósporos de formato irregular. As células-mãe (esporângios), podem conter de 2 a 20 endósporos, que se desenvolvem, e exercem pressão sobre a parede celular que se rompe liberando os endósporos, dando início a um novo ciclo de desenvolvimento. A liberação de endósporos ocorre a cada 5 a 6 horas, na presença de nutrientes adequados e em temperatura média 25°C (MILANOV et al., 2016; KANO, 2019).

Este grupo de microrganismos está amplamente distribuído no meio ambiente, apresentando afinidade por áreas úmidas e com elevada presença de matéria orgânica (PORE et al., 1983; ANDERSON; WALKER, 1988). Também estão presentes na seiva dos vegetais, e por precipitações pluviométricas podem ser carregados até rios e lagos. A ausência de matéria orgânica nestes ambientes aquáticos impede o nível elevado de reprodução. Sendo assim, as espécies de *Prototheca* spp. podem ser comumente encontradas em ambientes onde há presença de lodo ou esgoto doméstico (PORE et al., 1983; PORE, 1985). Quando isolada em amostras de solo, geralmente é encontrada ao redor de árvores com elevada produção de seiva, lama, margens de rios, lagos e locais contaminados com esgoto (PORE et al., 1983).

Algas do gênero *Prototheca* spp. são essencialmente de vida livre mas, sob certas condições, podem se tornar patogênicas, apresentando potencial zoonótico (JAGIELSKI et al., 2019a). Pelo menos cinco espécies de *Prototheca* (*P. bovis, P. wickerhamii, P. cutis e P. miyajii*, *P. blaschkeae*) foram descritas como patógenos oportunistas causadores de infecções em humanos e animais domésticos (MAYORGA et al., 2012; MASUDA et al., 2016; KUNTHIPHUN et al., 2019)

A espécie mais comumente isolada em infecções em humanos é *P. wickerhamii,* embora sejam relatados casos de infecção por *P. bovis.* A infecção pode ser decorrente de contato com fonte de água ou solo contaminado, através de inoculação traumática, com o contato direto com o microrganismo, ou até mesmo decorrente de picada de insetos (JAGIELSKI; LAGNEAU, 2007; TODD et al., 2018). O consumo de leite contaminado também pode ser via de contaminação deste microrganismo, quando não há a eliminação do patógeno durante a pasteurização (MILANOV et al., 2016).

Este patógeno já foi isolado em humanos na pele, nas unhas, no trato respiratório e no sistema digestório. O primeiro caso de prototecose humana foi relatado em 1964 (TODD et al., 2018). Até 2017 foram mundialmente relatados 105 casos de prototecose humana, com média de seis a sete casos por ano, com aumento entre pacientes imunossuprimidos (TODD et al., 2018).

A infecção causada por *Prototheca* spp. pode ser aguda ou crônica, localizada ou de forma disseminada. As diferentes apresentações clínicas da prototecose humana incluem lesões de pele, bursite olecraniana e manifestações sistêmicas (relatadas principalmente na pele, tecido subcutâneo, intestino, peritônio, sangue e baço) (LASS-FLÖRL; MAYR, 2007; MAYORGA et al., 2012; TODD et al., 2018). Nas infecções cutâneas são mais comuns, lesões com presença de bolhas e secreção purulenta, hipopigmentação, nódulos, úlceras e abscessos. Acredita-se que mais da metade dos casos documentados de prototecose são de manifestações cutâneas ou subcutâneas. Já as manifestações de bursite olecraniana ocorrem geralmente após lesões ou arranhões e incluem desde o endurecimento moderado do local até a formação de massa dolorosa (LASS-FLÖRL; MAYR, 2007; MAYORGA et al., 2012).

Em animais de pequeno porte, a prototecose é uma doença incomum e esporádica, mas com crescente importância (KANO, 2019). Há relatos de prototecose em diferentes espécies de animais, como cães, gatos, bovinos, cobras, veados, morcegos e peixes (JAGIELSKI et al., 2019a). Na maioria das vezes, as infecções são causadas por *Prototheca bovis* (JAGIELSKI; LAGNEAU, 2007; SIQUEIRA; RIBEIRO; SALERNO, 2008), mas há relatos de prototecose causada por *P. wickerhamii* (FONT; HOOK, 1984; TSUJI et al., 2006; ENDO et al., 2010) e *P. blaschkeae* (MARQUES et al., 2008; RICCHI et al., 2013).

Os sinais clínicos em pequenos animais estão mais comumente associados a inflamação no intestino grosso, diarreia grave e hematoquezia, entretanto, *Prototheca* spp. pode infectar outros órgãos, dentre os quais, encéfalo, pulmões, baço, fígado, olhos, língua, pele e linfonodos superficiais (SIQUEIRA; RIBEIRO; SALERNO, 2008; VINCE et al., 2014).

Em felinos, a forma de prototecose mais comumente encontrada é a cutânea, com presença de nódulos, úlceras e crostas exsudativas principalmente na testa, membros distais, base da cauda e nariz. Já em cães, a prototecose tende a ser mais grave, podendo ser classificada como doença disseminada, pois envolve muitos órgãos e tecidos, afetando principalmente o fígado, rins, cérebro e olhos. Como principal sinal clínico, observa-se casos de enterite hemorrágica crônica (SIQUEIRA; RIBEIRO; SALERNO, 2008; ENDO et al., 2010).

3.3 MASTITE BOVINA POR *PROTOTHECA* SPP.

A mastite causada por *Prototheca* spp. geralmente se apresenta de forma crônica, com ausência de sinais clínicos e sistêmicos, caracterizada por redução significativa na produção de leite (JÁNOSIL et al., 2001a). Diferentemente das infecções causadas por outros patógenos, a resposta inicial contra *Prototheca* spp. é branda e a CCS não se altera durante os estágios iniciais da infecção (WAWRON et al., 2013). Entretanto, no decorrer do processo inflamatório, a CCS pode atingir > 1.000.000 cells/mL (MILANOV et al., 2016).

Embora menos recorrente, a mastite prototecal pode se manifestar de forma clínica e aguda. Os sinais clínicos mais comuns incluem alterações na aparência e consistência do leite, o qual se torna aguado, apresentando coloração acinzentada e com pequenos flocos. Na vaca afetada também podem ser observados sinais clínicos, como dor e edema no úbere. Perda de apetite e aumento de temperatura corporal são relatados como alguns dos principais sinais sistêmicos encontrados (JÁNOSIL et al., 2001a; MILANOV et al., 2016).

Algas do gênero *Prototheca* possuem a capacidade de colonizar o lúmen alveolar e o interstício, e se interiorizar em neutrófilos e macrófagos (SIQUEIRA; RIBEIRO; SALERNO, 2008; WAWRON et al., 2013). A resposta imune contra este patógeno resulta em granulomas e atrofia irreversível do parênquima funcional (JÁNOSIL et al., 2001a; MILANOV et al., 2016). Além disso, foi relatado que *P. bovis* pode induzir a apoptose de células do epitélio mamário (SHAHID et al., 2017).

A espécie de *Prototheca* mais isolada em casos de mastite é *P. bovis* anteriormente denominada *P. zopfii* genótipo 2 (RICCHI et al., 2010; PIEPER et al., 2012; JAGIELSKI et al., 2019c; PARK et al., 2019). Além de *P. bovis*, *P. wickerhamii* e *P. blaschkeae* também são relatadas menos frequentemente como agentes causadores de mastite (JÁNOSIL et al., 2001b; MARQUES et al., 2008; RICCHI et al., 2013).

Durante a última década, a prototecose mamária vem sendo descrita mundialmente de forma crescente. Na Polônia, a frequência de mastite causada por *Prototheca* spp. foi de 8,3 % (JAGIELSKI et al., 2019b) a 12,3%. Na China foi registrada 13,5% de prevalência deste patógeno causando mastite (PARK et al., 2019). No Canadá, ao analisarem rebanhos de todo o país, foi relatado que a frequência média de mastite prototecal foi de 5,1%, variando entre 0% a 12,5% (PIEPER et al., 2012).

No Brasil, os primeiros relatos de mastite causada por *Prototheca* spp. foram relatados em fazendas nos estados de São Paulo e Minas Gerais (BRITO; OLIVEIRA, 1997). A mastite prototecal já foi descrita nos estados do Rio Grande do Sul (DE VARGAS et al., 1998), Ceará (NEILSON et al., 2011), Rondônia (HENRIQUE et al., 2015) e Paraná (CARVALHO et al., 2017). A prevalência deste patógeno como causador de mastite nos rebanhos brasileiros foi estimada em 0,3% (FILIPPSEN et al., 1999). Em episódios de surtos no rebanho, a frequência de *Prototheca* spp. é variável de 7,2% (BUENO et al., 2006) a 14,55% (COSTA et al., 1996).

A alta contaminação por estas algas no ambiente da vaca aumenta o risco de novas infecções (JAGIELSKI et al., 2019b). *Prototheca* spp. já foi encontrada em amostras de leite, fezes, água de consumo, áreas de pastagem, ambiente de ordenha, material de cama, esgoto e lama (COSTA et al., 1997; CORBELLINI et al., 2001; YAMAMURA et al., 2007; OSUMI et al., 2008; SCACCABAROZZI et al., 2008; RICCHI et al., 2010; SHAHID et al., 2016; JAGIELSKI et al., 2019b).

Mesmo com elevada frequência de isolamento de *P. ciferrii* no ambiente próximo ao animal, *P. bovis* predomina como causa de mastite em vacas leiteiras (OSUMI et al., 2008; SHAHID et al., 2016). O isolamento de *Prototheca* spp. de amostras ambientais nem sempre tem relação com casos de mastite. Há relatos da presença deste microrganismo em leite de vacas com mastite na ausência de isolamento em amostras ambientais (BUENO et al., 2006), o que sugere que as vacas podem ser reservatórios deste patógeno.

A presença de *Prototheca* spp. nas fezes indica que as vacas podem ser fontes potenciais de transmissão para outras vacas (COSTA et al., 1997). O isolamento em amostras fecais é decorrente ao consumo de água ou alimentos úmidos, deteriorados ou contaminados com *Prototheca* spp. e, devido à presença de esporopolenina na parede celular (ATKINSON; GUNNING; JOHN, 1972). Estes microrganismos tornam-se resistentes a degradação que ocorre no trato gastrointestinal, tornando-se parte da microbiota transitória encontrada em humanos e animais (PORE; SHAHAN, 1988; KURUMISAWA et al., 2018). Outra importante fonte de transmissão de *Prototheca* spp. são as fezes de bezerros alimentados com leite

contendo *Prototheca* spp., que tem grande importância na cadeia epidemiológica da prototecose mamária (COSTA et al., 1997). A veiculação por insetos ou roedores, ainda que baixa, deve ser considerada na cadeia epidemiológica de transmissão (PORE et al., 1983).

As vacas podem ser fonte de transmissão de *Prototheca* spp., bem como os equipamentos de ordenha não higienizados corretamente, o que facilita a ocorrência de surtos no rebanho (COSTA et al., 1997; CORBELLINI et al., 2001). As espécies de *Prototheca* spp. podem ser transmitidas entre animais da mesma forma que patógenos contagiosos de origem bacteriana (JÁNOSIL et al., 2001b; MILANOV et al., 2016).

Além da contaminação por contato com o ambiente ou equipamentos de ordenha, há vários fatores de risco associados a ocorrência de mastite por *Prototheca* spp. Vacas multíparas, ou que apresentam elevada média de CCS, tem maiores chances de apresentarem mastite caudada por este patógeno. Procedimentos de infusões intramamárias com deficiência de higiene, tratamento com antibióticos, e não utilização do selante de tetos para vacas secas, também são fatores que podem facilitar a ocorrência de prototecose mamária (PIEPER et al., 2012).

3.4 CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME

Biofilmes são classicamente definidos como comunidades complexas e estruturadas, formadas por microrganismos associados a superfícies, biótica ou abiótica, e envoltos de matriz extracelular (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; VERT et al., 2012; LIAQAT, 2019).

A formação do biofilme possibilita a passagem dos microrganismos da forma de vida planctônica para o modo de vida séssil, estado natural e predominante das bactérias (RABIN et al., 2015). Dentre as espécies bacteriana, a maioria da população pode exibir esse tipo de formação em algum estágio do ciclo de vida (LIAQAT, 2019). Os microrganismos no interior do biofilme podem apresentar ciclos de vida coordenados, o qual confere inúmeras vantagens. Ainda, o biofilme possibilita a sobrevivência em ambientes dinâmicos e com baixa oferta de nutrientes, resistência aos antimicrobianos, armazenamento de enzimas extracelulares, além de proteção física contra a dessecação (NADELL; XAVIER; FOSTER, 2009; FLEMMING et al., 2016; LIAQAT, 2019).

A comunidade do biofilme pode ser composta de espécies homogêneas ou heterogêneas (SATPATHY et al., 2016), correspondendo de 10 a 25% da massa total do biofilme, ao passo que a matriz extracelular corresponde de 75 a 90% da massa final (FLEMMING;

WINGENDER, 2010). A matriz é formada principalmente por água (cerca de 97%); componentes solúveis (polissacarídeos, DNA extracelular, e proteínas) e componentes insolúveis (amiloides, celulose, e algumas adesinas específicas) (FLEMMING; NEU; WOZNIAK, 2007; FLEMMING; WINGENDER, 2010; HOBLEY et al., 2015). A presença de poros e canais compõem um sistema de circulação rudimentar que facilita o transporte de líquidos e nutrientes (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

O processo de formação de biofilme é composto de cinco estágios. Como pré-requisito é necessário que os microrganismos se aproximem o suficiente da superfície alvo. A uma distância de 10 a 20 nanômetros, as forças atrativas de interações de Van der Walls superam as forças repulsivas da superfície, e ocorre a adesão, embora ainda reversível (PALMER; FLINT; BROOKS, 2007). A segunda etapa é a transição para a fase irreversível. Adesinas específicas, pili e fimbrias, interagem com a superfície e juntamente de polímeros extracelulares secretados pelo próprio microrganismo fixam a bactéria no substrato (STOODLEY et al., 2002).

Decorrido a imobilização permanente das células, a terceira etapa se inicia com o desenvolvimento inicial da arquitetura do biofilme, por meio de secreção de matriz extracelular. Na quarta etapa, com o biofilme já em estágio avançado, ocorre a formação de colônias no interior do biofilme, e as bactérias se estratificam de acordo com seu metabolismo e tolerância a oxigênio e pH (RABIN et al., 2015). Concomitantemente, substâncias poliméricas são secretadas, formando novas estruturas como canais e poros que irão possibilitar a entrada de nutrientes e oxigênio, e a excreção de metabólitos (STOODLEY et al., 2002; SATPATHY et al., 2016).

Após a maturação do biofilme, ocorre a última etapa, caracterizada pela dispersão. A falta de nutrientes, a elevada competição e a superpopulação são fatores ligados à necessidade de quebra do biofilme e dispersão dos microrganismos. A degradação da matriz extracelular é realizada por enzimas secretadas, possibilitando a dispersão de todo o biofilme ou apenas uma parte. Esta etapa é crítica, pois a liberação das bactérias possibilita a formação de biofilmes em outros substratos (RABIN et al., 2015). A formação de biofilme é um processo que demanda muita energia e depende de fatores relacionados a presença de nutrientes, síntese de material extracelular, estresse e competição (FLEMMING et al., 2016).

Bactérias no interior do biofilme podem ser 1000 vezes mais resistentes que as que apresentam forma de vida livre (RASMUSSEN; GIVSKOV, 2006). O aumento da resistência está ligado à ação conjunta dos organismos no interior do biofilme, proteção física, e produção de fatores de virulência (RABIN et al., 2015; SATPATHY et al., 2016).

A matriz extracelular desempenha importante função por limitar a penetração de antimicrobianos no biofilme (RABIN et al., 2015). A hipótese é de que enzimas encontradas na matriz inibam a ação dos antimicrobianos, reduzindo as concentrações sub-letais aos microrganismos (OUBEKKA et al., 2012). Outro importante fator é o aumento da transferência horizontal de genes de resistência, que ocorre facilmente devido a elevada densidade populacional (FUX et al., 2005).

Células microbianas no interior do biofilme possuem taxa de multoplicação reduzida devido à baixa disponibilidade de nutrientes e oxigênio. Consequentemente, esses microrganismos possuem metabolismo lento e com baixa taxa de divisão, tornando-os resistentes a antimicrobianos que possuem como alvo células em divisão, como é o caso dos antibióticos β-lactâmicos (ASHBY et al., 1994).

As bombas de efluxo também desempenham ação na resistência da alga aos antimicrobianos. Permitem que os microrganismos bombeiem para fora da célula toxinas e antimicrobianos presentes no meio intracelular. Bactérias planctônicas também apresentam genes para expressão das bombas de efluxo embora, no biofilme, esses genes são expressos em excesso, contribuindo para o aumento da resistência (RABIN et al., 2015).

Na mastite, os microrganismos podem formar biofilme em varios substratos, encontrados em equipamentos de ordenha, tanques de refrigeração (MARCHAND et al., 2012) e até mesmo no tecido mamário (GOMES; SAAVEDRA; HENRIQUES, 2016), o qual representa o principal mecanismo de sobrevivência dos microrganismos no interior da glândula mamária Dessa forma, a capacidade de formar biofilmes resulta na diminuição da efetividade dos antimicrobianos e, consequentemente, dificulta o tratamento de infecções persistentes e a redução do risco de transmissão (MELCHIOR; VAARKAMP; FINK-GREMMELS, 2006; GOMES; SAAVEDRA; HENRIQUES, 2016).

Dentre as espécies de microrganismos causadores de mastite que possuem elevada capacidade de formação de biofilme, destacam-se: *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae* (SCHÖNBORN et al., 2017); *Streptococcus agalactiae, Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae* (KACZOREK et al., 2017); *Staphylococcus aureus* (NOTCOVICH et al., 2018) e espécies de *Sthaphylococcus* não-*aureus*.

Biofilmes são frequentemente associados a infecções crônicas, e portanto, desempenhem papel importante em mastites causadas por *Prototheca* spp. Entretanto, poucos estudos comprovaram que isolados de *Prototheca* spp. oriundos de casos de mastite possuem a capacidade de formação de biofilme (GONÇALVES et al., 2015; KWIECINSKI, 2015;

MORANDI et al., 2016). Certamente, esse fator de virulência confere vantagens para *Prototheca* spp. em seu ambiente natural (PORE et al., 1983) bem como durante a infecção intramamária (KWIECINSKI, 2015).

3.5 ANTISSÉPTICOS E DESINFETANTES

O uso de antissépticos e desinfetantes eficazes para manter a higiene no ambiente e dos equipamentos de ordenha são de fundamental importância para a prevenção e controle da mastite bovina (SKOWRON et al., 2019). A imersão dos tetos em soluções contendo cloro, clorexidina ou iodo antes e após a ordenha objetiva diminuir a exposição dos tetos aos microrganismos patogênicos, tanto de origem ambiental quanto de origem contagiosa (RIBEIRO et al., 2016).

Os desinfetantes têm por objetivo a eliminação dos microrganismos de superfícies inanimadas, já os antissépticos atuam sobre superfícies vivas. De forma geral, o modo desses antimicrobianos está ligado ao bloqueio do desenvolvimento dos microrganismos. Dessa forma, os antissépticos podem atuar na inibição da multiplicação, bem como na desnaturação de proteínas e enzimas presentes na estrutura celular. Já os desinfetantes, podem atuar de forma semelhante que os antissépticos, entretanto, podem inativar formas vegetativas dos microrganismos (MCDONNELL; RUSSELL, 1999).

Dentre os antissépticos comumente utilizados para desinfecção de tetos, podemos destacar clorexidina, iodo e hipoclorito de sódio. A clorexidina é um composto pertencente ao grupo das biguanidas, que apresenta elevada ação antimicrobiana com efeito prolongado. O principal alvo da clorexidina é o citoplasma do microrganismo (MCDONNELL; RUSSELL, 1999). Apesar do grande espectro de ação, sua efetividade é dependente do pH e diminui na presença de matéria orgânica (MCDONNELL; RUSSELL, 1999). No Brasil, a clorexidina é utilizada na desinfecção antes e após a ordenha, em concentrações a partir de 0,3% (SANTOS; FONSECA, 2019). Melville et al. (2003) demonstraram que isolados de *P. zopfii* apresentaram sensibilidade a clorexidina em concentração de 0,01%. Após o contato com a clorexidina, isolados apresentaram elevada degradação das organelas presentes no citoplasma (MELVILLE et al., 2003).

Devido à baixa citotoxicidade e a elevada capacidade antimicrobiana, iodopovidona (iodo-pvp) pode ser uma alternativa para a desinfecção dos tetos no ambiente de ordenha (ZHANG et al., 2021). O iodo-pvp pertencente ao grupo dos iodóforos, complexo formado por iodo e um agente carreador solubilizante, a polivinilpirrolidona, que atua como um reservatório de iodo ativo (MCDONNELL; RUSSELL, 1999). Dessa forma, após a diluição em solução

aquosa, os teores de iodo livre crescem a medida que são liberados do complexo iodo-pvp (LEPELLETIER et al., 2020). O iodo-pvp apresenta elevado espectro de ação contra microrganismos Gram-positivos, Gram-negativos, fungos e protozoários. Esta elevada capacidade antimicrobiana está relacionada com o modo de ação, que consiste na interiorização celular seguido de oxidação de proteínas, nucleotídeos e ácidos graxos importantes para a manutenção celular (LEPELLETIER et al., 2020).

O hipoclorito de sódio (NaCLO) é um dos antimicrobianos mais utilizados para a desinfecção antes e após a ordenha em rebanhos leiteiros. Essa ampla utilização reflete a facilidade de acesso aliado ao baixo custo (TOLEDO BACH et al., 2019). Em um ambiente aquoso, o NaCLO da origem a Na^+ e CLO^-, precursor de HCLO (MCDONNELL; RUSSELL, 1999). A concentração recomendada para NaCLO é de 2%, contudo, resultados satisfatórios podem ser obtidos ao utilizar cloro 0,5% (SANTOS; FONSECA, 2019). A capacidade antimicrobiana do NaCLO pode estar relacionado a diferentes mecanismos de ação, desde quebra da parede celular, até na inibição de enzimas de essenciais e danos ao DNA (FUKUZAKI, 2006).

Ainda em relação ao grupo dos clorados, o dicloroisocianurato de sódio (NaDCC) é bastante utilizado para a desinfecção de equipamentos e utilização na indústria de alimentos (CHAN et al., 2020). Assim como NaCLO, o NaDCC tem como princípio ativo a formação de ácido hipocloroso (HCLO). Contudo, no caso do NaDCC, a formação de HCLO é mediada por moléculas de cianurato. Dessa forma, parte residual ainda permanece ligado ao NaDCC, o que permite manter as elevadas concentrações de HCLO e ser menos susceptível a inativação por matéria orgânica (MCDONNELL; RUSSELL, 1999; CHAN et al., 2020). Assim como no NaCLO, após a liberação, o HCLO atua na degradação da parede celular do microrganismo (KURIAN; BOLLA; DAMARAJU, 2012). NaDCC em concentrações ≥500 µg/ml foi eficaz para o controle de *S. aureus* isolados de masitte (LEITE et al., 2021). Não há relatos do uso de NaDCC para controle de *Prototheca* spp.

3.6 POLIHEXAMETILENO BIGUANIDA

Polihexametileno biguanida (PHMB) é um polímero sintético catiônico que possui efeito antimicrobiano (CHINDERA et al., 2016; KAMARUZZAMAN et al., 2018), amplamente utilizado como antisséptico e desinfetante (FJELD; LINGAAS, 2016; KAMARUZZAMAN et al., 2017). O PHMB é constituído por repetidos grupos de hexametileno hidrofóbicos intercalados por segmentos de biguanida hidrofílica, resultando em

uma estrutura catiônica e anfipática (CHINDERA et al., 2016; FJELD; LINGAAS, 2016; KAMARUZZAMAN et al., 2018). A estrutura deste composto é semelhante a peptídeos antimicrobianos (PAMs) produzidos por células como queratócitos e neutrófilos. Estudos demonstram que a PHMB adentra as células bacterianas de maneira semelhante aos PAMs (BUTCHER, 2012; KRAMER et al., 2019).

O PHMB é utilizado há mais de 60 anos em grande variedade de aplicações, como desinfetantes de piscinas, conservantes em cosméticos, soluções para lentes de contato e no uso em bandagens para tratamento de feridas, com comprovada eficácia na redução da carga dos microrganismos causadores da infecção (MOORE; GRAY, 2007; GRAY et al., 2010; BUTCHER, 2012; WESSELS; INGMER, 2013).

Devido à interação com fosfolipídios, o PHMB possui amplo espectro de ação, que inclui fungos (MESSICK et al., 1999), protozoários (FIRDESSA et al., 2015), e bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, que possuem capacidade de produção de biofilme e esporulação (HÜBNER; KRAMER, 2010; KAMARUZZAMAN et al., 2017). Foi descrito que o PHMB possui elevada eficácia contra patógenos intracelulares, como por exemplo, cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (KAMARUZZAMAN; FIRDESSA; GOOD, 2016; KAMARUZZAMAN et al., 2018).

As atividades antimicrobianas do PHMB incluem diferentes mecanismos, tais como a atuação na membrana do patógeno, levando ao aumento da fluidez, permeabilidade e perda de integridade celular (HÜBNER; KRAMER, 2010), sendo que, o dano à membrana citoplasmática provocado pelo PHMB é inespecífico, imediato e irreversível (WESSELS; INGMER, 2013). Um dos modos de ação da PHMB consiste na interação dos grupos biguanida presentes no polímero, com lipopolissacarídeos e peptidoglicanos presentes na parede celular bacteriana. Essa interação faz com que ocorra o deslocamento do cátion Ca^{2+}, provocando desestabilização da membrana e consequentemente, extravasamento do conteúdo celular. O grupo hexametileno também atua na desestabilização da membrana celular, por meio da interação com os fosfolipídios, o que causa separação de fases e perturbação da distribuição aleatória dos lipídios, além de desestabilização da bicamada fosfolipídica (WESSELS; INGMER, 2013; KAMARUZZAMAN et al., 2017).

Recentemente, foi descrito segundo modo de ação da PHMB, sobre o material genético de microrganismos. O PHMB possui capacidade de adentrar as células bacterianas e condensar seletivamente os cromossomos por meio de ligação direta com o DNA (CHINDERA et al., 2016). Esta afinidade pelo DNA apresentada pela PHMB pode ser explicada pela interação

entre a carga negativa das moléculas de fosfato, presentes no DNA, e a carga catiônica do PHMB (FIRDESSA et al., 2015).

Estudos descreveram a superioridade do PHMB em relação a outros antimicrobianos de uso clínico. Foi relatado que o PHMB possui eficácia antimicrobiana maior que a clorexidina para o tratamento de feridas (HÜBNER; KRAMER, 2010). O PHMB apresentou maior atividade antibacteriana e baixa citotoxicidade quando comparado a outros antimicrobianos, como clorexidina, iodo povidona, triclosan, prata e sulfadiazina (MÜLLER; KRAMER, 2008).

No quesito de citotoxicidade, o PHMB não interfere em proteínas que compõem as membranas celulares dos animais não afetando, dessa forma, a integridade das células animais (BUTCHER, 2012). É praticamente atóxico, visto que só apresentou efeitos tóxicos em concentrações acima de 5 g/kg quando administrado oralmente em testes com roedores (HÜBNER; KRAMER, 2010). Kamaruzzaman et al. (2016) relataram que o índice de toxicidade celular do PHMB foi de 19,7 mg/l, embora em concentrações inferiores a 4 mg/L foi capaz de inativar todos *S. aureus* no interior de queratócitos. Outro estudo encontrou índices de toxicidade celular do PHMB de 21 mg/l. Neste caso, o PHMB em concentrações máximas de 15 mg/l inativou todos os isolados de *S. aureus* (KAMARUZZAMAN et al., 2017).

Na mastite, foi demonstrado que o PHMB possui eficácia contra isolados de *S. aureus* no interior de células Mac-T. Neste estudo, a atividade antimicrobiana do PHMB foi mais eficiente quando comparada a atividade da enrofloxacina (KAMARUZZAMAN et al., 2017). Adicionalmente, foi avaliada a eficácia do PHMB e enrofloxacina, para a quebra de biofilmes (grande causa de resistência antimicrobiana na mastite). O PHMB apresentou maior eficiência na quebra dos biofilmes, sendo responsável pela redução de 28 a 37% da massa total do biofilme. Esta maior eficácia pode ter ocorrido devido à forte atração do PHMB às forças negativas do DNA (FIRDESSA et al., 2015), que no biofilme exercem importante função de adesão ao substrato (FLEMMING et al., 2016).

3.7 CAPACIDADE DE RESISTÊNCIA DE *PROTOTHECA* SPP. AOS ANTIMICROBIANOS

Ainda não foram descritos protocolos de tratamento eficazes contra mastite causada por *Prototheca* spp. Sendo assim, a avaliação *in vivo* e *in vitro* de antimicrobianos frente à *Prototheca* spp. objetiva identificar compostos antimicrobianos com potencial de uso para o tratamento ou para a desinfecção dos equipamentos de ordenha.

O uso de antissépticos e desinfetantes, principalmente iodo, clorexidina e hipoclorito de sódio foi previamente avaliado em estudos *in vitro* contra isolados de *Prototheca* spp. (MELVILLE et al., 2002; SALERNO et al., 2010; SOBUKAWA et al., 2011; KRUKOWSKI et al., 2013; GONÇALVES et al., 2015). Recentemente, foi proposto que a guanidina, desinfetante similar a PHMB, pode ser usada para a limpeza dos equipamentos de ordenha ou uso em soluções para desinfecção antes e após a ordenha. O efeito algicida em isolados de *P. zopfii* foi observado em concentrações entre 0,001% a 0,035% (ALVES et al., 2017).

As espécies de *Prototheca* geralmente não respondem ao tratamento realizado com antimicrobianos. Foi observado que isolados de *Prototheca* spp. apresentam resistência à penicilina, ampicilina, amoxicilina e neomicina. Contudo, estudos *in vitro* relataram que antimicrobianos como gentamicina, estreptomicina e amicacina apresentaram eficácia na inibição da microalga (LOPES et al., 2008; MORANDI et al., 2016; SHAHID et al., 2016)

A eficácia de antifúngicos contra *Prototheca* spp. também foi avaliada, sendo observado que estes microrganismos são resistentes ao fluconazol, itraconazol, clotrimazol, econazol e miconazol. No entanto, posaconazol e cetoconazol mostraram efeito algicida *in vitro* (LOPES et al., 2008; TORTORANO et al., 2008; JAGIELSKI et al., 2012). Estudos sugerem que nistatina e anfotericina B possuem eficácia contra isolados de *P. zopfii* e *P. wickerhamii* (BUZZINI et al., 2004; MARQUES et al., 2006; LOPES et al., 2008; MORANDI et al., 2016). A eficácia de anfotericina B foi demonstrada por Jagielski et al., (2012), evidenciando que este composto apresenta maior eficiência contra isolados de *P. ciferri* do que contra isolados de *P. bovis*.

Com relação aos compostos naturais, óleos essenciais (OE) extraídos de *Melaleuca alternifolia* e *Citrus bergamia* foram eficientes *in vitro* contra isolados de *Prototheca* spp. (TORTORANO et al., 2008), assim como o óleos essenciais de *Origanum majerana*, *Origanum vulgare* e *Thymus vulgaris* (GRZESIAK et al., 2018). *P. zopfii* foi mais sensível em comparação a *P. blaschkeae* quando submetida a ação do OE de *Citrus paradis* (NARDONI et al., 2018). O extrato etanóico de *Aronia prunifolia* também exibiu atividade algicída contra isolados *Prototheca* (SUVAJDŽIĆ et al., 2017).

Foi relatado que peptídeos antimicrobianos como BMAP-28, Bac5 e o Peptídeo antimicrobiano mieloide bovino, quando em concentrações mínimas entre 0,5 μM a 4 μM inibiram isolados de *Prototheca* spp., dos quais BMAP-28 mostrou ser o mais eficiente ao inibir 80% dos isolados de *P. wickerhamii* em apenas 10 minutos (TOMASINSIG et al., 2012).

Recentemente, foi avaliado a eficácia de nanopartículas de prata contra isolados de *Prototheca* spp. As nanopartículas apresentaram elevada atividade algicida em concentrações entre 1 a 4 mg/L, bem abaixo das concentrações em que a toxicidade nas células epiteliais podiam ser observadas, mostrando ser potencial componente para o tratamento de infecções causadas por *Prototheca* spp. (JAGIELSKI et al., 2018a).

3.8 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE *PROTOTHECA* SPP.

Classicamente, a identificação de *Prototheca* spp. é baseada em cultura microbiológica associada à observação de morfologia colonial, micromorfologia e atividade bioquímica (TODD et al., 2018; JAGIELSKI et al., 2019a). Quando inoculado em ágar-sangue, é possível observar a presença de colônias após 48-72 horas de incubação, com coloração branca ou acinzentada, medindo cerca de 1-2 mm de diâmetro, com superfície opaca ou granular, sem a presença de hemólise (MILANOV et al., 2016; TODD et al., 2018). Em ágar Sabouraud, o isolamento pode ser visível após 24 horas de incubação. As colônias são brancas ou amareladas, com aparência cremosa, e se assemelham à de leveduras (JAGIELSKI; LAGNEAU, 2007).

A respeito do micromorfologia, *P. wickerhamii* é caracterizada por possuir células esféricas, medindo de 2,5 a 13 µm de diâmetro, com arranjo simétrico dos endósporos. A espécie *P. bovis* (*P. zopfii* gen. 2) possui células de formato globoso a elipsoidal, medindo cerca de 9 a 15 µm de diâmetro, com arranjo assimétrico dos endósporos (JAGIELSKI; LAGNEAU, 2007; JAGIELSKI et al., 2019a). Já as células de *P. blaschkeae* apresentam cerca de 15 µm de diâmetro, com formato ovoide a globoso (ROESLER et al., 2006).

O método mais usado para diagnosticar isolados de *Prototheca* spp. oriundos de casos de mastite ainda é a cultura microbiológica convencional. Este microrganismo é isolado mais lentamente que a grande maioria dos outros agentes etiológicos da mastite, e culturas microbiológicas com 24 horas de incubação podem não identificar a presença do agente (TODD et al., 2018).

Os métodos bioquímicos para identificação baseiam-se principalmente na capacidade de metabolização de fontes de carbono, como açúcares e álcoois (TODD et al., 2018; KANO, 2019). *P. blaschkeae* é capaz de utilizar glicose e galactose mas não sacarose e trealose (ROESLER et al., 2006). *P. wickerhamii* é capaz de utilziar glicose, galactose e trealose mas não sacarose. A espécie *P. bovis* possui a capacidade de assimilação de glicose, mas não é capaz de utilizar galactose, trealose e sacarose (JAGIELSKI; LAGNEAU, 2007; JAGIELSKI et al., 2019a). Estes testes bioquímicos são trabalhosos e demandam experiência, culminando em

resultados frequentemente ambíguos e pouco reproduzíveis (JAGIELSKI et al., 2018b). Ademais, a principal desvantagem deste método de identificação é o tempo de duração de mais de três dias (MILANOV et al., 2016).

Atualmente, métodos moleculares baseados em análises de DNA vêm sendo empregados para a identificação mais rápida e precisa de *Prototheca* spp. (JAGIELSKI et al., 2018b). Os métodos mais comuns para a tipagem dos isolados incluem a PCR ou a técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) com alvo no gene 18S rRNA, efetivo para a diferenciação de isolados de *Prototheca* spp. oriundos de mastite bovina (GAO et al., 2012). Além de PCR, o gene 18s-rDNA pode ser alvo de sequenciamento na fração SSU (small-subunit) ou fração LSU (large-subunit) (MARQUES et al., 2015).

Recentemente, Jagielski et al. (2018a) propuseram novo método para a identificação de isolados de *Prototheca* causadores de doenças em humanos e animais. Este método utilizou o gene mitocondrial *cytb* como novo marcador molecular. Com o uso do *cytb* foi possível a reclassificação e a proposição de novas espécies de *Prototheca* spp. (JAGIELSKI et al., 2019a).

Apesar da rapidez no diagnóstico, métodos moleculares ainda apresentam elevado custo, o que torna o uso pouco frequente na rotina diagnóstica. Por outro lado, a espectrometria de massas MALDI-TOF é uma alternativa de alta acurácia e menor custo de consumíveis, que tem sido utilizada com sucesso para a identificação rápida de bactérias causadoras de mastite. Neste método, a identificação da espécie do microrganismo ocorre pela correspondência entre o espectro de proteínas ribossomais do microrganismo alvo e uma biblioteca contendo espectros de referência de vários microrganismos presentes no software (FOURNIER et al., 2013; TODD et al., 2018).

Estudos prévios utilizaram a abordagem da proteômica para identificação de microalgas (AHRHOLDT et al., 2012; BARBANO et al., 2015; MASUDA et al., 2016). Por meio da MALDI-TOF MS, Ahrhold et al. (2012) diferenciaram de forma rápida e precisa, espécies e genótipos de *Prototheca* spp. oriundos de infecções em cães, humanos e bovinos. Recentemente, essa técnica foi utilizada para identificação de isolados provenientes de amostras de leite de vacas com mastite (PARK et al., 2019).

Apesar da rapidez e assertividade, a MALDI-TOF ainda apresenta limitações para a identificação de *Prototheca* spp. Embora haja grande variedade de espectros de microrganismos incluídos na biblioteca do software de identificação (Biotyper, Bruker Daltonics), até o momento, o único espectro de referência de *Prototheca* spp. inserido no banco de dados é de *P. wickerhamii* (TODD et al., 2018). Logo, para o uso da técnica de MALDI-TOF para

identificação das demais espécies de *Prototheca* causadoras de mastite (*P. bovis* e *P. blaschkeae*) é necessário a inclusão de novos espectros de referência no banco de dados do software.

Outro ponto importante, é que devido a técnica de MALDI-TOF MS ter sido desenvolvida incialmente para a identificação de bactérias, o processo de extração de proteínas ribossomais necessita de otimização para uso na identificação de microalgas. A maior dificuldade de extração de proteínas ribossomais de *Prototheca* spp. é justificada pela diferença entre a composição da parede celular das microalgas quando comparado com as bactérias (VON BERGEN et al., 2009).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COMITÊ DE ÉTICA

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (nº 7769040320).

4.2 OBTENÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS E CEPAS DE REFERÊNCIA

Um total de 87 isolados de *Prototheca* spp. provenientes de amostras de leite submetidas à identificação microbiológica no Laboratório Qualileite FMVZ – USP foram selecionados para este estudo com base em amostragem não probabilística (e.g., conveniência).

Para o isolamento primário, foi seguido o protocolo proposto pelo NMC (2017). Brevemente, com o uso de alça de platina calibrada, 10 µl de leite foram estriados em placas de ágar sangue contendo 5% de sangue bovino. As placas foram incubadas durante 48 horas a 37ºC em aerobiose, com leituras após 24 e 48 horas para observações de morfologia colonial, e micromorfologia. Os isolados foram identificados pelos testes de catalase, hidróxido de potássio e coloração de Gram. Colônias que apresentaram tonalidade branco-acinzentadas, aspecto opaco, diâmetro de 1 a 2 milímetros, bordas irregulares com elevação central e células ovais foram identificadas de forma presuntiva como *Prototheca* spp. Os isolados foram mantidos refrigerados (-4ºC) em meio Sabouraud dextrose (Kasvi, Brasil) para as posteriores análises.

Cepas de referência das espécies *P. ciferrii* (anteriormente *P. zopfii* gen. 1) – RZI-3; *P. bovis* (anteriormente *P. zopfii* gen. 2) – LZ-5; e *P. blaschkeae* – RZIII-3 foram utilizadas para

controle positivo das análises de MALDI-TOF MS, PCR, biofilme e determinação do perfil de sensibilidade aos desinfetantes.

4.3 IDENTIFICAÇÃO POR MALDI-TOF MS

4.3.1 Protocolo de extração de proteínas ribossomais

O procedimento de extração de proteínas ribossomais e identificação dos isolados de *Prototheca* spp. por MALDI-TOF MS foi realizado conforme descrito por Fidelis et al. (2021). De forma resumida, os isolados foram incubados em ágar Sabouraud a 37º por 24 horas. Três colônias foram dissolvidas em 300 µl de água Milli-Q autoclavada seguido de adição de 900 µl de etanol 100%, e vortexização por 1 min. Após incubação durante 10 min à temperatura ambiente, a solução foi submetida a dois ciclos de centrifugação (Mikro 200r, Hettich, Alemanha) por 2 min, em velocidade de 13709 g. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado por meio da inversão do tubo, seguido de secagem em temperatura ambiente. O pellet resultante foi submetido à dois ciclos de lavagem, composto por ressuspensão em 1 ml de água Milli-Q autoclavada, seguido de centrifugação a 13709 g por 2 min, com descarte do sobrenadante. O pellet foi ressuspendido em 50µl de solução de ácido fórmico a 70%, seguido de homogeneização em vórtex por 1 min e posterior incubação por 10 min em temperatura ambiente. Logo em seguida, foi adicionado 50 µl de acetonitrila 100%, seguido de uma etapa de homogeneização de 1 min, e descanso por 5 min. A solução contendo os isolados foi novamente centrifugada a 13709 g por 5 min, e o sobrenadante foi transferido para tubos eppendorf contendo 30 µg de *beads* de zircônia.

As amostras foram submetidas à ação de disruptor celular (Loccus, Cotia, Brasil) por 5 ciclos de 1 min, a 4000 RPM. Após nova etapa de centrifugação a 13709 g por 5 min, 1 µl de cada isolado foi pipetado em triplicata na placa de aço (MSP 96 Target polished steel, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), seguido de adição de 1µl de solução matriz composta por ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA; Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), e posterior secagem em temperatura ambiente.

4.3.2 Obtenção dos espectros

A obtenção dos espectros de massa de isolados de *Prototheca* spp. foi feita de acordo com o recomendado pelo fabricante (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Para a calibração do MALDI-TOF MS foi utilizado solução de proteína padrão (Bacterial Test Standard, BTS;

Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). A solução padrão foi aplicada na placa de aço (MSP 96 Target polished steel, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) juntamente com a adição de controle negativo formado por ácido fórmico e matriz.

A obtenção dos espectros foi realizada no equipamento Microflex LT/SH (Bruker Daltonik, Bremen, Alemanha) via função manual pelo software FlexControl 3.4 (Bruker Daltonik, Bremen, Alemanha). A faixa de espectros utilizadas para a análise foi entre 2.000 a 20.000 m/z. Os seguintes parâmetros foram configurados no equipamento: fonte de íons 1 ajustada para 20,0 kV; fonte de íons 2 ajustada para 18,2 kV e lente ajustada para 6,0 kV.

Para a geração dos espectros foram incididos duzentos e quarenta disparos a laser para cada isolado. Dessa forma, o software FlexControl 3.4 (Bruker Daltonik, Bremen, Alemanha) gerou os espectros através do conjunto de picos de proteínas ribossomais. A seguir os espectros dos isolados *Prototheca* spp. foram comparados aos espectros de referência com o uso do MALDI Biotyper 4.1.70 (Bruker Daltonik, Bremen, Alemanha).

4.3.3 Construção da biblioteca contendo os espectros de referência

A construção de biblioteca de espectros de referência de *Prototheca* spp. foi realizada seguindo as recomendações do fabricante (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Para isso, três cepas de referência de espécies de *Prototheca* spp. (*P. ciferrii* - RZI-3; *P. bovis* – LZ-5; e *P. blaschkeae* – RZIII-3) foram submetidas à extração de proteínas ribossomais, conforme descrito anteriormente. O extrato das proteínas ribossomais de cada isolado foi aplicado 30 vezes na placa de aço, seguido de 1µl de solução matriz HCCA para obtenção dos espectros, que foram capturados pelo software FlexControl 3.4 (Bruker Daltonik, Bremen, Alemanha) no modo automático, seguido da correção da linha de base (algoritmo TopHat) e suavização dos picos (algoritmo Savitzky Golay) no software FlexAnalisys (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha).

Os espectros foram submetidos a uma etapa de avaliação de qualidade. Primeiramente foram deletados os espectros que apresentavam apenas ruídos de linha de base e os espectros que continham anormalidades, como picos "*outliers*": picos de massa que apresentaram uma diferença de 500 ppm em relação a posição média dos demais foram excluídos. Previamente a criação do MSP, os espectros de massa foram correlacionados com as entradas já existentes na biblioteca local. A fim de avaliar a similaridade entre os espectros de uma mesma cepa, e entre cepas diferentes, foi gerado uma matriz de correlação, semelhante ao método utilizado por

Murugaiyan et al. (2018). Em seguida, foram criados os MSPs (Main Spectral Library) de cada cepa de referência e inseridos na biblioteca local do software Biotyper.

4.3.4 Identificação de *Prototheca* spp. por MALDI-TOF MS

Após a criação da biblioteca local, isolados de *Prototheca* spp. de casos de mastite (n = 87) foram submetidos à identificação microbiológica por MALDI-TOF MS. Para isso, os isolados foram reinoculados em ágar Sabouraud e incubados por 48 horas a 37ºC. A seguir, os isolados foram submetidos ao protocolo de extração de proteínas ribossomais e captação dos espectros previamente descritos. A identificação dos isolados foi realizada em triplicata pelo software MALDI Biotyper 4.1.70 (Bruker Daltonik, Bremen, Alemanha), contendo os espectros de referência previamente inseridos na biblioteca local. Escores ≥ 1,7 foram considerados confiáveis para identificação de gênero e escores ≥ 2,0 foram considerados confiáveis para identificação de gênero e espécie.

4.4 IDENTIFICAÇÃO DE *PROTOTHECA* SPP. POR PCR

4.4.1 Extração do DNA

Para a avaliação dos resultados obtidos por MALDI-TOF MS, foi utilizado como método referência a identificação por meio de PCR do gene 18S rDNA. A extração do DNA foi realizada pelo kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Wisconsin, Estados Unidos) seguindo as recomendações do fabricante. Previamente, os isolados foram submetidos a uma etapa de disrupção celular por *beads* de zircônia. Para isso, 3 colônias frescas de cada isolado foram transferidas para tubos eppendorf de 1,5 ml contendo 3 *beads* de zircônia e 1 ml de água Milli-Q autoclavada. A solução foi submetida a disrupção celular por 5 ciclos de 1 min a 4000 RPM em um disruptor celular (Loccus, Cotia, Brasil).

A solução foi transferida para um novo tubo eppendorf de 1,5 ml e submetida à etapa de centrifugação a 16.089 g por 2 min, seguido de descarte do sobrenadante. O pellet resultante foi ressuspendido em 250 µl de solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA; Accuris QuickSilver, Edison, Estados Unidos) seguido de homogeneização em vórtex por 1 min. Em seguida, foram adicionados 50 µl de lisozima (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos) e homogeneizado 5 vezes com o auxílio da pipeta. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 60 min para a quebra da parede celular, e então submetidas a nova etapa de centrifugação a 16.089 g por 2 min, seguido de descarte do sobrenadante. Em seguida, foi adicionado 300 µl de Nuclei Lysis Solution seguido de incubação a 80ºC por 5 min. Posteriormente, foi adicionado 100 µl de Protein Precipitation Solution e homogeneizado com auxílio de vórtex por 20 segundos. As amostras foram incubadas em gelo por um período de 5 min.

Após a etapa de incubação em gelo, as amostras foram submetidas uma etapa de centrifugação a 16.089 g por 3 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo eppendorf contendo 300 µl de álcool isopropílico 100%. Os tubos foram homogeneizados por inversão até a formação de uma massa visível. Em seguida, as amostras foram submetidas a uma etapa de centrifugação a 16.089 g por 5 min a 4ºC. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram mantidos invertidos em papel absorvente por 15 min. Em seguida, foram adicionados 300 µl de álcool etílico 70% seguido de homogeneização por inversão do tubo para a lavagem do *pellet*, seguido de uma nova etapa de centrifugação. O álcool etílico foi removido

e os tubos foram mantidos invertidos em papel absorvente por 15 min em temperatura ambiente. Após a secagem o *pellet* foi ressuspendido em 50 µl de DNA Rehydration Solution previamente aquecido a 37ºC. A seguir as amostras foram incubadas a 65ºC por 60 min. Periodicamente a solução foi homogeneizada por inversão do tubo. O DNA extraído foi mantido congelado (-8ºC) para as posteriores análises.

4.4.2 Purificação do DNA

As amostras de DNA dos isolados de *Prototheca* spp. obtidos após a etapa de extração foram submetidos a uma etapa de purificação, a fim de retirar quaisquer resquícios de impureza presentes na amostra. Para isso, foi utilizado o kit Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Indianapolis, Estados Unidos) seguindo as orientações do fabricante. Brevemente, 15 µl do DNA alvo e 27 µl do reagente Agencourt AMPure XP foram adicionados em tubo eppendorf de 1,5 ml. A solução foi homogeneizada por 10 vezes, com auxílio de pipeta. Em seguida, a solução foi mantida em temperatura ambiente por 5 min, e em sequência submetida a rack magnética por 2 min. Após a aglomeração das pérolas magnéticas, o sobrenadante foi descartado. O *pellet* resultante foi submetido a duas etapas de lavagem que consistiram na adição e retirada de 200 µl de álcool etílico 80%, seguido de secagem em temperatura ambiente por 10 min. Após o período de secagem o *pellet* foi ressuspendido em 30 µl de água nuclease-free e incubado em temperatura ambiente por 2 min. A solução foi submetida novamente a descanso na rack magnética por 2 min. Após a aglomeração das esferas magnéticas o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. O DNA purificado foi conservado congelado a uma temperatura de -8ºC para as posteriores análises.

4.4.3 Reação em cadeia de polimerase (PCR)

A realização da PCR foi realizada conforme descrito em Ahrholdt et al (2012) e Jagielsky et al. (2011). Os *primers* específicos utilizados foram: Proto 18-4/f (5′-GACATGGCGAGGATTGACAGA-3′) e PZ GTI/r (5′-GCCAAGGCCCCCCGAAG-3′) para identificação de *P. ciferri* (comprimento final de amplificação de 150 pb); Proto 18-4/f e PZGTII/r (5'-GTCGGCGGGGCAAAAGC-3') para identificação de *P. bovis* (comprimento final de amplificação de 165 pb); IK/f (5'-CAGGGTTCGATTCCGGAGAG-3') e GTIII/r (5'-GTTGGCCCGGCATCGCT-3') para identificação de *P. blaschkeae* (comprimento final de amplificação de 126 pb). Para o controle da amplificação interna para *P. ciferri e P. bovis*, foi utilizado o primer Proto 18-4/f e 18-4/r (5′-AGCACACCCAATCGGTAGGA-3′) com comprimento final de amplificação de 450 pb. Já para *P. blaschkeae* o controle de amplificação

interna foi formado pelo primer IK/f e IK/r (5′-GAATTACCGCGGCTGCTGG-3′) com comprimento final de amplificação de 213 pb.

Todas as reações de PCR foram realizadas com volume final de 25 µl contendo: 12,5 µl de GoTaq Green Master Mix 2X (Promega, Wisconsin, Estados Unidos) 0,5 µl de cada primer (10 µM); 6 µl de água nuclease-free; e 5 µl do DNA alvo (10 ng). A amplificação do DNA foi realizada em termociclador (Maxigen II, Axygen, Estados Unidos). As reações de PCR para *P. bovis* e *P. ciferri* foram realizadas com as seguintes configurações: etapa inicial de desnaturação a 95°C por 5 min; 37 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 58°C e 40 segundos a 72°C; decorrido de uma extensão final a 72°C durante 4 min. A reação de PCR para *P. blaschkeae* teve a seguinte configuração: etapa inicial de desnaturação a 95°C durante 5 min; 37 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 63°C e 40 segundos a 72°C; seguido de uma extensão final de 72°C durante 4 min. Como controle positivo da reação de PCR foi utilizado o DNA obtido das cepas genotipadas de *P. ciferri*, *P. bovis e P. blaschkeae*. Para controle negativo da reação foi utilizado água nuclease-free.

4.4.4 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos da reação de PCR foram visualizados por meio de eletroforese em gel de agarose. Inicialmente, 0,3 µl de GelRed (Biotium, Fremont, Estados Unidos) foram adicionados em 5 µl do produto amplificado, seguido de homogeneização com auxílio de pipeta. Em seguida, a solução foi aplicada em gel de agarose a 1% (Bio Basic, Markham, Canadá) submerso em solução tampão composta por 1X Tris-Borato EDTA (TBE; Accuris QuickSilver, Edison, Estados Unidos). As imagens do gel foram obtidas sob luz ultravioleta, com uso de foto documentador (Syngene, Cambridge, Reino Unido). Para avaliar o tamanho específico das bandas de DNA foi utilizado um marcador molecular de 100bp (Promega, Wisconsin, Estados Unidos).

4.5 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME

A capacidade de formação de biofilme de isolados de *Prototheca* spp. foi determinada de acordo com o protocolo utilizado por Gonçalves et al., (2015) com modificações. Os isolados foram previamente inoculados em placas contendo meio Sabouraud e incubados a 37ºC por 48 horas. Decorrido o tempo de incubação, cada isolado foi ressuspendido em Trypticase Soy Broth (TSB; Kasvi, São José dos Pinhais, Brasil) suplementado com 0,6% de extrato de levedura (Kasvi, São José dos Pinhais, Brasil) e incubado em estufa bacteriológica a 37ºC por 48 horas. A seguir os isolados foram padronizados a 0,5 na escala de McFarland (10^6 ufc/ml),

e alíquotas de 200 µL de cada isolado foram transferidas em triplicata para microplacas estéreis de polietileno com 96 poços de fundo chato, seguido de incubação em estufa bacteriológica, à 37°C por 24 horas sem agitação. O controle de esterilidade foi feito em triplicata com poços contendo 200 µL de caldo TSB suplementado com 0,6% de extrato de levedura. Para controle positivo foi utilizado a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. A capacidade de formação de biofilme das cepas de referência de *Prototheca ciferrii* (RZI-3), *Prototheca bovis* (LZ-5) e *Prototheca blaschkeae* (RZIII-3) também foi avaliada.

Decorrido o tempo de incubação, o meio de cultura foi aspirado com auxílio de pipeta, e as microplacas foram lavadas duas vezes com 200 µL de água MilliQ estéril. Em seguida, o biofilme foi fixado por temperatura a 60ºC por 2 horas em estufa bacteriológica. Após a etapa de fixação, foi adicionado 250 µL de cristal violeta 0,1% em cada poço da microplaca, seguido de incubação em temperatura ambiente por 15 min para a coloração do biofilme. A seguir, o cristal violeta foi totalmente removido dos poços com auxílio de uma pipeta. O biofilme foi submetido a uma nova etapa de lavagem com adição de 200 µL de água MilliQ estéril, seguido de secagem em temperatura ambiente por 1 hora. Para a ressubilização do biofilme foi adicionado 250 µL de ácido acético glacial 33%.

A produção de biofilme nas microplacas foi mensurada utilizando um leitor de ELISA em comprimento de onda de 620 nm. Os resultados foram expressos em densidade ótica (D.O). A média da densidade ótica do isolado foi comparada com a média da densidade ótica do controle negativo (DO_{CN}). Dessa forma, a capacidade de formação de biofilme foi classificada em três categorias: fraca ($DO_{CN} < DO \leq 2 \times DO_{CN}$), moderada ($2 \times DO_{CN} < DO \leq 4 \times DO_{CN}$), ou forte ($OD > 4 \times OD_{CN}$) (STEPANOVIĆ et al., 2003).

4.6 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

O perfil de resistência a antimicrobianos foi determinado pela técnica de CIM e CAM. Para isso, foi utilizado o método de microdiluição em caldo em microplacas de polietileno com 96 poços de fundo chato. Como não existem diretrizes para a realização de testes de sensibilidade a antimicrobianos de *Prototheca* spp., o método de microdiluição em caldo foi realizado com modificações, seguindo o documento M27-A4 do Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI 2017) como método de referência para o teste de suscetibilidade de leveduras. Foram utilizados cinco princípios de antimicrobianos: Iodo povidona (PVP-I; Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos), gluconato clorexidina (CHG; Polyorganic Tecnologia, São Paulo, Brasil), hipoclorito de sódio (NaCLO; Rioquímica, São José do Rio Preto, Brasil), dicloroisocianurato de sódio (NaDCC; Merck Sharp and Dohme, Nova Jersey,

Estados Unidos) e polihexametileno biguanida (PHMB; Polyorganic Tecnologia, São Paulo, Brasil).

Para a preparação das microplacas, os desinfetantes testados foram preparados em concentração 2 vezes maior que a concentração inicial a ser analisada, e então foram aplicados em duplicata na primeira coluna da microplaca, seguido de adição de Brain heart infusion (BHI; Kasvi, Brasil) para completar o volume de 200 µl em cada poço. Dessa forma, os desinfetantes foram adicionados nas seguintes concentrações: PVP-I (6400 µg/ml); NaDCC (2800 µg/ml); NaCLO (5600 µg/ml); CHG (64 µg/ml) e PHMB (64 µg/ml). Nas demais colunas da microplaca foram adicionados 100 µl de caldo BHI. Para realizar a diluição seriada dos antimicrobianos, foram transferidos 100 µl da primeira coluna para a coluna adjacente, e assim sucessivamente até a penúltima coluna da microplaca. A faixa de concentração final já com a presença do inoculo foi a seguinte: a) PVP-I: 3200 – 3,125 µg/ml; b) CHG: 32 - 0,031 µg/ml; c) NaCLO: 2800 – 2,734 µg/ml; d) NaDCC: 1400 – 1,367 µg/ml; e) PHMB: 32 - 0,031 µg/ml.

Para o preparo dos inóculos, 87 isolados previamente identificados como *Prototheca* spp. foram inoculados em caldo BHI e incubados por 48 horas a 37ºC. Em seguida, os isolados foram padronizados a 0,5 McFarland (1,0-5,0 x 10^6 ufc/ml) em solução salina estéril a 0,9% com auxílio de turbidimetro (McFarland densitometer, Biosan). Após a etapa de padronização, os isolados foram diluídos na proporção 1:50 e novamente na proporção 1: 20 em caldo BHI.

Alíquotas de 100 µl de cada isolado foram adicionadas às microplacas previamente preparadas com os antimicrobianos, resultando na proporção de 1:1 de inóculo e antimicrobiano. Dessa forma, a concentração final dos isolados em cada poço foi de 0,5–2,0 × 10^3 ufc/ml. Na última coluna da microplaca foi incluído o controle positivo de isolamento microbiano, composto de 100 µl de inóculo de *Prototheca* spp. juntamente de caldo BHI. O controle de esterilidade das microplacas foi realizado com a adição de 200 µl de TSB estéril. As microplacas foram homogeneizadas com auxílio de mesa agitadora (Quimis, Brasil) por 10 min a 200 RPM em temperatura ambiente, seguido de incubação a 37°C por 48 horas. Os valores de CIM foram determinados pela menor concentração capaz de inibir o crescimento visual do isolado na microplaca. Para cada antimicrobiano, foram determinados os valores de CIM_{50} e CIM_{90}, o qual corresponde a concentração necessária para inibir o crescimento de 50% e 90% dos isolados, respectivamente.

Para avaliação da CAM, alíquotas de 20 µl foram retiradas de poços em que não houve crescimento visível, e foram inoculadas em ágar Sabouraud seguido de incubação a 37º por 48 horas. A CAM_{50} e CAM_{90} foi determinada pela concentração mínima capaz de inativar

totalmente a população de *Prototheca* spp., a qual foi determinada pela ausência de isolamento microbiano visível em meio de cultura.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores de CIM e CAM obtidos para cada desinfetante foram comparados entre si (todos conta todos). Adicionalmente, as comparações dos valores de CIM e CAM também foram realizadas por grupos de desinfetantes (biguanidas, compostos clorados e iodóforos). Os valores de CIM e CAM foram avaliados por ANOVA pela diferença dos quadrados mínimos utilizando o PROC MIX (SAS versão 9.4; SAS Institute Inc.). As diferenças foram consideradas significantes para valores de $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS

Um total de 87 isolados de *Prototheca* spp. obtidos de casos clínicos (n = 34; 39%) e subclínicos (n = 53; 61%) de mastite, oriundos de 65 vacas de 20 rebanhos leiteiros localizados na região Sul e Sudeste do Brasil, foram avaliados neste estudo. Quanto ao tipo de amostra, 32% (n = 28) foram obtidas de amostras compostas de leite e 68% (n = 59) de amostras de leite provenientes de quartos mamários.

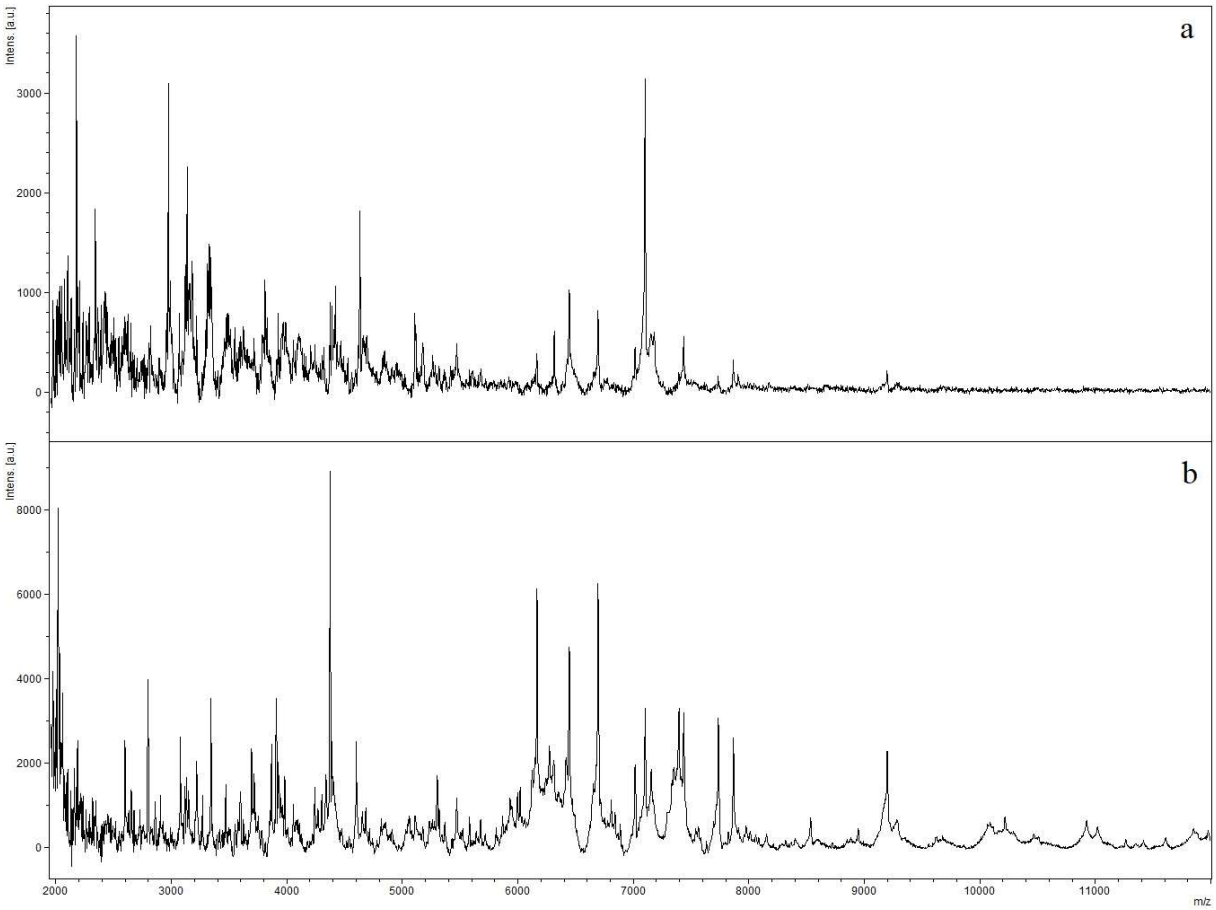
5.2 OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS RIBOSSOMAIS

O uso do protocolo convencional de extração de proteínas ribossomais por meio de ácido fórmico (AF) e acetonitrila (ACN) proposto pelo fabricante (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) não permitiu a aquisição de espectros de massa durante a análise de MALDI TOF MS. Com o uso do protocolo com ácido fórmico (AF) e acetonitrila (ACN) foram observados apenas ruídos sem caracterização de picos de massa bem definidos.

Ainda que tenha ocorrido a aquisição dos espectros de massa com o uso do protocolo de extração por AF direto em placa, devido à presença de ruídos inespecíficos e elevada linha de base, os espectros obtidos não apresentaram qualidade mínima para o prosseguimento das análises (e.g. ausência de picos de massa definidos). Ao utilizar o protocolo de extração por *beads* de zircônia em disruptor celular, associado à AF e ACN, foi possível a captação de espectros com menor presença de ruídos inespecíficos. O uso do protocolo de extração por *beads* resultou na obtenção de maior quantidade de picos de massa na faixa de 2 a 20 kDa, os

quais não foram observados com os protocolos descritos anteriormente (e.g., extração direto em placa) (Figura 1).

Figura 1- Espectros de massa de isolado de *Prototheca bovis* obtido de vaca com mastite, submetido à extração de proteínas ribossomais pelo método convencional de extração direto em placa (a) e pelo método de extração por *beads* de zircônia (b).



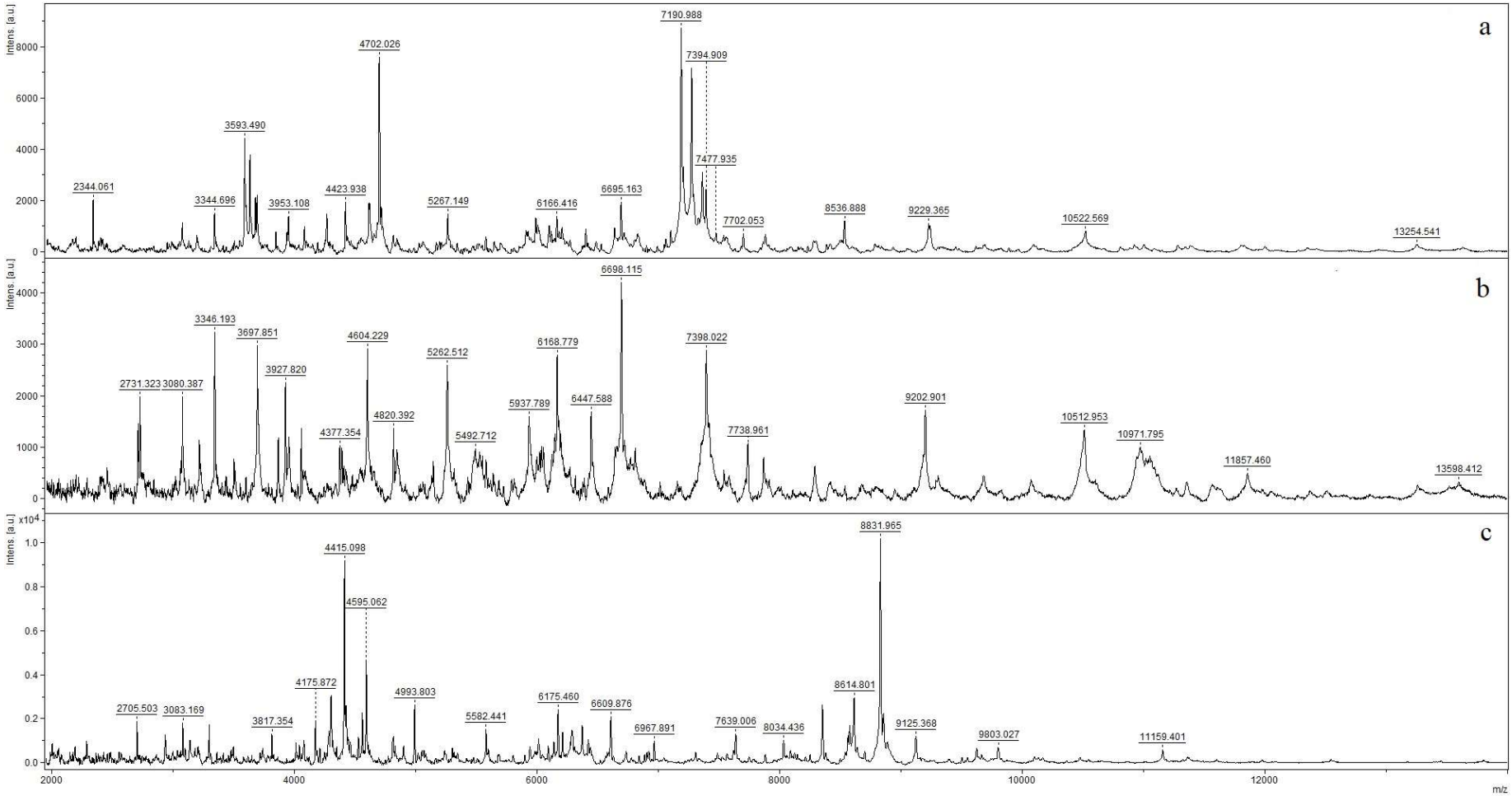
Fonte: Fidelis 2021.

5.3 CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA LOCAL DE ESPECTROS DE MASSA

Para a construção da biblioteca local com os espectros de referência, foi necessária a captação de 30 espectros de cada uma das três cepas de referência (*P. ciferrii* - RZI-3; *P. bovis* – LZ-5; e *P. blaschkeae* – RZIII-3). Os espectros foram capturados pelo software FlexControl, na faixa de 2 a 20 kDa. Nenhuma cepa de referência apresentou escore ≥1,7 quando comparado aos demais espectros de microrganismos já presentes no *software* Biotyper disponibilizado pelo fabricante. Adicionalmente, não foi observado relação dos espectros das cepas de referência com o espectro de *P. wickerhammi*, o único representante do gênero *Prototheca* caracterizado

previamente na biblioteca comercial do *software* Biotyper. Os espectros de massa das cepas genotipadas podem ser visualizados na figura 2.

Figura 2 - Espectros de massas obtidos das cepas de referência de a) *Prototheca ciferrii* (RZI-3); b) *Prototheca bovis* (LZ-5) e c) *Prototheca blaschkeae* (RZIII-3).



Fonte: Fidelis 2021

5.4 AVALIAÇÃO DE SIMILARIDADE ENTRE OS ESPECTROS DE MASSAS DAS CEPAS DE REFERÊNCIA

A similaridade entre espectros de uma mesma cepa e entre as 3 cepas diferentes foi avaliada por matriz de correlação contendo valores de *Composite Correlation Index* (CCI), correspondentes a cada uma das combinações entre os espectros avaliados. Valores de correlação próximos a 1 indicam elevada similaridade, já valores próximos a 0 indicam divergência entre os espectros. Em geral, os espectros obtidos de uma mesma cepa de referência apresentaram elevada similaridade. A respeito da comparação intraespecífica dos espectros de massa, para *P. ciferrii* foi obtido um valor médio de CCI de 0,84 ± 0,08, para *P. bovis* 0,83 ± 0,06 e para *P. blaschkeae* 0,81 ± 0,08.

Em relação a comparação dos espectros de espécies diferentes, foi observado elevada divergência entre os espectros com baixos valores de CCI (Tabela 1). Para a comparação *P. ciferrii/P. bovis* foi obtido um valor médio de CCI de 0,18 ± 0,10, e para *P. ciferrii/P. blaschkeae,* o valor médio de CCI foi de 0,05 ± 0,04. Já a comparação espectral de *P. bovis*/*P. blaschkeae* apresentou valor médio de CCI de 0,07 ± 0,07.

Tabela 1 - Matriz de *Composite Correlation Index* proveniente da comparação dos espectros das cepas genotipadas de *Prototheca ciferrii*, *Prototheca bovis* e *Prototheca blaschkeae*

	Espécie														
	Prototheca blaschkeae					*Prototheca bovis*					*Prototheca ciferrii*				
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**
15	0,00	0,08	0,09	0,08	0,09	0,23	0,15	0,21	0,23	0,15	0,90	0,94	0,78	0,87	1,00
14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,27	0,27	0,27	0,28	0,22	0,83	0,88	0,69	1,00	
13	0,08	0,03	0,07	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,79	0,77	1,00		
12	0,00	0,08	0,10	0,09	0,09	0,26	0,20	0,25	0,26	0,19	0,90	1,00			
11	0,00	0,07	0,12	0,12	0,00	0,25	0,25	0,24	0,24	0,19	1,00				
10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,77	0,74	0,85	0,83	1,00					
9	0,00	0,12	0,14	0,13	0,00	0,86	0,79	0,93	1,00						
8	0,03	0,07	0,13	0,12	0,00	0,89	0,82	1,00							
7	0,00	0,09	0,22	0,27	0,01	0,83	1,00								
6	0,02	0,07	0,14	0,14	0,00	1,00									
5	0,76	0,93	0,88	0,76	1,00										
4	0,70	0,72	0,88	1,00											
3	0,73	0,87	1,00												
2	0,90	1,00													
1	1,00														

Matriz de *Composite Correlation Index* (CCI) gerada pela comparação de 5 espectros de cada uma das cepas genotipadas (*P. ciferrii* - RZI-3; *P. bovis* – LZ-5; e *P. blaschkeae* – RZIII-3). A matriz de CCI foi calculada pelo *software* MALDI Biotyper 4.1.70 utilizando as configurações padrões. (1-5) Espectros pertencentes à *P. blaschkeae*; (6-10) Espectros pertencentes à *P. bovis*; (11-15) Espectros pertencentes à *P. ciferrii*. Valores de correlação próximos a 1 indicam elevada similaridade, já valores próximos a 0 indicam incongruência entre os espectros.
Fonte: Fidelis (2021).

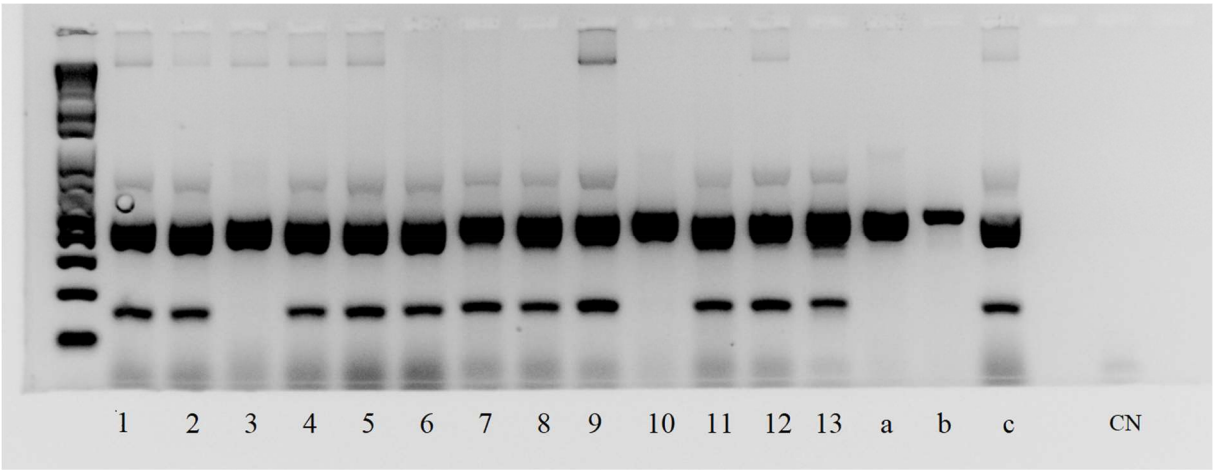
5.5 IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE *PROTOTHECA* SPP. POR MALDI-TOF

Um total de 87 isolados de *Prototheca* spp., previamente identificados pela metodologia de microbiologia convencional, foram submetidos à identificação microbiológica por MALDI-TOF MS utilizando o software Biotyper 4.1.70 (Bruker Daltonik, Bremen, Alemanha) após a inclusão dos espectros de referência. Um total de 97,7% (n = 85/87) dos isolados foram identificados como *Prototheca bovis* e 2,3% (n = 2/87) foram identificados como *Prototheca blaschkeae.* Não foram identificados isolados pertencentes a espécie *P. ciferrii*. Em relação ao escore de identificação, 86% (n = 73/85) dos isolados com identificação para *P. bovis* apresentaram escore ≥ 2,0, enquanto que, 14% (n = 12/85) apresentaram escore ≥1,7 e <2,0. Para ambos isolados identificados como *P. blaschkeae* foram obtidos escores de identificação superiores a 2,0.

5.6 IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE *PROTOTHECA* SPP. POR PCR

Do total de 87 isolados de *Prototheca* spp. submetidos a análise de PCR, 97,7% (n = 85) foram identificados como *P. bovis* e 2,3% (n = 2) foram identificados como *P. blaschkeae.* Todos os isolados identificados como *P. bovis* apresentaram à amplificação da banda do controle interno (450pb; 18-4f e 18-4r) juntamente da amplificação da banda característica da espécie (165pb; 18-4f e PZGT2-r). Os 2 isolados identificados como *P. blaschkeae*, apresentaram à amplificação da banda do controle interno (213pb; 18-4f e PZGT3-IK/r) e a banda específica para identificação da espécie (126pb; PZGT3-IK/f e PZGT3-IK/r). Nenhum isolado de mastite apresentou identificação sugestiva para *Prototheca ciferrii* (figura 3). Os resultados de identificação obtidos por MALDI-TOF apresentaram similaridade de 86% quando comprado aos resultados de identificação por PCR.

Figura 3 – Gel de agarose 1% mostrando os padrões de amplificação de bandas de DNA por PCR de *Prototheca* spp. isolados de mastite bovina: 1 a 13 (exceto 3 e 10): isolados identificados como *P. bovis* (450pb: 18-4f/18-4r; 165pb: 18-4f/PZGT2). 3 e 10: Isolados identificados como *P. blaschkeae* (450pb: 18-4f/18-4r). a) Cepa controle *P. blaschkeae* (RZIII-3); b) Cepa controle *P. ciferrii* (PZI-3); c) Cepa controle *P. bovis* (LZ-5) e CN) Controle negativo.



Fonte: Fidelis (2021).

5.7 CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME

Dos 85 isolados identificados como *P. bovis*, 63,5% (n = 54/85) foram classificados como fortes (D.O: 0,572 ± 0,122), 28,3% (n = 24/85) moderados (D.O: 0,276 ± 0,082) e 8,2% (n = 7/85) fracos (D.O: 0,139 ± 0,037) produtores de biofilme. Dentre os dois isolados de *Prototheca blaschkeae*, um foi classificado como moderado (D.O: 0,347 ± 0,147) e o outro fraco (D.O: 0,125 ± 0,11) produtores de biofilme.

Dentre os isolados de *P. bovis* provenientes de casos de mastite subclínica, 67,3% (n = 35/52) foram classificados como fortes (D.O: 0,584 ± 0,150) e 26,9% (n = 14/52) como moderados (D.O: 0,272 ± 0,092) e 5,7 (n = 3/52) como fracos (D.O: 0,144 ± 0,046) produtores de biofilme. Em relação aos isolados provenientes de mastite clínica, 57,5% (n = 19/33) foram classificados como fortes (D.O: 0,548 ± 0,140), 30,0% (n = 10/33) como moderados (D.O: 0,282 ± 0,071) e 12,1% (n = 4/33) foram classificados como fracos (D.O: 0,135 ± 0,031) produtores de biofilme. Adicionalmente, para isolados de *Prototheca blaschkeae* (n= 2/87), o isolado de mastite clínica e de mastite subclínica foram classificados como fraco (D.O: 0,125 ± 0,11) e moderado (D.O: 0,347 ± 0,147) produtores de biofilme.

Em relação às cepas de referência, *Prototheca bovis* (LZ-5) foi classificada como forte (D.O: 0,242 ± 0,057) produtora de biofilme, enquanto que as cepas de *Prototheca ciferrii* (RZI-

3) e *Prototheca blaschkeae* (RZIII-3) foram classificadas como fracas produtoras de biofilme (D.O: 0,142 ± 0,029 e 0,094 ± 0,004). A média de D.O do controle negativo foi de 0,81 ± 0,016.

Tabela 2 - Capacidade de produção de biofilme de isolados de *Prototheca bovis* e *Prototheca blaschkeae* provenientes de casos de mastite clínica e subclínica de vacas leiteiras[1]

	Prototheca bovis				*Prototheca blaschkeae*			
Intensidade	N	%	Média D.O[2]	DP[3]	n	%	Média D.O	DP
Fraco								
Total	7	8,2	0,139 (0,102-0,165)	0,037	1	50,0	0,125 (0,106-0,155)	0,011
MC[4]	4	4,7	0,135 (0,102-0,165)	0,031	1	50,0	0,125 (0,106-0,155)	0,011
MSC[5]	3	3,5	0,144 (0,141-0,148)	0,046	-	-	-	-
Moderado								
Total	24	28,3	0,276 (0,141-0,392)	0,082	1	50,0	0,347 (0,244-0,515)	0,147
MC	10	11,8	0,281 (0,184-0,382)	0,071	-	-	-	-
MSC	14	16,5	0,272 (0,141-0,392)	0,092	1	50,0	0,347 (0,244-0,515)	0,147
Forte								
Total	54	63,5	0,572 (0,307-1,440)	0,122	-	-	-	-
MC	19	22,3	0,548 (0,350-1,008)	0,140	-	-	-	-
MSC	35	41,2	0,584 (0,307-1,440)	0,150	-	-	-	-

[1] Avaliação da capacidade de formação de biofilme de isolados de *P. bovis* (n = 85) e *P. blaschkeae* (n = 2) provenientes de casos de mastite. A capacidade de formação de biofilme dos isolados foi classificada de acordo com Stepanovic et al (2003). Os isolados foram classificados como fraco ($DO_{CN} < DO \leq 2 \times DO_{CN}$), moderado ($2 \times DO_{CN} < DO \leq 4 \times DO_{CN}$), ou forte ($DO > 4 \times DO_{CN}$) produtores de biofilme. O valore médio para a densidade ótica do controle negativo foi de 0,81 ± 0,16.
[2] Valores médios de densidade ótica observados para a triplicata de cada isolado.
[3] Desvio padrão.
[4] Mastite subclínica
[5] Mastite clínica
Fonte: Fidelis (2021).

5.1 PERFIL DE RESISTÊNCIA DE *PROTOTHECA* SPP. AOS DESINFETANTES

Todos os isolados de *Prototheca* spp. (*P. bovis* = 85; *P. blaschkeae* = 2) foram submetidos a avaliação de CIM e CAM frente a PHMB, CHG, PVP-I, NaDCC e NaCLO. Os resultados de CIM_{50} e CIM_{90} são apresentados na tabela 3.

Em relação aos isolados de *Prototheca bovis* (n = 85), para CHG, a CIM_{50} e CIM_{90} foram determinadas na mesma concentração (≥2 µg/ml); enquanto que para a PHMB uma diluição seriada diferiu a concentração necessária para inibir 50% (≥1 µg/ml) e 90% (≥2 µg/ml) dos isolados. CHG e PHMB apresentaram os menores valores de CIM quando comparados aos demais antimicrobianos (NaDCC, NaCLO, PVP-I; $P<0,0001$), entretanto, não foi observado diferença para os valores de CIM entre CHG e PHMB ($P = 0,9988$). Para NaDCC, a CIM_{50} (≥700 µg/ml) foi uma diluição menor que CIM_{90} (≥1.400 µg/ml). Esses valores foram maiores

que os observados para CHG e PHMB (*P*<0,0001), entretanto, foram menores que os observados para NaCLO (CIM_{50} e CIM_{90} ≥2.800 µg/ml; *P*<0,0001) e PVP-I (CIM_{50} e CIM_{90} ≥3.200 µg/ml; *P*<0,0001). Para NaCLO, a concentração necessária para inibir 50% e 90% dos isolados foi de ≥2.800 µg/ml. Embora NaCLO tenha apresentado maiores valores de CIM que CHG, PHMB e NaDCC (*P*<0,0001), esses valores foram menores que o observado para PVP-I (*P*<0,0001). PVP-I inibiu 50% e 90% dos isolados em maiores concentrações (≥3.200 µg/ml) que os demais antimicrobianos avaliados (CHG, PHMB, NaDCC e NaCLO; *P*<0,0001) (Tabela 3).

Tabela 3 – Frequência de isolados de *Prototheca bovis* de mastite bovina inibidos *in vitro* de acordo com as concentrações de desinfetantes[1]

Componente	Concentração dos desinfetantes (µg/ml)													CIM cepas controle		
	0,5	1	2	4	175	350	700	1400	1600	2800	3200	CIM_{50}[2]	CIM_{90}[3]	*P. ciferrii*	*P. bovis*	*P. blasch.*
CHG[4]	2,4	45,9	49,4	2,4	-	-	-	-	-	-	-	2,0	2,0	0,5	1,0	0,5
NaDCC[5]	-	-	-	-	1,2	14,1	56,5	28,3	-	-	-	700	1400	350	700	350
NaCLO[6]	-	-	-	-	-	-	-	44,7	-	55,3	-	2800	2800	700	2800	1400
PVP-I[7]	-	-	-	-	-	-	-	-	41,2	-	58,8	3200	3200	1600	3200	3200
PHMB[8]	11,7	41,2	45,9	1,2	-	-	-	-	-	-	-	1,0	2,0	0,5	1,0	1,0

[1]Teste *in vitro* levando em consideração 85 isolados de *Prototheca bovis* provenientes de casos de mastite clínica e subclínica.
[2]Concentração inibitória mínima requerida para a inibição de 50% dos isolados.
[3]Concentração inibitória mínima requerida para a inibição de 90% dos isolados.
[4]CHG: gluconato clorexidina
[5]NaDCC: dicloroisocianurato de sódio
[6]NaCLO: hipoclorito de sódio
[7]PVP-I: Iodo-polivinilpirrolidona
[8]PHMB: polihexametileno biguanida
Fonte: Fidelis (2021).

Em relação aos valores de CAM dos desinfetantes frente aos isolados de *P. bovis,* para CHG a concentração necessária para inativar 50% e 90% dos isolados foi de ≥2 µg/ml; enquanto que para PHMB, a CAM_{50} (≥2 µg/ml) diferiu em uma diluição seriada da CAM_{90} (≥4 µg/ml). CHG e PHMB apresentaram os menores valores de inativação comparado aos demais antimicrobianos (NaDCC, NaCLO e PVP-I, $P<0,0001$), contudo, não houve diferença para os valores de CAM entre CHG e PHMB ($P= 0,9967$). Para NaDCC, a CAM_{50} (≥700 µg/ml) diferiu em uma diluição seriada da CAM_{90} (≥1.400 µg/ml). Esses valores para inativação dos isolados foram maiores que os obtidos para CHG ($P<0,0001$) e PHMB ($P<0,0001$), entretanto foram menores que os observados para NaCLO ($P<0,0001$) e PVP-I ($P<0,0001$). Para NaCLO a concentração necessária para inativar 50% e 90% dos isolados foi de (≥2.800 µg/ml. Esses valores de inativação são maiores que os valores obtidos para os demais antimicrobianos (CHG, PHMB e NaDCC; $P<0,0001$), exceto PVP-I ($P = 0,0276$). PVP-I foi o antimicrobiano que apresentou os maiores valores de CAM_{50} e CAM_{90} (≥3.200 µg/ml) quando comparado aos demais antimicrobianos avaliados ($P<0,0001$) (Tabela 4).

Tabela 4 - Frequência de isolados de *Prototheca bovis* de mastite bovina inativados *in vitro* de acordo com as concentrações de desinfetantes[1]

Componente	Concentração dos desinfetantes (µg/ml)													CAM cepas controle		
	0,5	1	2	4	8	350	700	1400	1600	2800	3200	CAM_{50}[2]	CAM_{90}[3]	*P. ciferrii*	*P. bovis*	*P. blasch..*
CHG[4]	0	22,4	68,2	7,0	2,4	-	-	-	-	-	-	2,0	2,0	0,5	2,0	0,5
NaDCC[5]	-	-	-	-	-	13,0	55,3	31,7	-	-	-	700	1400	350	700	350
NaCLO[6]	-	-	-	-	-	-	-	9,4	-	90,6	-	2800	2800	700	2800	1400
PVP-I[7]	-	-	-	-	-	-	-	-	24,7	-	75,3	3200	3200	3200	3200	3200
PHMB[8]	3,5	40,0	45,9	9,4	1,2	-	-	-	-	-	-	2,0	4,0	1,0	2,0	1,0

[1]Teste *in vitro* levando em consideração 85 isolados de *Prototheca bovis* provenientes de casos de mastite clínica e subclínica.
[2]Concentração algicída mínima requerida para a inativação de 50% dos isolados.
[3]Concentração algicída mínima requerida para a inativação de 90% dos isolados.
[4]CHG: gluconato clorexidina
[5]NaDCC: dicloroisocianurato de sódio
[6]NaCLO: hipoclorito de sódio
[7]PVP-I: Iodo-polivinilpirrolidona
[8]PHMB: polihexametileno biguanida
Fonte: Fidelis (2021).

Considerando as análises de susceptibilidade por grupos de desinfetantes, as biguanidas (CHG/PHMB) apresentaram menores valores de CIM_{90} (≥2 µg/ml) e CAM_{90} (≥4 µg/ml) quando comparado ao grupo dos clorados (NaDCC/NaCLO; CIM_{90} e CAM_{90} ≥2.800 µg/ml; $P<0,0001$) e o grupo dos iodóforos (PVP-I; CIM_{90} e CAM_{90} ≥3.200 µg/ml; $P<0,0001$). Já os valores de CIM_{90} e CAM_{90} obtidos para o grupo dos clorados foram menores que os observados para o grupo dos iodóforos ($P<0,0001$).

Para *Prototheca blaschkeae* (n= 2), os menores valores de CIM para ambos os isolados foram observados para PHMB (≥0,5 µg /ml) e CHG (≥0,5 µg /ml), seguido de NaDCC (≥350 µg/ml). Já NaCLO (≥1400 µg/ml) e PVP-I (≥800 µg/ml) apresentaram os maiores valores de CIM. Em relação a CAM, PHMB (≥1 µg/ml) foi o desinfetante que apresentou as menores concentrações para ambos os isolados, seguido de CHG (CAM: ≥ 2 µg/ml) e NaDCC (≥350 µg/ml). Os maiores valores de CAM foram observados para NaCLO (≥1400 µg/ml) e PVP-I (≥1600 µg/ml).

Em relação as cepas de referência (RZI-3, RZIII-3, e LZ-5) PHMB e CHG apresentaram os menores valores de CIM e CAM (≥0,5 µg/ml), seguido de NaDCC (≥350 µg/ml). Por fim, NaCLO (≥700 µg/ml), e PVP-I (≥1.600 µg/ml), apresentaram os maiores valores de CIM e CAM observados para as cepas de referência (tabelas 3 e 4).

6 DISCUSSÃO

Prototheca spp. é um agente emergente causador de infecções em humanos e animais domésticos. O subdiagnóstico e a ausência de tratamentos intramamários e sistêmicos eficazes dificultam o controle da mastite por Protothecas. Dessa forma, a rápida identificação deste patógeno e a avaliação da atividade antimicrobiana de novos compostos auxiliam no controle de *Prototheca* spp. em rebanhos leiteiros. Em nosso estudo, avaliamos a técnica de espectrometria de massas MALDI-TOF para a identificação de *Prototheca* spp. Além do mais, este estudo avaliou a capacidade de formação de biofilme e o perfil de sensibilidade de *Prototheca* spp. à PHMB e desinfetantes comumente utilizados para a desinfecção de tetos pré e pós ordenha.

6.1 IDENTIFICAÇÃO DE *PROTOTHECA* SPP. POR MALDI-TOF MS E PCR

No presente estudo, foram obtidos 87 isolados de *Prototheca* spp., dos quais 61,0% foram isolados de casos de mastite subclínica, 39,0% de casos de mastite clínica. Estudos prévios, também descrevem casos clínicos e subclínicos de mastite causada por *Prototheca* spp. (BUENO et al., 2006; GONÇALVES et al., 2015; JAGIELSKI et al., 2019c), embora casos de mastite clínica essencialmente são mais frequentes (SALERNO et al., 2010; GAO et al., 2012), especialmente quando relacionados a surtos de mastite no rebanho (RICCHI et al., 2013).

A capacidade da *Prototheca* spp. em causar mastite pode ser atribuída a habilidade de interiorização celular (SHAHID et al., 2017). A maior adaptação de *Prototheca spp*. ao tecido mamário pode ser comparada ao mecanismo de endossimbiose desenvolvido por outros dois gêneros (Chlorella e Auxenochlorella) da família Chlorellaceae. Sabe-se que a endossimbiose facilita a invasão e permanência no hospedeiro, mas o mecanismo ainda não foi bem compreendido (SHAVE; MILLYARD; MAY, 2021). Já os casos de mastite clínica podem estar relacionados à pouca adaptação ao epitélio mamário que algumas cepas de *Prototheca* spp. apresentam, visto que este patógeno é de origem primariamente ambiental (OSUMI et al., 2008; MILANOV et al., 2016).

No presente estudo, o uso da PCR permitiu a identificação de todos os isolados avaliados, sendo *P. bovis* a espécie com maior frequência de identificação. Esse resultado corrobora com estudos prévios, que sugerem que dentre as espécies de *Prototheca* spp., há maior isolamento de *P. bovis* em rebanhos leiteiros localizados no Brasil (SALERNO et al., 2010), Itália (RICCHI et al., 2010), Canadá (PIEPER et al., 2012), Polônia (JAGIELSKI et al.,

2019c) e China (SHAHID et al., 2016). A identificação de *P. bovis* em casos de mastite pode ser atribuída à ampla distribuição deste patógeno no ambiente (e.g., ração, água potável e material da cama; OSUMI et al., 2008; RICCHI et al., 2010; SHAHID et al., 2016). Adicionalmente, as deficiências de higiene e do ambiente podem facilitar a contaminação e a invasão do agente via canal do teto, o que pode ocasionar ocorrência de mastite (AOUAY et al., 2008; RICCHI et al., 2010).

Por outro lado, do total de isolados de *Prototheca* spp. avaliados, apenas 2,3% foram caracterizados como *P. blaschkeae*. Estudos prévios relataram menor frequência de isolamento de *P. blaschkeae* na Polônia (2,4%; JAGIELSKI et al., 2011) e em Portugal (9,8%; MARQUES et al., 2008). Portanto, estes resultados do presente estudo reforçam que a mastite causada por *P. blaschkeae* ocorre de forma esporádica (MARQUES et al., 2008; JAGIELSKI et al., 2011), embora já tenha sido relatada como sendo a causa de surtos de mastite em rebanhos leiteiros (RICCHI et al., 2013; WAWRON et al., 2013). Nenhum isolado avaliado foi identificado como *P. ciferrii*, o que também concorda com estudos prévios que relatam que esta espécie desempenha limitado papel como agente causador de mastite (AHRHOLDT et al., 2012; SHAHID et al., 2016).

No presente estudo, o protocolo convencional de extração de proteínas ribossomais não foi eficaz para a extração das proteínas ribossomais de *Prototheca* spp. e a identificação via MALDI-TOF. Foi observada apenas a presença de ruídos, mas sem a definição dos picos de massa característicos da espécie. Estes resultados são similares aos obtidos por o Bergen et al. (2009), mas diferem do observado por Barbano et al. (2015), que descreveram que o protocolo baseado em AF+ACN possibilitou a identificação de 31 microalgas em nível de espécie. É possível que o sucesso da extração por AF+ACN seja possa ser atribuída a diferenças entre os processos de preparação de amostra, bem como as diferentes espécies utilizadas.

O protocolo convencional de extração de proteínas ribossomais foi inicialmente desenvolvido para a identificação de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras. Dessa forma, devido à complexa composição da parede celular de *Prototheca* spp., foi necessária a realização de modificações na metodologia (e.g. etapas adicionais de lavagem com etanol 70% para remoção de lipídeos e carboidratos remanescentes na amostra) (VON BERGEN et al., 2009). Para microrganismos que apresentam parede celular mais robusta, é necessário a etapa adicional de fervura (VON BERGEN et al., 2009) ou sonicação em gelo (AHRHOLDT et al., 2012).

A extração direto em placa resultou na obtenção de espectros de baixa qualidade e com elevada presença de ruídos. Dessa forma, os espectros não apresentaram a qualidade mínima requerida para a identificação microbiológica. Ao contrário, em um estudo anterior, o método de extração direto em placa permitiu a identificação de 9 isolados (9/50) de *Prototheca* spp. em nível de espécie e 37 (37/50) em nível de gênero (MURUGAIYAN et al., 2012). Entretanto, os autores destacaram que não foi possível a transferência uniforme dos isolados para a placa de aço. Assim, para melhor identificação, é necessário a utilização de protocolo modificado de extração das proteínas ribossomais (MURUGAIYAN et al., 2012).

A utilização de *beads* de zircônia associado à AF+ACN resultou na obtenção de espectros com elevada presença de picos de massa e baixa linha de base, semelhante ao observado em estudos prévios (MASUDA et al., 2016; FIDELIS et al., 2021). Este protocolo foi previamente empregado para a identificação de fungos de importância médica (LUETHY; ZELAZNY, 2018) e de isolados de mastite (FIDELIS et al., 2021). Luethy e Zelazny (2018) relataram que o protocolo de extração por *beads* além de ser mais rápido, aumentou a obtenção de escore aceitável para identificação microbiana por MALDI-TOF, quando comparado ao método padrão de extração por AF+ACN.

Além da extração de proteínas, a eficácia da identificação por MALDI-TOF depende das cepas de referência que compõem o banco de dados. Como as bibliotecas são projetadas para uso principal no diagnóstico clínico de doenças humanas, há a necessidade da construção de banco de dados personalizados com espectros de microrganismos relevantes para outras áreas (MURUGAIYAN et al., 2012; SEUYLEMEZIAN et al., 2018). Contudo, para obtenção de alta acurácia de diagnóstico, é necessária uma elevada reprodutibilidade e qualidade dos espectros inseridos no bando de dados local.

Após o processo de extração, a reprodutibilidade dos espectros foi avaliada por meio de uma matriz de correlação. Foi possível observar que entre os espectros de uma mesma cepa houve grande similaridade devido aos elevados valores de CCI obtidos (*P. ciferrii*: 0,84; *P. bovis*: 0,83; *P. blaschkeae*: 0,81). Esses resultados indicam que o protocolo de extração apresentou elevada reprodutibilidade para a aquisição dos espectros. Já a baixa similaridade (0,05-0,18) entre os espectros das espécies diferentes permitiu a diferenciação de *Prototheca* spp. Não foi observada nenhuma correlação dos espectros da biblioteca de dados local com os espectros disponíveis na biblioteca do fabricante, assim como observado em estudos prévios (MURUGAIYAN et al., 2012).

Após a criação da biblioteca local, a técnica de MALDI-TOF MS possibilitou a identificação de 97,7% dos isolados como *Prototheca bovis*, e 2,3% como *Prototheca blaschkeae.* Dos 85 isolados identificados como *P. bovis*, 86% foram identificados em nível de espécie e 14% em nível de gênero. Ambos os isolados de *P. blaschkeae* foram identificados em nível de espécie. Assim como observado no presente estudo, a criação de uma biblioteca local com três espécies de *Prototheca* spp. permitiu a identificação de 22 (22/27) isolados de *P. bovis* e 3 (3/4) isolados de *P. blaschkeae* provenientes de casos de mastite (FIDELIS et al., 2021). Ahrholdt et al. (2012) criaram uma biblioteca local contendo espectros de 22 cepas de seis gêneros de *Prototheca* spp. e dois gêneros de *Chlorella spp.* Essa biblioteca permitiu a correta identificação de 290 microalgas de origem infecciosa (AHRHOLDT et al., 2012). Já Murugaiyan et al. (2012) criaram uma biblioteca local contendo espectros de 27 cepas de *Prototheca* spp. e *Chlorella spp.* Essa biblioteca permitiu a identificação de 94,6% (n = 247) dos isolados em nível de espécie, e 5,4% (n = 13) em nível de gênero (MURUGAIYAN et al., 2012). A maior frequência de identificação com escores confiáveis em nível de espécie (≥2,0) encontrada nesses estudos, pode ser atribuída ao maior número de cepas utilizadas para a criação da biblioteca local. Dessa forma, a ampliação do número de espectros na biblioteca local pode melhorar a identificação dos isolados de *Prototheca* spp. causadores de mastite.

6.2 FORMAÇÃO DE BIOFILME E RESISTÊNCIA DE *PROTOTHECA* SPP. AOS ANTIMICROBIANOS

Em nosso estudo, a maioria dos isolados de *P. bovis* (63,5%) foram classificados como fortes produtores de biofilme. Esses resultados concordam com os descritos por Morandi et al. (2016), que observaram que a maioria (88%; 37/42) dos isolados de *P. bovis* avaliados foram fortes formadores de biofilme. Por outro lado, nossos resultados diferem do relatado por Gonçalves et al. (2015), ao avaliar a capacidade de produção de biofilme de *Prototheca* spp. em diferentes temperaturas de incubação. Em temperatura de 37ºC, de um total de 10 isolados, 6 apresentaram fraca produção de biofilme, e 4 apresentaram moderada produção de biofilme. Em nosso estudo, assim como no estudo de Morandi et al. (2016), grande parte dos isolados (63,5%; n = 54/85) de *P. bovis* apresentaram forte capacidade de formação de biofilme em temperatura de 37ºC. Esses resultados podem estar relacionados às divergências nas metodologias utilizadas (e.g. fixação do biofilme) nos estudos. Adicionalmente, no estudo de Gonçalves et. al (2015) não houve determinação da espécie de *Prototheca* spp. avaliada, sendo

que o uso de isolados de *P. ciferrii* poderia explicar a baixa capacidade de produção de biofilme, assim como o observado para a cepa de referência (RZI-3) em nosso estudo.

No presente estudo foi observada elevada variabilidade na produção de biofilme para *P. bovis* (D.O: 0,102 ± 0,084 a 1,440 ± 0,350), semelhante ao descrito por Morandi et al. (2016) (D.O = 0,126 ± 0,023 a 1,104 ± 0,264), o que sugere que a capacidade de formação de biofilme além de estar relacionada com a espécie, também é dependente do tipo de cepa.

No presente estudo a CIM_{90} e CAM_{90} obtida para CHG foi de ≥2 µg/ml (0,0002%). Esses resultados foram menores que os valores de sensibilidade observados para CHG por Melville et al. (2003; 0,01%; 100 µg/ml) e por Krukowski et al. (2013; 0,048-0,0195%; 480-195 µg/ml). Valores de CAM_{90} ainda mais baixos (0,025 µg/ml) foram encontrados por Sobukawa et al. (2011). Os baixos valores de sensibilidade encontrados para CHG indicam que este antimicrobiano, rotineiramente utilizado para desinfecção de tetos antes da ordenha em concentrações de 0,5 – 1%. pode ser uma alternativa para o controle de *Prototheca* spp. em rebanhos leiteiros (SANTOS; FONSECA, 2019).

Em nosso estudo, a CIM_{90} e CAM_{90} para NaCLO foi de ≥2.800 µg/ml (0,28%), o que é maior do que o descrito por Gonçalves et al. (2015; CIM_{90}: ≥0,312 g/L; 0,312 µg/ml) e por Salerno et al. (2010; CAM: ≥0,0781%-0,156%; 781-1560 µg/ml). Essa diferença observada nos valores de CIM e CAM podem decorrer de divergências nas metodologias utilizadas. Por exemplo, tanto Salerno et al. (2010) quanto Gonçalves et al. (2015) utilizaram o método de avaliação por macrodiluição em tubo, e em nosso estudo foi utilizado o método de microdiluição em caldo.

Para NaDCC foram observados valores de CIM_{90} e CAM_{90} de ≥1.400 µg/ml (0,14%). Esses resultados foram semelhantes aos valores de CAM observados para NaCLO (≥0,0781%-0,156%; 781-1560 µg/ml) por Salerno et al. (2010), mesmo considerando o uso de metodologias distintas. Leite et al. (2021) observaram resultados semelhantes (≥500 µg/ml) para NaDCC frente a isolados de *S. aureus* causadores de mastite. Assim como em nosso estudo, NaDCC em baixas concentrações (≥0,15%; 1500 µg/ml) foi eficiente contra isolados de *Candida albicans* (KURIAN; BOLLA; DAMARAJU, 2012).

Os maiores valores de CIM_{90} e CAM_{90} foram observados para PVP-I (≥3.200 µg/ml; 0,32%), elevados valores de CAM (≥0,3125%; 3125 µg/ml) também foram relatados por Krukowski et al. (2013). Nossos resultados também foram similares aos valores de CAM reportados para iodo (≥0,156-0,625%; 1560-6250 µg/ml) descritos por Salerno et al. (2010). Contudo, os resultados observados são maiores aos relatados por Gonçalves et al. (2015) para

solução de iodo (0,625 g/L; 625 µg/ml) e Sobukawa et al. (2011) para PVP-I (0,39-3,13 µg/ml). Os elevados valores de PVP-I reportados podem estar ligados à dificuldade de determinação e interpretação dos valores dos testes de sensibilidade *in vitro* para PVP-I. A presença de substâncias estranhas e a quantidade de iodo livre não complexado, podem alterar a atividade antimicrobiana do PVP-I (SCHUBERT, 1985; LEPELLETIER et al., 2020).

Em relação a PHMB, os valores de CIM_{90} e CAM_{90} foram de ≥2 e ≥4 µg/ml respectivamente. Esses valores são semelhantes aos descritos por Kamaruzzaman et al. (2016) (≥4 µg/ml) para *S. aureus* causadores de mastite. Já Leite et al. (2021) relataram que a PHMB em concentração ≥0,5 µg/ml foi eficaz para a inibição de 90% dos isolados de *S. aureus* causadores de mastite. Contudo, comparações diretas entre os resultados destes estudos se tornam limitadas, uma vez que se tratam de grupos distintos de microrganismos. Para *P. bovis*, os valores de sensibilidade para PHMB relatados em nosso estudo foram menores que valores de CAM reportados para guanidina (0,001-0,035%; 10-35 µg/ml), composto semelhante à PHMB (ALVES et al., 2017). As baixas concentrações inibitórias encontradas para PHMB indicam que este antimicrobiano pode ser potencialmente ser utilizado para o preparo de soluções de desinfecção de tetos e dos equipamentos de ordenha. Entretanto, novos estudos são necessários para avaliar a eficácia deste antimicrobiano na pele dos tetos, como um antimicrobiano intramamário, bem como no uso para desinfecção dos equipamentos de ordenha.

Em nosso estudo, CHG e PHMB apresentaram os menores valores de CIM_{90} e CAM_{90} quando comparado aos demais princípios ativos, entretanto, não foi observado diferença para os valores de CIM e CAM para estes dois desinfetantes. Estes resultados sugerem que PHMB pode ser uma alternativa o uso de CHG, visto que algumas espécies de microrganismos causadores de mastite (e.g. *Serratia* spp.) já apresentam elevada resistência à CHG (DE FRUTOS et al., 2017).

Em relação à análise por grupos de desinfetantes, o grupo das biguanidas apresentou os menores valores de CIM/CAM em relação aos demais grupos avaliados. Resultados semelhantes foram observados para *S. aureus* causadores de mastite. Leite et al (2021) relataram que o grupo das biguanidas (≥0,5 µg/ml) apresentaram os menores valores de CIM_{90}, quando comparado ao grupo dos clorados (≥500 µg/ml) e iodóforos (≥8.000 µg/ml) para inibição de *S. aureus*. O modo de ação dos antimicrobianos testados pode estar associado com as diferença dos valores de sensibilidade observados, uma vez que, a maioria dos desinfetantes possuem modo de ação relacionados a degradação da parede celular (MCDONNELL;

RUSSELL, 1999), já PHMB possui a capacidade de se ligar fortemente a estrutura de DNA e bloquear o processo de replicação (CHINDERA et al., 2016; SOWLATI-HASHJIN et al., 2020).

As diferenças dos valores de CIM e CAM observados em nosso estudo em relação aos estudos prévios podem estar relacionadas as características genotípicas e origem geográfica dos isolados. (JAGIELSKI et al., 2012). Além disso, as diferentes metodologias entre estudos e formulações dos desinfetantes podem influenciar nos perfis de sensibilidade.

Dentre as limitações presentes em nosso estudo, podemos citar a falta de um padrão para a avaliação de sensibilidade a desinfetantes para *Prototheca* spp. Comumente, essa avaliação é realizada pelo método de macrodiluição em tubo (SALERNO et al., 2010; SOBUKAWA et al., 2013; GONÇALVES et al., 2015). Em nosso estudo, foi adotado o método de microdiluição em caldo presente no CLSI M27-A4 (2017) para *Leveduras*, semelhante a Jagielski et al. (2018a). Sendo assim, comparações diretas entre estudos são limitadas. Além disso, utilizamos apenas uma cepa de referência de cada espécie para a construção da biblioteca local. Esta característica diminui a variabilidade fenotípica presente em determinada espécie e, portanto, torna a comparação com o banco de dados limitada.

7 CONCLUSÃO

O uso de disruptor celular associado a *beads* de zircônia foi eficaz para a extração de proteínas ribossomais de *Prototheca* spp. A criação da biblioteca local possibilitou a identificação de isolados de *Prototheca* spp. provenientes de casos de mastite. A MALDI-TOF MS e PCR foram concordantes na diferenciação de isolados de *Prototheca* spp. Isolados de *P. bovis* apresentaram elevada capacidade de formação de biofilme. Dentre os desinfetantes, CHG e PHMB apresentaram os menores valores de sensibilidade.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, A. C. et al. Mastitis in ruminants in Brazil. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 36, n. 7, p. 565–573, 2016.

AHRHOLDT, J. et al. Epidemiological analysis of worldwide bovine, canine and human clinical *Prototheca* isolates by PCR genotyping and MALDI-TOF mass spectrometry proteomic phenotyping. **Medical Mycology**, v. 50, n. 3, p. 234–243, 2012.

ALVES, A. C. et al. In vitro algicidal effect of guanidine on *Prototheca zopfii* genotype 2 strains isolated from clinical and subclinical bovine mastitis. **Letters in Applied Microbiology**, v. 64, n. 6, p. 419–423, 2017.

ANDERSON, K. L.; WALKER, R. L. Sources of *Prototheca* spp in a dairy herd environment. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 193, n. 5, p. 553—556, 1988.

AOUAY, A. et al. Molecular characterization of *Prototheca* strains isolated from bovine mastitis. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 18, n. 4, p. 224–227, 2008.

ASHBY, M. J. et al. Effect of antibiotics on non-growing planktonic cells and biofilms of escherichia coli. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 33, n. 3, p. 443–452, 1994.

ATKINSON, A. W.; GUNNING, B. E. S.; JOHN, P. C. L. Sporopollenin in the cell wall of Chlorella and other algae: Ultrastructure, chemistry, and incorporation of 14C-acetate, studied in synchronous cultures. **Planta**, v. 107, n. 1, p. 1–32, 1972.

BARBANO, D. et al. Rapid characterization of microalgae and microalgae mixtures using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1–13, 2015.

BRADLEY, A. J. Bovine mastitis: An evolving disease. **Veterinary Journal**, v. 164, n. 2, p. 116–128, 2002.

BRAS, A. V.; VAL, R.; DIAS, C. Principais métodos de controle e diagnósticos de mastite bovina. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 1, n. 1, p. 23–27, 2007.

BRITO, M. A. V. P.; OLIVEIRA, V. M. Mastite bovina causada por *Prototheca* zopffi: Relato de um caso. **Ciencia Rural**, v. 27, n. 4, p. 681–684, 1997.

BUENO, V. F. F. et al. Epidemiological and clinical aspects of the first outbreak of bovine mastitis caused by *Prototheca zopfii* in Goiás State, Brazil. **Mycopathologia**, v. 161, n. 3, p. 141–145, 2006.

BUTCHER, M. PHMB: An effective antimicrobial in wound bioburden management. **British Journal of Nursing**, v. 21, n. 12. SUPP, p. S16–S21, 2012.

BUZZINI, P. et al. First large-scale isolation of *Prototheca zopfii* from milk produced by dairy herds in Italy. **Mycopathologia**, v. 158, n. 4, p. 427–430, 2004.

CARVALHO, F. H. de et al. Mastite bovina por *Prototheca zopfii* na região oeste do Paraná: relato de caso. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 20, n. 4, p. 233–236, 2017.

CHAN, W. et al. Comparison of the Biocidal Efficacy of Sodium Dichloroisocyanurate and

Calcium Hydroxide as Intracanal Medicaments over a 7-Day Contact Time: An Ex Vivo Study. **Journal of Endodontics**, v. 46, n. 9, p. 1273–1278, 2020.

CHINDERA, K. et al. The antimicrobial polymer PHMB enters cells and selectively condenses bacterial chromosomes. **Scientific Reports**, v. 6, n. February, p. 1–13, 2016.

CORBELLINI, L. G. et al. Bovine mastitis due to *Prototheca zopfii*: Clinical, epidemiological and pathological aspects in a Brazilian dairy herd. **Tropical Animal Health and Production**, v. 33, n. 6, p. 463–470, 2001.

COSTA, E. O. et al. Prototheca sp. outbreak of bovine mastitis. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 43, n. 6, p. 321–324, 1996.

COSTA, E. O. et al. Epidemiologic study of environmental sources in a *Prototheca zopfii* outbreak of bovine mastitis. **Mycopathologia**, v. 137, n. 1, p. 33–36, 1997.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318–1322, 1999.

DADDI OUBEKKA, S. et al. Correlative time-resolved fluorescence microscopy to assess antibiotic diffusion-reaction in biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 6, p. 3349–3358, 2012.

DE FRUTOS, M. et al. Serratia marcescens outbreak due to contaminated 2% aqueous chlorhexidine. **Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica**, v. 35, n. 10, p. 624–629, 2017.

DE VARGAS, A. C. et al. Isolation of Prothoteca zopfii from a case of bovine mastitis in Brazil. **Mycopathologia**, v. 142, n. 3, p. 135–137, 1998.

DOWN, P. M. et al. Factors affecting the cost-effectiveness of on-farm culture prior to the treatment of clinical mastitis in dairy cows. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 145, p. 91–99, 2017.

ELY, V. L. et al. Biofilm formation by *Prototheca zopfii* isolated from clinical and subclinical bovine mastitis in distinct growth conditions under different dyes. **Ciencia Rural**, v. 49, n. 2, p. 1–7, 2019.

ENDO, S. et al. The first case of feline *Prototheca wickerhamii* infection in Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 72, n. 10, p. 1351–1353, 2010.

FIDELIS, C. E. et al. MALDI-TOF MS identification of *Prototheca* algae associated with bovine mastitis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 33, n. 6, p. 1–4, 2021.

FILIPPSEN, L. F. et al. Prevalência da mastite bovina causada por *Prototheca zopfii* em rebanhos leiteiros, na região norte do Paraná. **Ciência Rural**, v. 29, n. 1, p. 87–89, 1999.

FIRDESSA, R. et al. Pathogen- and Host-Directed Antileishmanial Effects Mediated by Polyhexanide (PHMB). **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 10, p. 1–22, 2015.

FJELD, H.; LINGAAS, E. Polyheksanid - Sikkerhet og effekt som antiseptikum. **Tidsskrift for den Norske Laegeforening**, v. 136, n. 8, p. 707–711, 2016.

FLEMMING, H. C. et al. Biofilms: An emergent form of bacterial life. **Nature Reviews**

Microbiology, v. 14, n. 9, p. 563–575, 2016.

FLEMMING, H. C.; NEU, T. R.; WOZNIAK, D. J. The EPS matrix: The "House of Biofilm Cells". **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 22, p. 7945–7947, 2007.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623–633, 2010.

FONT, R. L.; HOOK, S. R. Metastatic Protothecal Retinitis in a Dog. Electron Microscopic Observations. **Veterinary Pathology**, v. 21, n. 1, p. 61–66, 1984.

FOURNIER, P. E. et al. Modern clinical microbiology: New challenges and solutions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 8, p. 574–585, 2013.

FUKUZAKI, S. Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. **Biocontrol Science**, v. 11, n. 4, p. 147–157, 2006.

FUX, C. A. et al. Survival strategies of infectious biofilms. **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 34–40, 2005.

GAO, J. et al. Characterization of *Prototheca zopfii* Associated with Outbreak of Bovine Clinical Mastitis in Herd of Beijing, China. **Mycopathologia**, v. 173, n. 4, p. 275–281, 2012.

GOMES, F.; SAAVEDRA, M. J.; HENRIQUES, M. Bovine mastitis disease/pathogenicity: evidence of the potential role of microbial biofilms. **Pathogens and disease**, v. 74, n. 3, p. 1–7, 2016.

GONÇALVES, J. L. et al. Biofilm-producing ability and efficiency of sanitizing agents against *Prototheca zopfii* isolates from bovine subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 6, p. 3613–3621, 2015.

GRAY, D. et al. PHMB and its potential contribution. **Wounds UK**, v. 6, n. 2, p. 40–46, 2010.

GRZESIAK, B. et al. The Effect of Some Natural Essential Oils Against Bovine Mastitis Caused by *Prototheca zopfii* Isolates In Vitro. **Mycopathologia**, v. 183, n. 3, p. 541–550, 2018.

HENRIQUE, P. et al. Mastite bovina causada por *Prototheca* spp. em Jí-Paraná, Rondônia - relato de caso. **Veterinária em Foco**, v. 13, n. 1, p. 37–43, 2015.

HOBLEY, L. et al. Giving structure to the biofilm matrix: An overview of individual strategies and emerging common themes. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 39, n. 5, p. 649–669, 2015.

HÜBNER, N. O.; KRAMER, A. Review on the efficacy, safety and clinical applications of polihexanide, a modern wound antiseptic. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 23, n. SUPPL. 1, p. 17–27, 2010.

JAGIELSKI, T. et al. Genotyping of bovine Prototheca mastitis isolates from Poland. **Veterinary Microbiology**, v. 149, n. 1–2, p. 283–287, 2011.

JAGIELSKI, T. et al. Multicentre Etest evaluation of in vitro activity of conventional antifungal drugs against European bovine mastitis *Prototheca* spp. isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 8, p. 1945–1947, 2012.

JAGIELSKI, T. et al. The activity of silver nanoparticles against microalgae of the Prototheca genus. **Nanomedicine**, v. 13, n. 9, p. 1025–1036, 2018a.

JAGIELSKI, T. et al. Cytb as a new genetic marker for differentiation of prototheca species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 10, p. 1–19, 2018b.

JAGIELSKI, T. et al. The genus Prototheca (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) revisited: Implications from molecular taxonomic studies. **Algal Research**, v. 43, n. March, p. 1–19, 2019a.

JAGIELSKI, T. et al. Prevalence of *Prototheca* spp. on dairy farms in Poland – a cross-country study. **Microbial Biotechnology**, v. 12, n. 3, p. 556–566, 2019b.

JAGIELSKI, T. et al. A survey on the incidence of Prototheca mastitis in dairy herds in Lublin province, Poland. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 1, p. 619–628, 2019c.

JAGIELSKI, T.; LAGNEAU, P. E. Protothecosis. A pseudofungal infection. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 17, n. 4, p. 261–270, 2007.

JÁNOSIL, S. et al. *Prototheca zopfii* mastitis in dairy herds under continental climatic conditions. **Veterinary Quarterly**, v. 23, n. 2, p. 80–83, 2001a.

JÁNOSIL, S. et al. Review of the microbiological, pathological, and clinical aspects of bovine mastitis caused by the alga *Prototheca zopfii*. **Veterinary Quarterly**, v. 23, n. 2, p. 58–61, 2001b.

KACZOREK, E. et al. Biofilm production and other virulence factors in Streptococcus spp. isolated from clinical cases of bovine mastitis in Poland. **BMC Veterinary Research**, v. 13, n. 1, p. 1–7, 2017.

KAMARUZZAMAN, N. F. et al. Bactericidal and anti-biofilm effects of polyhexamethylene Biguanide in models of intracellular and biofilm of Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. AUG, p. 1–10, 2017.

KAMARUZZAMAN, N. F. et al. Polyhexamethylene biguanide and nadifloxacin self-assembled nanoparticles: Antimicrobial effects against intracellular methicillin-resistant Staphylococcus aureus. **Polymers**, v. 10, n. 521, p. 1–15, 2018.

KAMARUZZAMAN, N. F.; FIRDESSA, R.; GOOD, L. Bactericidal effects of polyhexamethylene biguanide against intracellular Staphylococcus aureus EMRSA-15 and USA 300. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 5, p. 1252–1259, 2016.

KANO, R. Emergence of Fungal-Like Organisms: Prototheca. **Mycopathologia**, v. 185, n. 4, p. 747–754, 2019.

KRAMER, A. et al. Re-evaluation of polihexanide use in wound antisepsis in order to clarify ambiguities of two animal studies. **Journal of Wound Care**, v. 28, n. 4, p. 246–255, 2019.

KRUKOWSKI, H. et al. Susceptibility of *Prototheca zopfii* strains isolated from cows with mastitis to chlorhexidine and iodine. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 37, n. 1, p. 106–108, 2013.

KUNTHIPHUN, S. et al. *Prototheca paracutis* sp. nov., a novel oleaginous achlorophyllous microalga isolated from a mangrove forest. **Mycoscience**, v. 60, n. 3, p. 165–169, 2019.

KURIAN, J.; BOLLA, N.; DAMARAJU, B. Comparative evaluation of effectiveness of sodium dichloroisocyanurate and calcium hydroxide against candida albicans. **Journal of**

Contemporary Dental Practice, v. 13, n. 5, p. 665–670, 2012.

KURUMISAWA, T. et al. Is bovine protothecal mastitis related to persistent infection in intestine? **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 80, n. 6, p. 950–952, 2018.

KWIECINSKI, J. Biofilm formation by pathogenic Prototheca algae. **Letters in Applied Microbiology**, v. 61, n. 6, p. 511–517, 2015.

LANGONI, H. Qualidade do leite: Utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 33, n. 5, p. 620–626, 2013.

LANGONI, H. et al. Considerações sobre o tratamento das mastites. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 37, n. 11, p. 1261–1269, 2017.

LASS-FLÖRL, C.; MAYR, A. Human protothecosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 2, p. 230–242, 2007.

LEITE, R. F. et al. Antimicrobial activity of polyhexamethylene biguanide nanoparticles against mastitis-causing Staphylococcus aureus. **JDS Communications**, v. 2, n. 5, p. 262–265, 2021.

LEPELLETIER, D. et al. Povidone Iodine: Properties, Mechanisms of Action, and Role in Infection Control and Staphylococcus aureus Decolonization. **Oral Oncology**, v. 105, n. 9, p. 581–593, 2020.

LIAQAT, I. Biofilm Formation, Maturation and Prevention: A Review. **Journal of Bacteriology and Mycology**, v. 6, n. 1, p. 1–4, 15 jan. 2019.

LOPES, B. C.; MANZI, M. de P.; LANGONI, H. Etiologia das mastites: Pesquisa de micro-organismos da classe mollicutes. **Veterinária e Zootecnia**, v. 25, n. 1, p. 173–179, 2018.

LOPES, M. M. et al. In vitro antimicrobial susceptibility of *Prototheca* spp. isolated from bovine mastitis in a Portugal dairy herd. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 18, n. 4, p. 205–209, 2008.

LUETHY, P. M.; ZELAZNY, A. M. Rapid one-step extraction method for the identification of molds using MALDI-TOF MS. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 91, n. 2, p. 130–135, 2018.

MARCHAND, S. et al. Biofilm Formation in Milk Production and Processing Environments; Influence on Milk Quality and Safety. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, n. 2, p. 133–147, 2012.

MARQUES, S. et al. Short communication: In vitro antimicrobial susceptibility of *Prototheca wickerhamii* and *Prototheca zopfii* isolated from bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 11, p. 4202–4204, 2006.

MARQUES, S. et al. Bovine mastitis associated with *Prototheca blaschkeae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 6, p. 1941–1945, 2008.

MARQUES, S. et al. Internal transcribed spacer sequence-based rapid molecular identification of *Prototheca zopfii* and *Prototheca blaschkeae* directly from milk of infected cows. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 5, p. 3001–3009, 2015.

MASUDA, M. et al. *Prototheca miyajii* sp. nov., isolated from a patient with systemic protothecosis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 1510–1520, 2016.

MAYORGA, J. et al. Protothecosis. **Clinics in Dermatology**, v. 30, n. 4, p. 432–436, 2012.

MCDONNELL, G.; RUSSELL, A. D. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 1, p. 147–179, 1999.

MELCHIOR, M. B.; VAARKAMP, H.; FINK-GREMMELS, J. Biofilms: A role in recurrent mastitis infections? **Veterinary Journal**, v. 171, n. 3, p. 398–407, 2006.

MELVILLE, P. A. et al. Susceptibility and features of the ultrastructure of *Prototheca zopfii* following exposure to copper sulphate, silver nitrate and chlorexidine. **Mycopathologia**, v. 156, n. 1, p. 1–7, 2002.

MELVILLE, P. A. et al. Susceptibility and features of the ultrastructure of *Prototheca zopfii* following exposure to copper sulphate, silver nitrate and chlorexidine. **Mycopathologia**, v. 156, n. 1, p. 1–7, 2003.

MESSICK, C. R. et al. In-vitro activity of polyhexamethylene biguanide (PHMB) against fungal isolates associated with infective keratitis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 44, n. 2, p. 297–298, 1999.

MILANOV, D. et al. Mastitis associated with *Prototheca zopfii* - An emerging health and economic problem on dairy farms. **Journal of Veterinary Research (Poland)**, v. 60, n. 4, p. 373–378, 2016.

MOORE, K.; GRAY, D. Using PHMB antimicrobial to prevent wound infection. **Wounds UK**, v. 3, n. 2, p. 96–102, 2007.

MORANDI, S. et al. Molecular typing and differences in biofilm formation and antibiotic susceptibilities among Prototheca strains isolated in Italy and Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 8, p. 6436–6445, 2016.

MÜLLER, G.; KRAMER, A. Biocompatibility index of antiseptic agents by parallel assessment of antimicrobial activity and cellular cytotoxicity. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 6, p. 1281–1287, 2008.

MURUGAIYAN, J. et al. Establishment of a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry database for rapid identification of infectious achlorophyllous green micro-algae of the genus Prototheca. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 5, p. 461–467, 2012.

MURUGAIYAN, J. et al. MALDI spectra database for rapid discrimination and subtyping of Mycobacterium kansasii. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. APR, p. 1–10, 2018.

NADELL, C. D.; XAVIER, J. B.; FOSTER, K. R. The sociobiology of biofilms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 33, n. 1, p. 206–224, 2009.

NAGATSUKA, Y. et al. *Prototheca tumulicola* sp. nov., a novel achlorophyllous, yeast-like microalga isolated from the stone chamber interior of the Takamatsuzuka Tumulus. **Mycoscience**, v. 58, n. 1, p. 53–59, 2017.

NARDONI, S. et al. In vitro activity of 30 essential oils against bovine clinical isolates of *Prototheca zopfii* and *Prototheca blaschkeae*. **Veterinary Sciences**, v. 5, n. 45, p. 1–13, 2018.

NEILSON, R. et al. MASTITE CLÍNICA EM BOVINO CAUSADA POR *Prototheca zopfii* NO ESTADO DO CEARÁ. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 4, n. 4, p. 307–311, 2011.

NOTCOVICH, S. et al. Biofilm-forming potential of Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis in New Zealand. **Veterinary Sciences**, v. 5, n. 8, p. 1–5, 2018.

OSUMI, T. et al. *Prototheca zopfii* genotypes isolated from cow barns and bovine mastitis in Japan. **Veterinary Microbiology**, v. 131, n. 3–4, p. 419–423, 2008.

OVIEDO-BOYSO, J. et al. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. **Journal of Infection**, v. 54, n. 4, p. 399–409, 2007.

PALMER, J.; FLINT, S.; BROOKS, J. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 9, p. 577–588, 2007.

PARK, H. S. et al. Short communication: Occurrence and persistence of *Prototheca zopfii* in dairy herds of Korea. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 3, p. 2539–2543, 2019.

PIEPER, L. et al. Herd characteristics and cow-level factors associated with Prototheca mastitis on dairy farms in Ontario, Canada. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 10, p. 5635–5644, 2012.

PORE, R. S. et al. Prototheca ecology. **Mycopathologia**, v. 81, n. 1, p. 49–62, 1983.

PORE, R. S. Prototheca taxonomy. **Mycopathologia**, v. 90, n. 3, p. 129–139, 1985.

PORE, R. S.; SHAHAN, T. A. *Prototheca zopfii*: Natural, transient, occurrence in pigs and rats. **Mycopathologia**, v. 101, n. 2, p. 85–88, 1988.

RABIEE, A. R.; LEAN, I. J. The effect of internal teat sealant products (Teatseal and Orbeseal) on intramammary infection, clinical mastitis, and somatic cell counts in lactating dairy cows: A meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 11, p. 6915–6931, 2013.

RABIN, N. et al. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. **Future Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 4, p. 493–512, 1 mar. 2015.

RASMUSSEN, T. B.; GIVSKOV, M. Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 296, n. 2–3, p. 149–161, 2006.

RIBEIRO, M. G. et al. Microrganismos patogênicos, celularidade e resíduos de antimicrobianos no leite bovino produzido no sistema orgânico. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 52–58, 2009.

RIBEIRO, M. G. . et al. Mastite em animais de produção. In: **Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia PP - Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro: Roca, 2016. p. 1154–1205.

RICCHI, M. et al. Molecular characterization of Prototheca strains isolated from Italian dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 10, p. 4625–4631, 2010.

RICCHI, M. et al. First outbreak of bovine mastitis caused by *Prototheca blaschkeae*. **Veterinary Microbiology**, v. 162, n. 2–4, p. 997–999, 2013.

ROESLER, U. et al. 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 of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1419–1425, 2006.

RUEGG, P. L. Mastitis in Dairy Cows. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 28, n. 2, p. xi–xii, 2012.

SALERNO, T. et al. In vitro algaecide effect of sodium hypochlorite and iodine based antiseptics on *Prototheca zopfii* strains isolated from bovine milk. **Research in Veterinary Science**, v. 88, n. 2, p. 211–213, 2010.

SANTOS, M. V. dos; FONSECA, L. F. L. da. **Controle da mastite e qualidade do leite: desafios e soluções**. Pirassununga: Edição dos autores, 2019.

SATPATHY, S. et al. Review on bacterial biofilm: An universal cause of contamination. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, n. October 2019, p. 56–66, 2016.

SCACCABAROZZI, L. et al. Short communication: Isolation of Prototheca species strains from environmental sources in dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 9, p. 3474–3477, 2008.

SCHÖNBORN, S. et al. In vitro ability of mastitis causing pathogens to form biofilms. **Journal of Dairy Research**, v. 84, n. 2, p. 198–201, 2017.

SCHUBERT, R. Disinfectant properties of new povidone-iodine preparations. **Journal of Hospital Infection**, v. 6, n. SUPPL. 1, p. 33–36, 1985.

SEUYLEMEZIAN, A. et al. Development of a custom MALDI-TOF MS database for species-level identification of bacterial isolates collected from spacecraft and associated surfaces. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. MAY, p. 1–8, 2018.

SHAHID, M. et al. Characterization of *Prototheca zopfii* Genotypes Isolated from Cases of Bovine Mastitis and Cow Barns in China. **Mycopathologia**, v. 181, n. 3–4, p. 185–195, 2016.

SHAHID, M. et al. *Prototheca zopfii* induced ultrastructural features associated with apoptosis in bovine mammary epithelial cells. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. JUL, p. 1–14, 2017.

SHAVE, C. D.; MILLYARD, L.; MAY, R. C. Now for something completely different: Prototheca, pathogenic algae. **PLoS pathogens**, v. 17, n. 4, p. 1–7, 2021.

SIQUEIRA, A. K.; RIBEIRO, M. G.; SALERNO, T. Prototecose em animais de companhia e aspectos da doença no homem. **Ciencia Rural**, v. 38, n. 6, p. 1794–1804, 2008.

SKOWRON, K. et al. Comparison of the effectiveness of dipping agents on bacteria causing mastitis in cattle. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 26, n. 1, p. 39–45, 2019.

SOBUKAWA, H. et al. In vitro algaecide effect of disinfectants on *Prototheca zopfii* genotypes 1 and 2. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 73, n. 11, p. 1527–1529, 2011.

SOBUKAWA, H. et al. Rapid molecular typing of *Prototheca zopfii* by high resolution melting real-time PCR(PCR-HRM). **Japanese Journal of Medical Mycology**, v. 54, n. 4, p. 341–344, 2013.

SOWLATI-HASHJIN, S. et al. Insights into the Polyhexamethylene Biguanide (PHMB) Mechanism of Action on Bacterial Membrane and DNA: A Molecular Dynamics Study. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 124, n. 22, p. 4487–4497, 2020.

SPEROTTO, V. R. et al. Short communication: Algicide activity of antimicrobial peptides compounds against *Prototheca bovis*. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 3, p. 3554–3558, 2021.

STEPANOVIĆ, S. et al. Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by Salmonella spp. **Food Microbiology**, v. 20, n. 3, p. 339–343, 2003.

STOODLEY, P. et al. Biofilms as Complex Differentiated Communities. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 187–209, 2002.

SUVAJDŽIĆ, L. et al. Activity of Serbian Aronia prunifolia against *Prototheca wickerhamii* and *Prototheca zopfii*. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 45, n. 1, p. 9, 2017.

TODD, J. R. et al. Medical phycology 2017. **Medical mycology**, v. 56, n. 1, p. S188–S204, 2018.

TOLEDO BACH, A. et al. Eficácia Do Uso De Desinfetantes No Manejo De Ordenha De Vacas Leiteiras No Controle Da Mastite E Seus Agentes Infecciosos – Revisão Bibliográfica. **Revista Científica Rural**, v. 21, n. 1, p. 188–204, 2019.

TOMASINSIG, L. et al. Comparative activity and mechanism of action of three types of bovine antimicrobial peptides against pathogenic Prototheca spp. **Journal of Peptide Science**, v. 18, n. 2, p. 105–113, 2012.

TORTORANO, A. M. et al. In vitro activity of conventional antifungal drugs and natural essences against the yeast-like alga Prototheca. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 6, p. 1312–1314, 2008.

TSUJI, H. et al. An isolate of *Prototheca wickerhamii* from systemic canine protothecosis. **Veterinary Microbiology**, v. 118, n. 3–4, p. 305–311, 2006.

VERT, M. et al. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). **Pure and Applied Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 377–410, 2012.

VINCE, A. R. et al. Case Report Rapport de cas Protothecosis in a dog. **Canine veterinary journal**, v. 55, n. October, p. 1–5, 2014.

VON BERGEN, M. et al. Identification of harmless and pathogenic algae of the genus Prototheca by MALDI-MS. **Proteomics - Clinical Applications**, v. 3, n. 7, p. 774–784, 2009.

WAWRON, W. et al. Outbreak of protothecal mastitis in a herd of dairy cows in Poland. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 57, n. 3, p. 335–339, 2013.

WESSELS, S.; INGMER, H. Modes of action of three disinfectant active substances: A review. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 67, n. 3, p. 456–467, 2013.

YAMAMURA, A. A. M. et al. Isolamento de *Prototheca* spp. de vacas com mastite, de leite de tanques de expansão e do ambiente dos animais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 1, p. 105, 2007.

ZHANG, H. min et al. Evaluation of a povidone-iodine and chitosan-based barrier teat dip in the prevention of mastitis in dairy cows. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 20, n. 6, p. 1615–1625, 2021.