

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E
ZOOTECNIA

**IDENTIFICAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MALDI-
TOF MS) E EFEITO *IN VITRO* DO QUATERNÁRIO DE AMÔNIO
EM ISOLADOS DE *Prototheca* OBTIDOS DE MASTITE BOVINA**

MARCELO FAGALI ARABE FILHO

BOTUCATU, SP
Janeiro, 2023

**IDENTIFICAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MALDI-TOF MS) E
EFEITO *IN VITRO* DO QUATERNÁRIO DE AMÔNIO EM ISOLADOS DE
Prototheca OBTIDOS DE MASTITE BOVINA**

MARCELO FAGALI ARABE FILHO

Dissertação apresentada à banca
examinadora para obtenção do
título de Mestre em Medicina
Veterinária

Programa de Pós Graduação em
Medicina Veterinária –
FMVZ/UNESP-Botucatu, SP.

Orientador: Prof. Titular Márcio
Garcia Ribeiro

Coorientador: Dr. Mateus de
Souza Ribeiro Mioni

BOTUCATU, SP
Janeiro, 2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Arabe Filho, Marcelo Fagali.

Identificação por espectrometria de massas (MALDI-TOF MS) e efeito in vitro do quaternário de amônio em isolados de Prototheca obtidos de mastite bovina / Marcelo Fagali Arabe Filho. - Botucatu, 2023

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

Orientador: Márcio Garcia Ribeiro

Coorientador: Mateus de Souza Ribeiro Mioni

Capes: 50502034

1. Mastite. 2. Herbicidas - Efeito fisiológico.
3. Espectrometria de massa. 4. Compostos de amônio quaternário. 5. Prototheca.

Palavras-chave: Efeito algicida; Gravidade clínica; MALDI-TOF MS; Prototheca bovis.

Nome do autor: Marcelo Fagali Arabe Filho

Título: **IDENTIFICAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MALDI-TOF MS) E EFEITO *IN VITRO* DO QUATERNÁRIO DE AMÔNIO EM ISOLADOS DE *Prototheca* OBTIDOS DE MASTITE BOVINA**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Titular Márcio Garcia Ribeiro

Presidente e Orientador

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva
FMVZ-UNESP, Botucatu, SP

Prof. Titular Helio Langoni

Membro

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva
FMVZ-UNESP, Botucatu, SP

Prof. Titular Marcos Veiga dos Santos

Membro

Departamento de Nutrição e Produção Animal
FMVZ-USP/Pirassununga, SP

Data da defesa: 27 de janeiro de 2023

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 Reclassificação filogenética e propriedades gerais de algas do gênero <i>Prototheca</i>	12
2.2 Aspectos da epidemiologia nas infecções por <i>Prototheca</i> em animais	13
2.3 Mastite bovina por <i>Prototheca</i> sp.	14
2.4 Diagnóstico da mastite bovina por <i>Prototheca</i> sp.	16
2.5 Ensaio <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> visando o tratamento/profilaxia da mastite por <i>P. bovis</i>	17
2.5.1 Quaternário de amônio	17
2.6 Prototecose Humana	18
3. OBJETIVOS	20
3.1 Geral	20
3.2 Específicos	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 Comissão de Ética	21
4.2 Isolados	21
4.3 Animais e fazendas	21
4.4 Diagnóstico da mastite clínica, classificação de escores de gravidade e colheita de amostras	22
4.5 Cultivo microbiológico	22
4.6 Caracterização fenotípica de <i>Prototheca</i> sp.	23
4.7 <i>Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry</i> (MALDI-TOF MS)	23
4.8 Concentração algicida mínima (CAM) <i>in vitro</i> do quaternário de amônio	24
4.8.1 Preparo dos inóculos	24
4.8.2 CAM <i>in vitro</i> do quaternário de amônio	24
4.10. Análise estatística	25
5. RESULTADOS	26
5.1 Prevalência e identificação microbiológica de <i>Prototheca</i> sp. nos animais	26
5.2 Concentração Algicida Mínima (CAM) <i>in vitro</i> do quaternário de amônio nos isolados de <i>Prototheca</i> spp.	28
8. REFERÊNCIAS	37

Anexo 1.....	49
Anexo 2.....	50
Anexo 3.....	51
Anexo 4.....	52

ARABE FILHO, M. F. Identificação por espectrometria de massas (MALDI-TOF MS) e efeito *in vitro* do quaternário de amônio em isolados de *Prototheca* obtidos de mastite bovina. **Botucatu, 2023. 55p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP.**

RESUMO

A mastite bovina causada por algas do gênero *Prototheca* causa prejuízos significativos aos produtores devido a redução na produção e qualidade do leite, e necessidade de segregação, descarte e reposição de animais infectados pois, até o momento, não existe tratamento eficaz contra o agente; fato que tem motivado ensaios *in vitro* com diferentes fármacos com efeito algicida em isolados de *Prototheca* obtidos de vacas com mastite. Ainda, métodos moleculares têm possibilitado o diagnóstico rápido e fidedigno de espécies da alga, em virtude das dificuldades da especiação por métodos fenotípicos. Neste cenário, 4.275 amostras de leite de vacas com mastite clínica amostradas em dez fazendas de alta produção leiteira foram submetidas ao cultivo microbiológico. Os casos clínicos foram classificados quanto a gravidade em leves, moderados e graves. Isolados compatíveis com o gênero *Prototheca* foram submetidos à identificação a nível de espécies por espectrometria de massas (*Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry* - MALDI-TOF MS) e a concentração algicida mínima (CAM) *in vitro* diante do quaternário de amônio (15%). Foram isoladas 44 prototecas (44/4.275=1,02%) de vacas diferentes, das quais 88,6% (39/44) foram diagnosticadas como *P. bovis*, enquanto 11,3% (5/44) apresentaram identificação somente em nível de gênero (*Prototheca* sp.) pelo MALDI-TOF MS. Os escores de gravidade clínica 1 e 2 disponíveis em 33 vacas foram observados em 78,8% (26/33) e 21,2% (7/33) das infecções mamárias, respectivamente, com nenhum animal apresentando escore grave ou sinais sistêmicos. O quaternário de amônio apresentou efeito *in vitro* em 100% (44/44) dos isolados obtidos das vacas, em diferentes concentrações, bem como em três cepas de referência (*i.e.*, *P. bovis*, *P. blaschkeae* e *P. ciferrii*). Nas concentrações de 35ppm, 17ppm e 8ppm ocorreu efeito algicida do quaternário de amônio em 20,4% (9/44), 36,4% (16/44) e 43,2% (19/44) nos 44 isolados obtidos das vacas, respectivamente. Infere-se o predomínio da espécie *P. bovis* na mastite clínica em vacas, em grandes fazendas de leite, e o efeito algicida do quaternário de amônio em baixas concentrações, indicando a possibilidade de uso deste sanitizante no ambiente de ordenha ou como solução de pré e pós-*dipping* na profilaxia/controle da alga nas fazendas. Resultados do presente estudo contribuem com a identificação molecular de espécies de *Prototheca*, com a classificação da gravidade clínica dos casos, e com o efeito algicida do quaternário de amônio, utilizado pela primeira vez em estudo *in vitro* diante de isolados da alga obtidos de vacas com mastite clínica.

Palavras-chave: efeito algicida, *Prototheca bovis*, gravidade clínica, MALDI-TOF MS.

ARABE FILHO, M. F. **MASS SPECTROMETRY-BASED SPECIATION (MALDI-TOF MS) AND *IN VITRO* EFFECT OF QUATERNARY AMMONIUM IN *Prototheca* ISOLATES OBTAINED FROM BOVINE MASTITIS.** Botucatu, 2023. 55p. Dissertation (Master's degree) - Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu Campus, Paulista State University - UNESP.

ABSTRACT

Bovine mastitis caused by algae of the genus *Prototheca* causes significant losses to dairy farmers due to a decrease in milk quality and yield, the need for segregation, culling, and replacement of infected animals since, to date, there is no effective treatment against the agent; a fact that has motivated *in vitro* studies with different drugs with algaecide effect on bovine mastitis-causing *Prototheca*. Also, molecular methods have enabled the quick and reliable diagnosis of algae species, due to the difficulties of speciation based on traditional phenotypic methods. In this scenario, 4,275 milk samples from cows with clinical mastitis sampled in ten high-production dairy farms were subjected to microbiological culture, where clinical cases were scored as mild, moderate, or severe. Isolates compatible with the genus *Prototheca* were subjected to species characterization by mass spectrometry (Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry - MALDI-TOF MS) and *in vitro* Minimum Algaecide Concentration (MAC) against the quaternary ammonium (15%). Forty-four *Prototheca* isolates were isolated (44/4,275=1.02%) of non-repetitive cows, where 88.6% (39/44) were diagnosed as *P. bovis*, while 11.3% (5/44) were identified only at the genus-level (*Prototheca* sp.) by MALDI-TOF MS. Mild and moderate severity scores available in 33 cows were observed in 78.8% (26/33) and 21.2% (7/33) of mammary infections, respectively, whereas any cow showed severity score or systemic signs. The quaternary ammonium showed an *in vitro* effect in 100% (44/44) of the isolates obtained from cows, at different concentrations, as well as in three reference strains (*i.e.*, *P. bovis*, *P. blaschkeae*, and *P. ciferrii*) used in the study. At concentrations of 35ppm, 17ppm, and 8, the algaecide effect of quaternary ammonium was observed in 20.4% (9/44), 36.4% (16/44), and 43.2% (19/44) among 44 isolates obtained from cows, respectively. A predominance of *P. bovis* species in the clinical mastitis cases was seen, even in large dairy farms, and an algicide effect of quaternary ammonium at low concentrations, indicating its potential use as a sanitizing to the milking environment, or in pre- and post-dipping solutions aiming algae prophylaxis and control at dairy farms. Our results contribute to the molecular identification of *Prototheca* isolates at the species-level, clinical severity scoring, and algicide effect of quaternary ammonium used for the first time *in vitro* against algae isolated from clinical cases of bovine mastitis.

Keywords: algaecide effect, *Prototheca bovis*, clinical severity scores, MALDI-TOF MS.

1. INTRODUÇÃO

Microalgas do gênero *Prototheca* são micro-organismos eucarióticos, saprófitas e unicelulares, que se reproduzem assexuadamente pela formação de endósporos (JAGIELSKI et al., 2019a). São organismos que não possuem capacidade fotossintética fato que, provavelmente, induziu a nutrição heterotrófica, possibilitando a infecção de animais e humanos (SHAVE et al., 2021).

Nos animais domésticos, a manifestação clínica mais frequente é a mastite bovina (RUEGG, 2016, 2017). Nas últimas décadas, tem-se observado aumento da ocorrência de casos de prototecose mamária em vários países (PIEPER et al., 2012; MORANDI et al., 2017; JAGIELSKI et al., 2019a; PARK et al., 2019; LI et al., 2021; HUILCA et al., 2022), incluindo no Brasil (GONÇALVES et al., 2015; ALVES et al., 2017).

Prototheca sp. predominam em áreas úmidas contendo fezes, matéria orgânica em decomposição e água estagnada, cama dos animais, ou contaminando utensílios de ordenha, favorecendo infecções mamárias em vacas a partir do ambiente (YAMAMURA et al., 2008; SPEROTTO et al., 2021). A prototecose mamária acarreta prejuízos significativos para os produtores, com a redução na produção e qualidade do leite, aumento da celularidade do leite, perda de quartos mamários, descarte prematuro de animais, gastos com medicamentos, honorários veterinários e reposição de animais (LANGONI et al., 2013; SANTOS e FONSECA, 2019; RIBEIRO, 2021).

Os casos de mastite por *Prototheca* se caracterizam por infecções predominantemente clínicas, de evolução crônica, geralmente restritos a anormalidades no leite e glândula mamária e, ocasionalmente, sistêmicos (JANOSI et al., 2001; RUEGG, 2016). A gravidade clínica da mastite é subdividida em infecções leves, moderadas e graves, e tem sido investigada com foco na relação com fatores de virulência dos patógenos e no tratamento do agente (PINZÓN-SÁNCHEZ e RUEGG, 2011; GUERRA et al., 2020), embora tal classificação de gravidade dos casos não tenha sido objeto de estudo em infecções mamárias por prototecas em vacas.

Diferentes antimicrobianos (JAGIELSKI et al., 2012; MORANDI et al., 2016), antifúngicos (BUZZINI et al., 2008), sanitizantes (MELVILLE et al., 2002; SALERNO et al., 2010; GONÇALVES et al., 2015; ALVES et al., 2017; ELY et al., 2020; SPEROTTO et al., 2021), extratos naturais (LANGONI et al., 2013), óleos essenciais (NARDONI et al., 2018), polipeptídios (TOMASINSIG et al., 2012), nanopartículas (JAGIELSKI et al., 2018) e herbicidas (MORELLO et al., 2020) foram testados *in vitro* e *in vivo* em vacas infectadas por espécies de *Prototheca*. No entanto, até o momento, nenhum protocolo terapêutico tem se mostrado totalmente eficaz (BOZZO et al., 2022; TASHAKKORI et al., 2022), reduzindo temporariamente os sinais clínicos, embora os animais permaneçam como fontes de infecção nos rebanhos (SANTOS e FONSECA, 2019; RIBEIRO, 2021).

Postula-se que a indução de reações piogranulomatosas (McDONALD et al., 1984; RIBEIRO et al., 2016), o desenvolvimento de biofilmes (GONÇALVES et al., 2015; ELY et al., 2019) e a indução de apoptose das células mamárias (ZHAO et al., 2022) possam influenciar na baixa eficácia terapêutica de fármacos convencionais nos focos das lesões mamárias causadas por prototecas em vacas. Com efeito, a segregação e o descarte de vacas infectadas, além da adoção de medidas preventivas para agentes de origem ambiental de mastite permanecem como ações recomendadas na profilaxia e controle nos rebanhos (RUEGG, 2016; SANTOS e FONSECA, 2019; RIBEIRO, 2021).

Os compostos a base de quaternário de amônio são fármacos surfactantes catiônicos comumente utilizados como antissépticos e desinfetantes em medicina humana e veterinária, devido à potente capacidade microbida (McDONNELL e RUSSELL, 1999), baixa toxicidade e boa estabilidade, além de biodegradáveis, inodoros, pouco corrosivos e de baixa irritação cutânea (CARVALHO, 2015). O conjunto destas características possibilitam seu uso na desinfecção doméstica, agrícola, hospitalar, em indústrias de alimentos e instalações de animais, bem como em piscinas, em virtude da baixa irritação para conjuntivas e mucosas em baixas concentrações (TEZEL e PAVLOSTATHIS, 2015).

O quaternário de amônio atua diretamente na membrana celular causando desnaturação das proteínas da membrana e citoplasma dos micro-

organismos (McDONNELL e RUSSELL, 1999; DOMINGUES e LANGONI, 2001; BOROWSKY et al., 2006). Apesar do conhecido efeito microbicida do quaternário de amônio, não foram encontrados, na literatura consultada, estudos avaliando o efeito *in vitro* deste sanitizante em isolados de *Prototheca* obtidos de casos de mastite em vacas.

O diagnóstico de rotina da prototecose mamária bovina é baseado no cultivo microbiológico, características das colônias, métodos fenotípicos (bioquímicos e assimilação de substratos) e micrometria da alga (ROESLER et al., 2006; LANGONI et al., 2013; SANTOS e FONSECA, 2019; RIBEIRO, 2021). Nas últimas décadas, técnicas moleculares como PCR e sequenciamento genético têm possibilitado a classificação fidedigna de espécies (TASHAKKORI et al., 2022). Neste contexto, a reclassificação filogenética da alga foi proposta recentemente baseada no gene mitocondrial *cytB*, subdividindo o gênero em 14 espécies, das quais predominantemente *Prototheca bovis* (*P. zopfii* genótipo 2) e, ocasionalmente, *Prototheca blaschkeae*, têm sido relacionadas a mastite bovina (JAGIELSKI et al., 2019a). Ainda, estudo recente no Brasil modificou a extração de proteínas ribossomais de isolados de prototeca obtidos de casos de mastite bovina, possibilitando a inserção na biblioteca de espectros de referência da alga, visando o diagnóstico de rotina por espectrometria de massas pelo método de *Matrix-assisted laser desorption ionization-time-of flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS) (FIDELIS et al., 2021).

Certas espécies de *Prototheca* possuem potencial zoonótico (KANO, 2019), podendo causar infecções cutâneas secundárias a lesões traumáticas (LASS-FLÖRL e MAYR, 2007) e enterites em humanos pelo consumo de leite contaminado (BOZZO et al., 2022), bem como infecções sistêmicas como encefalite (ZAK et al., 2012), bursite (BOSSCHE et al., 2012) e hepatite (MIN et al., 2013), merecendo atenção no contexto de Saúde Única (LIBISCH et al., 2022).

Neste cenário, o presente estudo investigou o efeito algicida *in vitro* do quaternário de amônio, e a especiação por espectrometria de massas (MALDI-TOF MS) de isolados de *Prototheca* obtidos de vacas com mastite clínica, cujos escores de gravidade dos casos foram investigados, devido à ausência de

dados na literatura que demonstrem compostos seguros capazes de inativar a alga em casos de mastite bovina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Reclassificação filogenética e propriedades gerais de algas do gênero *Prototheca*

Microalgas do gênero *Prototheca* estão agrupadas no reino Viridiplantae, família Chlorellaceae, e foram descritas pioneiramente por Wilhelm Krüger, em 1894, na Alemanha (PORE et al., 1985). Caracterizam-se como micro-organismos eucarióticos, saprófitos, unicelulares e aclorofilados, acometendo animais e humanos. Postula-se que, durante o processo evolutivo, esta alga perdeu a capacidade de fotossíntese, necessitando de nutrição heterotrófica, possibilitando a infecção de animais e humanos (SHAVE et al., 2021).

Recentemente, foi proposta uma reclassificação taxonômica da alga com base no gene mitocondrial *cytB*, subdividindo o gênero *Prototheca* em 14 espécies bem definidas, a saber: *P. ciferrii* (anteriormente *P. zopfii* genótipo 1 ou biovar 1), *P. bovis* (anteriormente *P. zopfii* genótipo 2 ou biovar 2), *P. blaschkeae* (anteriormente biovar 3), *P. wickerhamii*, *P. cutis*, *P. miyajii*, *P. moriformis* (anteriormente *P. ulmea*), *P. stagnora*, *P. tumulicola*, *P. cookei*, *P. pringsheimii*, *P. xanthoriae* e *P. cerasi* (JAGIELSKI et al., 2019a)*.

As prototecas são algas imóveis e aeróbicas, utilizando a glicose como principal fonte de carbono. O micro-organismo se reproduz assexuadamente pela formação de estruturas denominadas endósporos. Durante o processo reprodutivo, após a infecção nas células mamárias, são observadas células-mãe (esporângios) contendo células filhas (endósporos ou esporangiosporos) no citoplasma da alga (2 a 16 células-filhas), envoltos por cápsula espessa (RIBEIRO, 2021).

*A título de citação das espécies de *Prototheca* neste estudo, será adotada a nova classificação taxonômica supracitada.

O patógeno varia de tamanho conforme a espécie (7 e 30 μm), apresentando formas esféricas, ovaladas ou alongadas, contendo endósporos de aspecto arredondado ou em mórulas. Na micrometria, *P. wickerhamii* apresenta entre 3-10 μm , com formato mais alongado, enquanto *P. bovis* varia de 7-30 μm , com aspecto esférico ou alongado (PORE, 1985; JÁNOSI et al., 2001; JAGIELSKI e LAGNEU, 2007).

Os mecanismos de virulência da alga não são completamente estabelecidos (CAMBOIM et al., 2010), embora aceite-se que a indução de reações piogranulomatosas (RIBEIRO, 2021), a formação de biofilmes e a indução de apoptose (SHAHID et al., 2017; ZHAO et al., 2022) dificultem a resolução tecidual das infecções mamárias, tendendo a processos de evolução crônica (McDONALD et al., 1984; ELY et al., 2019).

2.2 Aspectos da epidemiologia nas infecções por *Prototheca* em animais

A prototecose em animais e humanos tem sido descrita no continente europeu, Ásia, África, Oceania e Américas (JAGIELSKI e LAGNEAU, 2007).

Bovinos, cães e gatos são as principais espécies domésticas acometidas nas infecções por prototecas (RIBEIRO, 2021). Casos esporádicos têm sido observados em caprinos e animais selvagens/silvestres (serpentes, peixes, castores e morcegos) (HOLLINGSWORTH, 2000).

Lesões traumáticas cutâneas e ingestão são as principais vias de transmissão do patógeno para os animais de companhia, enquanto para vacas, as infecções ocorrem majoritariamente por via ascendente canal do teto - a partir do ambiente – embora, ocasionalmente, o agente possa ser ingerido da água e alimentos contaminados (RIBEIRO, 2021).

P. bovis e, menos comumente, *P. blaschkeae* têm sido reconhecidas como as principais espécies relacionadas a mastite bovina, enquanto *P. ciferrii* tem sido encontrada no ambiente de criatórios de vacas de leite. *P. wickerhamii*, *P. cutis* e *P. miyajii* predominam nas infecções em humanos, enquanto as demais espécies têm sido encontradas em diferentes ambientes (JAGIELSKI et al., 2019a) e, não necessariamente, associadas às infecções em animais e/ou humanos.

Prototheca sp. é encontrada em ampla variedade de nichos ambientais. Habita usualmente áreas úmidas com matéria orgânica de origem animal e

vegetal, incluindo água (estagnada, rios, lagos, mar, piscinas), solo, areia, plantas e limbo de árvores. Em criatórios de animais, tem sido encontrada em dejetos provenientes da sala de ordenha, bebedouros, solo, cama dos animais, fezes de vacas, bezerros e de suínos, ou como contaminante de equipamentos e utensílios de ordenha (YAMAMURA et al., 2008; RIBEIRO, 2021). Ainda, já foram isoladas do ambiente de laticínios e fezes de ratos capturados em indústrias lácteas (PORE et al., 1983; PORE e SHAHAN, 1988). Estes organismos apresentam elevada resistência às diferentes condições ambientais e ampla variação de pH (entre 3 e 11) (PORE et al., 1983).

A pasteurização nem sempre é eficaz na inativação da alga no leite de vacas (MELVILLE et al., 2002), embora tenha sido descrita a inibição da multiplicação de isolados do gênero *Prototheca* após o tratamento com calor, em temperaturas a partir de 100°C (MARQUES et al., 2010).

2.3 Mastite bovina por *Prototheca* sp.

A mastite, definida como inflamação da glândula mamária, é considerada a doença que mais onera a criação de vacas destinadas a produção de leite, causando prejuízos econômicos significativos decorrentes de alterações na composição físico-química, na celularidade do produto e redução da produção de leite, além de gastos com medicamentos, honorários veterinários e na reposição de animais por perda de tetos ou descarte precoce (LANGONI et al., 2013; RUEGG, 2017; SANTOS e FONSECA, 2019).

A mastite pode ser tradicionalmente classificada em contagiosa e ambiental, considerando o habitat e as características de transmissão dos agentes etiológicos. Os agentes contagiosos (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, corinebactérias e micoplasmas) possuem como habitat a glândula mamária. São transmitidos principalmente no momento da ordenha e, usualmente, induzem mastite subclínica. Em contraste, nas infecções mamárias por patógenos ambientais (enterobactérias, fungos e certos actinomicetos), os microorganismos são provenientes do ambiente dos animais (e.g., solo, fezes, cama dos animais e água). Nestes casos, a transmissão comumente ocorre nos ambientes das entreordenhas. Os patógenos ambientais geralmente estão associados às infecções clínicas, por vezes hiperagudas e

com sinais sistêmicos (RIBEIRO et al., 2016; RUEGG, 2017). No entanto, comportamento binário de patógenos de origem ambiental (*Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus uberis*), induzindo infecções com características de agentes contagiosos seja observado, que pode representar novo desafio no controle e profilaxia da mastite bovina (KLAAS e ZADOKS, 2018).

A infecção mamária em bovinos por *P. bovis* determina principalmente quadros de mastite clínica e, ocasionalmente, subclínica, com evolução para processos piogranulomatosos, de difícil resolução tecidual (JANOSI et al., 2001). A prototecose provoca alterações no tecido glandular mamário e destruição parcial ou total do parênquima glandular (LANGONI et al., 2013).

Em virtude da presença em diferentes nichos de ambiente, *P. bovis* é reconhecida como agente de mastite de origem ambiental na casuística de mastite bovina (RUEGG, 2017; JAGIELSKI et al., 2019).

Na Alemanha, Lerche (1952) descreveu pela primeira vez a alga em casos de mastite bovina. Aumento no número de casos de prototecose mamária em vacas tem sido reportado em todo mundo, principalmente em fazendas com bom controle de agentes contagiosos. Surtos têm sido registrados no Brasil, EUA, Canadá, México, Japão, China, Nova Zelândia, Dinamarca, Inglaterra e Polônia, com predomínio de *P. bovis* (RIBEIRO, 2021). Em rebanhos leiteiros com bom manejo, a ocorrência de infecções mamárias por prototeca usualmente é inferior a 5%, embora em surtos possa acometer cerca de 30% das vacas (JANOSI et al., 2001; SANTOS e FONSECA, 2019).

No Brasil, a prototecose mamária foi descrita inicialmente no interior do estado de São Paulo (LANGONI et al., 1992). Subsequentemente, a maioria dos estados da federação com expressão na criação de bovinos de leite têm registado infecções mamárias em vacas por prototeca (RIBEIRO et al., 2016).

A infecção mamária por prototecas em vacas pode se manifestar sob a forma clínica ou subclínica. No entanto, predomina a forma clínica (não sistêmica), na lactação, com tendência a evolução crônica. Nos casos clínicos, agudos, ocorrem alterações visíveis no aspecto do leite (secreção serosa a purulenta) e aumento da celularidade.

Em virtude da indução de lesões irreversíveis e baixas taxas de cura (RUEGG, 2016), a segregação e o descarte de animais, bem com a atenção aos procedimentos de profilaxia de agentes de mastite de origem ambiental (pré-

dipping, retirada periódica de dejetos, oferecimento de alimentação na pós-ordenha), drenagem de ambientes, cloração da água usada no ambiente de ordenha, bem como cuidados com a ordenha higiênica, têm sido os principais procedimentos adotados nas propriedades com casos de prototecose mamária (YAMAMURA et al., 2008; RICCHI et al., 2010; CAMBOIM et al., 2010; RIBEIRO, 2021; BOZZO et al., 2022).

2.4 Diagnóstico da mastite bovina por *Prototheca* sp.

O diagnóstico de rotina da prototecose mamária em vacas é baseado no cultivo microbiológico, características das colônias, métodos fenotípicos (bioquímicos e assimilação de substratos) e micrometria da alga (ROESLER et al., 2006; LANGONI et al., 2013).

As espécies de *Prototheca* podem ser isoladas em meio convencional de ágar sangue ovino ou bovino (5%), ou seletivo de Sabouraud, em condições de aerobiose. Colônias irregulares, branco-acinzentadas, não hemolíticas, entre 1-2 mm de diâmetro, são isoladas entre 48 e 72 horas. Colorações de Gram, variedades do método de Romanowsky (Panótico, Giemsa) e lactofenol-azul de algodão têm sido utilizadas, possibilitando a visualização de estruturas esféricas ou elípticas, contendo endósporos (arredondados ou em mórulas) no citoplasma do organismo, circundado por cápsula espessa (RIBEIRO, 2021).

Vários carboidratos, álcoois e outros substratos têm sido utilizados na classificação fenotípica das espécies, bem como aspectos micromorfológicos (ROESLER et al., 2006; JAGIELSKI e LAGNEU, 2007). No entanto, tais métodos são, por vezes, laboriosos e demorados, não possibilitando a classificação inequívoca em nível de espécies, que tem sido fundamentada, mais recentemente, em técnicas moleculares como PCR e sequenciamento (JAGIELSKI et al., 2019a; AHRHOULDT et al., 2021; TASHAKKORI et al., 2022). Neste contexto, recentemente no Brasil, estudo modificou a extração das proteínas ribossomais de prototecas isoladas de infecções mamárias em vacas, possibilitando a inserção na biblioteca de espectros de referência da alga visando o diagnóstico por espectrometria de massas na rotina laboratorial de mastite (FIDELIS et al., 2021).

2.5 Ensaios *in vitro* e *in vivo* visando o tratamento/profilaxia da mastite por *P. bovis*

Apesar da sensibilidade *in vitro* da alga a certos fármacos de ação antimicrobiana (gentamicina, polimixina B), antifúngica (anfotericina B) e desinfetantes/antissépticos (*i.e.*, iodo, hipoclorito, clorexidine, timerosal, sulfato de cobre, nitrato de prata, guanidina, polipirrol, ácido paracético), herbicidas e peptídeos, além de óleos e produtos naturais, e permeantes de membranas biológicas (dimetilsulfóxido), até o momento, não existe protocolo eficaz de tratamento para a prototecose mamária em vacas (MELVILLE et al., 2002; SALERNO et al., 2010; TOMASINSIG et al., 2012; JAGIELSKI et al., 2012; LANGONI et al., 2013; GONÇALVES et al., 2015; MORANDI et al., 2016; RIBEIRO et al., 2016; ALVES et al., 2017; SANTOS e FONSECA, 2019; ELY et al., 2020; MORELLO et al., 2020; SPEROTTO et al., 2021).

Com efeito, a refratariedade da alga a terapia convencional tem motivado ensaios *in vivo* e, principalmente, *in vitro*, com diferentes fármacos de efeito algicida, que possam ser indicados no tratamento com reprodutibilidade de resultados e que não causem reações adversas ao tecido mamário das vacas, ou mesmo aos humanos, pelo consumo do leite pós-tratamento (RIBEIRO, 2021).

2.5.1 Quaternário de amônio

A sanitização e antissepsia são considerados métodos fundamentais de prevenção de doenças e indispensáveis para a redução da contagem de micro-organismos patogênicos no ambiente, utensílios e tecidos orgânicos, reduzindo os riscos de infecções (DOMINGUES e LANGONI, 2001).

Antissépticos são biocidas ou produtos que destroem ou inibem a multiplicação de micro-organismos nos tecidos vivos, enquanto os desinfetantes são utilizados em objetos inanimados e ambientes. Existem diferentes categorias de antissépticos, *e.g.*, álcoois (etanol), anilidas (triclocarban), biguanidas (clorexidine), bisfenóis (triclosan), compostos a base de cloro, derivados de iodo, prata, peróxidos e quaternário de amônio (McDONNELL e RUSSELL, 1999).

Os compostos a base quaternário de amônio são os surfactantes catiônicos mais utilizados como antissépticos e desinfetantes em medicina

humana e veterinária, devido ao custo acessível, elevado efeito biocida, amplo espectro de atividade microbica (McDONNELL e RUSSELL, 1999; GERBA, 2015), baixa toxicidade, boa estabilidade, além de biodegradáveis, inodoros, com boa ação em pH ácido e não corrosivos, evitando riscos de irritação da pele, conjuntivas e mucosas, em baixas concentrações (CARVALHO, 2015). Este fármaco tem sido amplamente utilizado na sanitização doméstica, agrícola, industrial (alimentos), hospitalar, e em ambientes de entretenimento (piscinas) e instalações de animais (TEZEL e PAVLOSTATHIS, 2015). Apresenta ação na presença de matéria orgânica, embora tenha baixa ação em esporos bacterianos (DOMINGUES e LANGONI, 2001).

O quaternário de amônio age diretamente na membrana celular causando desnaturação das proteínas da membrana e do citoplasma dos micro-organismos, promovendo a perda estrutural e a ruptura da membrana citoplasmática, liberando enzimas autolíticas como nitrogênio, potássio e outros constituintes intracelulares, resultando em efeito microbica (McDONNELL e RUSSELL, 1999; BOROWSKY et al., 2006).

A estrutura química do quaternário de amônio está relacionada a grupos alifáticos ou aromáticos ligados ao átomo de nitrogênio, além de fração aniônica constituída por bromo ou cloro (ESPINOZA MUÑOZ, 2019). Os quaternários mais conhecidos são o cloreto de benzalcônio, cloreto de cetilpiridínio e cloreto/brometo de cetiltrimetilamônio (cetrimida) (MIURA SUGII, 2019).

Apesar do uso comum do quaternário de amônio como sanitizantes na prática médica e veterinária, na literatura consultada, não foram encontrados ensaios investigando o efeito *in vitro* deste produto em isolados de *Prototheca* obtidos de vacas com mastite.

2.6 Prototecose Humana

A prototecose humana é considerada doença incomum. Ocorre principalmente sob a forma de infecções tegumentares, entéricas, sistêmicas e articulares (KANO, 2019; RAJAN et al., 2020). Em menor frequência, são relatados casos esporádicos de peritonite, encefalite e hepatite, com isolamento da alga principalmente do sangue, líquido peritoneal e fragmentos de órgãos (AHRHOLDT et al., 2012; WANG et al., 2022).

P. bovis e *P. wickerhamii* são as principais espécies que acometem os humanos, principalmente em pacientes imunossuprimidos. As infecções com evolução grave são observadas com maior frequência em indivíduos coinfectados com doenças debilitantes como neoplasias, diabetes, transplantados e pacientes que vivem com HIV/Aids (MAYORGA, 2012; GODOFREDO et al., 2020; LIBISCH et al., 2022; WANG et al., 2022).

A prototecose não é considerada transmissível entre os humanos. Acredita-se que a transmissão da alga para os humanos ocorra pelo contato com água ou solo contaminado, inoculações traumáticas na pele e picadas de insetos. Ainda, a ingestão de produtos de origem animal, como o consumo de leite e derivados de animais com mastite por *Prototheca* spp., tem sido documentada na cadeia epimiológica de transmissão do patógeno (SIQUEIRA et al., 2008; AHRHOLDT et al., 2012; RAJAN et al., 2020).

A avaliação *in vitro* da termorresistência de *P. bovis* isoladas de vacas com mastite revelou a viabilidade da alga diante do binômio tempo/temperatura utilizados na pasteurização rápida e lenta, indicando o risco de o consumo do leite como via de transmissão na prototecose em humanos (COSTA et al., 1988; MELVILLE et al., 2002).

Considerando o potencial zoonótico do agente, o aumento do número de casos e os prejuízos decorrentes da prototecose mamária, a ausência de protocolos efetivos de tratamento nas infecções mamárias em vacas, a importância de investigações com produtos de efeito algicida em isolados de *Prototheca*, bem como a necessidade de incorporação de métodos moleculares na rotina de diagnóstico das espécies do agente; o presente estudo investigou o efeito algicida *in vitro* do quaternário de amônio e as unidades formadoras de colônias em isolados de *Prototheca* obtidos de vacas com mastite clínica (cujos escores de gravidade dos casos foram avaliados) e diagnóstico das espécies da alga baseado na espectrometria de massas.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar o efeito algicida *in vitro* do quaternário de amônio e a identificação em nível de espécies de *Prototheca* utilizando a metodologia de MALDI-TOF MS, obtidas de vacas com mastite clínica.

3.2 Específicos

- ✓ Investigar a prevalência do agente em casos de mastite bovina nas fazendas amostradas;
- ✓ Identificar as espécies de *Prototheca* por proteômica (espectrometria de massas);
- ✓ Investigar a concentração algicida mínima *in vitro* dos isolados diante do quaternário de amônio.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Comissão de Ética

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Uso de Animais (CEUA) da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP), como forma de subprojeto, pertencente ao projeto temático aprovado pela FAPESP (protocolo 0136/2017) intitulado “*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterococcus* spp.: Impacto dos fatores de virulência na mastite bovina e reflexos na saúde pública”, desenvolvido no Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP, entre 2017 e 2022, sob coordenação do professor titular Helio Langoni (Anexo 3).

4.2 Isolados

Foram utilizados, o total de 44 isolados de *Prototheca* sp. previamente caracterizados por cultivo microbiológico e métodos fenotípicos, obtidos de 4.275 amostras de leite de vacas com mastite clínica, do projeto temático supracitado. Amostras de leite (2 mL) contendo os isolados ou os isolados em caldo BHI, contendo glicerol (15%), foram mantidos congelados em criotubos a -80°C.

4.3 Animais e fazendas

Foram utilizados, dez rebanhos leiteiros por conveniência, dos quais seis situados no sul do Estado de Minas Gerais (propriedades A, B, C, D, E e F) e quatro na região sudoeste do Estado de São Paulo (propriedades G, H, I e J).

As fazendas incluídas no estudo atendiam aos seguintes critérios de inclusão: 1) possuir programas de controle de mastite (com registro de dados em softwares de gerenciamento), 2) contagem de células somáticas (CCS) <400.000 CS/mL, 3) animais da raça Holandesa (> 20 litros leite/vaca/dia), 4) número mínimo de 200 vacas em lactação, 5) regime de ordenha mecânica, 6) histórico de mastite clínica.

4.4 Diagnóstico da mastite clínica, classificação de escores de gravidade e colheita de amostras

O diagnóstico da mastite clínica e classificação de escores de gravidade - adaptado das infecções mamárias por agentes ambientais (PINZÓN-SÁNCHEZ e RUEGG, 2011) - foi realizado após inspeção dos quartos e da glândula mamária. Em seguida, foi realizada a retirada dos primeiros jatos de leite antes da ordenha na caneca telada de fundo escuro ou Tamis, ou no piso emborrachado das salas de ordenha, visando observar a presença de grumos, pus, dessora, alterações na coloração ou estrias de sangue no leite (escore 1 ou casos leves), sinais de inflamação na glândula mamária (dor a palpação, áreas de hiperemia, abscessos, nódulos, fístulas) (escore 2 ou moderado), ou sinais sistêmicos nos animais (taquicardia, taquipneia, febre, alterações dos movimentos ruminais, decúbito) (escore 3 ou grave). Antes da realização do estudo, os ordenhadores foram treinados para a identificação dos escores de gravidade clínica dos casos de mastite (GUERRA et al., 2020).

As amostras foram colhidas após rigorosa antisepsia dos tetos com algodão embebido em solução alcoólica (70%), desprezados os primeiros jatos. O leite foi colhido em frascos esterelizados com tampa de rosca, que foram mantidos em temperatura de refrigeração (4-8°C) por até 48 horas, até o cultivo microbiológico. Amostras que não foram processadas em até 48 horas foram congeladas a -20°C (RIBEIRO et al., 2016) até o encaminhamento aos laboratórios para os procedimento de cultivo microbiológico.

4.5 Cultivo microbiológico

O leite dos animais com mastite foi cultivado em meio de ágar base (Oxoid do Brasil®, São Paulo, Brasil) suplementando com sangue bovino desfibrinado (5%) e ágar MacConkey (Oxoid do Brasil®, São Paulo, Brasil) (National Mastitis Council-NCM, 1999). As culturas foram mantidas em condições de aerobiose, a 37°C, por até 72 horas de incubação (JAGIELSKI et al., 2019a, RIBEIRO, 2021). Todas as amostras de leite foram cultivadas no laboratório de Núcleo de Pesquisa em Mastites (NUPEMAS), do Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva da FMVZ UNESP/Botucatu, SP.

4.6 Caracterização fenotípica de *Prototheca* sp.

Colônias compatíveis com *Prototheca* foram submetidas a coloração de Gram e Panótico, visando a visualização do organismo e diagnóstico preliminar de acordo com as características morfotintoriais. Os isolados compatíveis foram congelados conforme subitem 4.2., considerando a morfologia de colônia, micrometria celular, presença de “mórulas” e coloração arroxeada às técnicas empregadas – Gram e panótico.

4.7 *Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS)

Todas as respectivas amostras de leite ou isolados de *Prototheca* sp. foram descongelados e submetidos a subcultivo em ágar sangue bovino e ágar Sabouraud (Oxoid do Brasil®, São Paulo, Brasil), mantidos em aerobiose, a 37°C, por até 120 horas, para recuperação e avaliação da viabilidade das prototecas. Em seguida, todos os isolados foram recultivados em ágar Sabouraud (Oxoid do Brasil®, São Paulo, Brasil), em condições de aerobiose a 37°C, por 24-48 horas – para obtenção de culturas jovens e com alta massa da alga – e encaminhados ao Laboratório de Pesquisa de Qualidade do Leite (QUALILEITE), do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ – USP/Pirassununga, SP, visando a realização da espectrometria de massas (MALDI-TOF MS).

Os 44 isolados foram submetidos à técnica de *Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS) (GONÇALVES et al., 2014), com modificações na extração de proteínas ribossomais (FIDELIS et al., 2021).

Após a extração, foi adicionado em cada amostra 20-40µL de acetromil 545 (100% P.A.) na mesma proporção do ácido fórmico (1:1), e centrifugado. Em seguida, 1µL da solução de cada amostra foi adicionada em placas específicas contendo 96 orifícios (Bruker e Daltonics™, Bremen, Alemanha) e mantida por cerca de 20 minutos para secar em temperatura ambiente. Os orifícios da placa com as amostras secas foram cobertos com 1µL de solução matriz (ácido 2-ciano-4-hidroxicinâmico diluído a 50% de acetromil e 2,5% de 551 ácido trifluoracético). As placas foram dispostas no receptáculo do equipamento (Bruker e Daltonics™, Bremen, Alemanha), operado com 337-nm de laser.

A obtenção dos espectros foi realizada entre 2.000-20.000 m/z, usando o software FlexControl 3.3, baseado na biblioteca local de dados, que possui a inserção das espécies *P. bovis* e *P. blaschkeae* (FIDELIS et al., 2021).

A caracterização em nível de gênero e espécie dos isolados foi considerada para os espectros $\geq 1,7$ e $\geq 2,0$, respectivamente (GONÇALVES et al., 2014).

4.8 Concentração algicida mínima (CAM) *in vitro* do quaternário de amônio

4.8.1 Preparo dos inóculos

Todos os isolados de *Prototheca* sp. foram cultivados no meio de ágar Sabouraud, mantidos em condições de aerobiose, a 37°C, por 96 horas. Duas a três colônias típicas de cada isolado foram repicadas em tubos contendo 3mL de caldo infusão cérebro e coração - BHI (Oxoid do Brasil®, São Paulo, Brasil), e incubadas em aerobiose, a 37°C, por 48 horas. A turbidez dos tubos foi ajustada por densidade óptica equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland, utilizando solução salina estéril a 0,9% (SALERNO et al., 2010; ALVES et al., 2017).

4.8.2 CAM *in vitro* do quaternário de amônio

Para a avaliação da concentração algicida foi utilizado produto comercial (Oxi Algicida®, Sandet Química Ltda., São José do Rio Preto, SP) contendo exclusivamente o quaternário de amônio como princípio ativo (cloreto de alquil amidopropil demetil benzil amônio), na forma líquida, na concentração inicial de 15%, utilizado como produto algicida em piscinas.

Para cada isolado de prototeca foram utilizados 15 tubos de vidro (3mL) esterilizados, tampados com algodão hidrofóbico. No primeiro tubo foi depositado 1mL do quaternário de amônio à 150000 partes por milhão (ppm). Nos 14 tubos subsequentes, foram distribuídos 0,5mL de água Milli-Q esterilizada. Em seguida, foi transferido 0,5mL do quaternário de amônio (15%) do primeiro para o segundo tubo, com subsequente homogeneização. Este mesmo processo foi realizado sucessivamente nos demais 14 tubos, com descarte de 0,5mL do tubo 15. Logo após, foi acrescido em cada tubo 0,5mL do inóculo das prototecas produzido de acordo com o subitem 4.8.1, perfazendo as seguintes diluições: 75000ppm, 37000ppm, 18000ppm, 9000ppm, 4500ppm,

2250ppm, 1120ppm, 560ppm, 280ppm, 140ppm, 70ppm, 35ppm, 17ppm, 8ppm e 4ppm.

Os tubos foram incubados *overnight* em estufa, em condições de aerobiose a 37°C. Em seguida, uma alíquota (10µL) de cada tubo foi semeada no meio de ágar Sabouraud, em condições de aerobiose a 37°C, mantidos por até 7 dias, com leituras a cada 24 horas, visando a avaliação da CAM do quaternário de amônio diante dos 44 isolados (SALERNO et al., 2010; ALVES et al., 2017).

O método supracitado foi realizado em duplicata para todos os isolados. Por analogia ao mesmo método utilizado em bacteriologia, da concentração bacteriana mínima (BIER, 1984), a menor diluição que impediu o isolamento das prototecas, no meio de ágar Sabouraud, foi considerada a concentração algicida mínima.

Como solução controle negativa, foram preparadas suspensões em tubos previamente esterilizados, contendo 0,5 mL de água Milli-Q esterilizada, acrescido de 0,5 mL do inóculo, ajustado a turbidez da escala 0,5. Como controle positivo foram utilizadas as cepas de *P. bovis* (*P. zopfii* genótipo 2), *P. ciferrii* e *P. blaschkeae*, gentilmente cedidas pelo professor Dr. Tomasz Jagielski, da Universidade de Varsóvia, na Polônia, caracterizadas em nível de espécie por PCR com base no gene *cytB* (JAGIESLKI et al., 2019a,b).

4.10. Análise estatística

A prevalência da prototecose nos rebanhos amostrados e os escores de gravidade foram calculados de modo descritivo, enquanto o efeito *in vitro* da CAM do quaternário de amônio, foi calculado pela média aritmética dos resultados.

5. RESULTADOS

5.1 Prevalência e identificação microbiológica de *Prototheca* sp. nos animais

Do total de amostras de leite cultivadas, em 1,03% (44/4.275) foram isoladas colônias com identificação presuntiva de *Prototheca* sp. Todas os 44 isolados utilizados no estudo foram obtidos de vacas diferentes e apresentaram cultura pura nas placas, não havendo coinfecção com outros micro-organismos.

Foi possível obter os escores de gravidade clínica de 33 vacas. Destas, escores de gravidade clínica leves (escore 1) e moderados (escore 2) foram observados em 78,8% (26/33) e 21,2% (7/33) das infecções mamárias, respectivamente. Nenhum animal apresentou escore grave (escore 3) ou sinais sistêmicos.

Dentre os 44 isolados com identificação presuntiva com o gênero *Prototheca* identificados pelo cultivo microbiológico e técnicas fenotípicas convencionais, 38 (86,4%) foram identificados como *P. bovis* por MALDI-TOF MS, com escores >2.0. Em contraste, 13,6% (5/44) dos isolados não alcançaram escore mínimo para diagnóstico de espécie, identificados somente em nível do gênero *Prototheca*. Entretanto, 100% dos isolados tiveram identificação de espécie pela técnica da PCR, em que todas foram *P. bovis*.

Os dados individuais de prevalência de isolados nas fazendas são apresentados na Tabela 1, havendo isolamento em três das dez fazendas amostradas. As principais características de produção, rebanho, instalações, manejo de ordenha nas três fazendas, e dados individuais de raça, quarto mamário infectado, sazonalidade e CAM estão sumariados nos anexos 1, 2 e 4. A localização geográfica das dez fazendas é apresentada na Figura 1.

Figura 1. Localização geográfica de dez propriedades leiteiras amostradas nos estados de São Paulo e Minas Gerais com isolamento de *Prototheca* sp. do leite de vacas com mastite clínica (2017-2022). Fonte: Google Maps (2022).

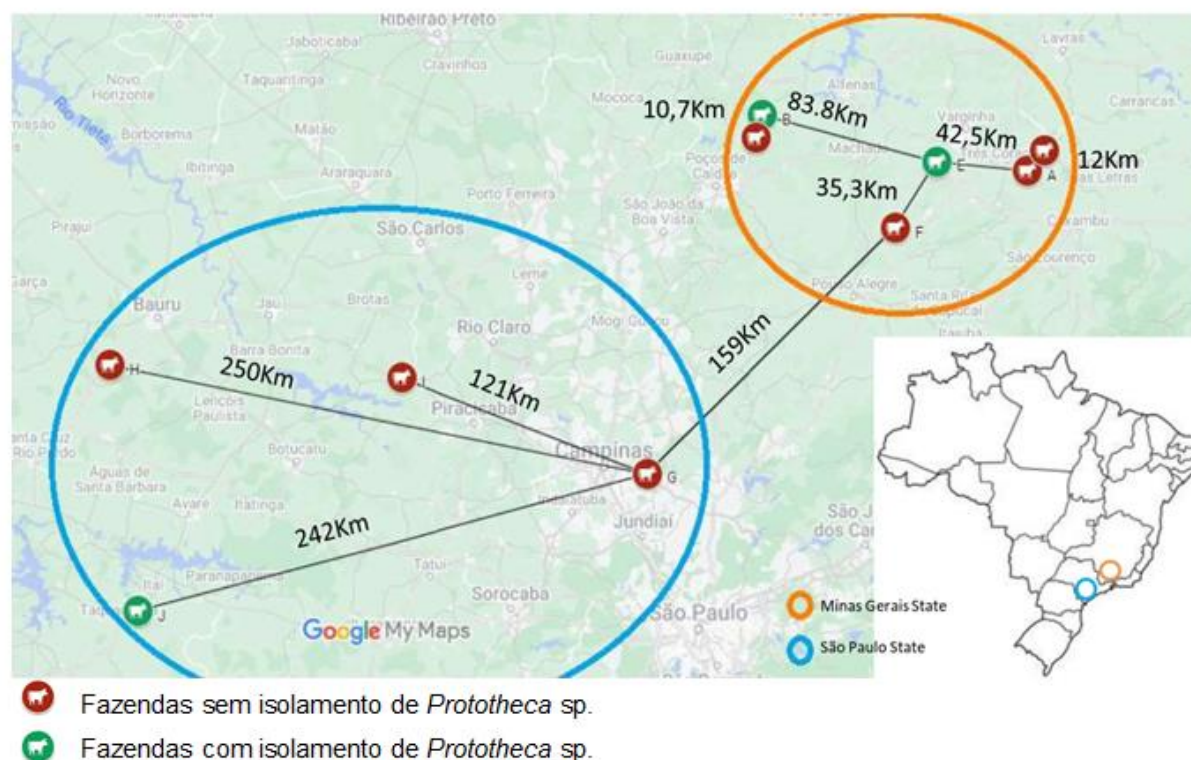


Tabela 1. Frequência de isolamento de prototecas no leite de vacas com mastite clínica em fazendas do estado de São Paulo e Minas Gerais (2017 - 2022).

Fazenda	Estado	Identificação MALDI-TOF MS	
		<i>Prototheca</i> sp.	<i>P. bovis</i>
		% (N)	% (N)
B	Minas Gerais	0,94 (2/212)	2,8 (6/212)
E	Minas Gerais	0,41 (3/721)	4,2 (30/721)
J	São Paulo	0 (0/66)	4,5 (3/66)

P. bovis = *Prototheca bovis*; % = percentual;

N = número de prototecas identificadas/número de vacas amostradas

5.2 Concentração Algicida Mínima (CAM) *in vitro* do quaternário de amônio nos isolados de *Prototheca* spp.

O efeito algicida do quaternário de amônio foi observado em todos os 44 isolados nos casos de mastite clínica e nas cepas controle, variando entre as diluições 35ppm e 8ppm (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito algicida *in vitro* do quaternário de amônio em isolados de *Prototheca* obtidos de vacas com mastite clínica (2017 – 2022).

Agente	Concentração Algicida Mínima		
	35ppm (N)	17ppm (N)	8ppm (N)
<i>P. bovis</i>	18,2% (8/44)	34,1% (15/44)	38,6% (17/44)
<i>Prototheca</i> sp.	2,3% (1/44)	2,3% (1/44)	4,5% (2/44)
<i>P. bovis</i> *	--	100% (1/1)	--
<i>P. blaschkeae</i> *	100% (1/1)	--	--
<i>P. ciferrii</i> *	--	100% (1/1)	--

N = número de isolados com efeito algicida/número total de isolados; % = percentual

* Cepas de referência cedidas pelo Prof. Dr. Tomas Jagielski, Universidade de Varsóvia, Polônia, caracterizadas em nível de espécie pela detecção do gene *cytB* (JAGIELSKI et al., 2019a).

6. DISCUSSÃO

As infecções mamárias causadas por espécies de *Prototheca* representam grande desafio contemporâneo no controle de agentes de mastite em vacas (RUEGG, 2017), em virtude do aumento do registro de casos, do comportamento oportunista do patógeno (ALVES et al., 2017; BOZZO et al., 2022; LIBISCH et al., 2022) e da elevada resistência da alga às condições do ambiente dos criatórios, incluindo solos úmidos, fezes, água estagnada, cama dos animais, matéria orgânica em decomposição, ou contaminando utensílios de ordenha (JANOSI et al., 2001; SCACCABAROZZI et al., 2008; YAMAMURA et al., 2008; SPEROTTO et al., 2021). Ainda, a inexistência de protocolos eficazes para o tratamento das infecções mamárias resulta em prejuízos significativos aos produtores, decorrentes da redução na produção e qualidade do leite, aumento da celularidade do leite, perda de tetos, além de gastos com medicamentos, honorários veterinários, descarte prematuro e reposição de animais (LANGONI et al., 2013; SANTOS e FONSECA, 2019; RIBEIRO, 2021); fatos que podem ser considerados as principais motivações do presente estudo.

Aumento substancial de casos e surtos de infecções mamárias em vacas por espécies de *Prototheca* têm sido descritos na última década em países como Canadá (PIEPER et al., 2012), Itália (RICCHI et al., 2013; MORANDI et al., 2017), Polônia (JAGIELSKI et al., 2019a,b), Coreia (PARK et al., 2019), China (LI et al., 2021), Equador (HUILCA et al., 2022) e Brasil (GONÇALVES et al., 2015; ALVES et al., 2017), apesar da baixa prevalência da prototecose mamária, entre 0,1 e 5%, em rebanhos bem manejados (JANOSI et al., 2001; SANTOS e FONSECA, 2019). No presente estudo, dentre 4.275 amostras de leite de vacas cultivadas com mastite clínica provenientes de dez fazendas dos estados de São Paulo e Minas Gerais, algas do gênero *Prototheca* foram isoladas em 1% (44/4.275) dos animais, em três destas fazendas. A baixa prevalência de prototecose mamária clínica nas vacas amostradas poderia ser creditada a adoção sistemática de medidas de controle de agentes de mastite (ambientais e contagiosos) e boas práticas de ordenha higiênica nas fazendas utilizadas no estudo.

Os casos de prototecose mamária geralmente apresentam anormalidades no leite e na glândula mamária (JANOSI et al., 2001; RUEGG, 2016) e, ocasionalmente, infecções sistêmicas (THOMPSON et al., 2009). No presente estudo, dentre os 33 isolados de *Prototheca* que foi possível obter dados da gravidade clínica, 78,8% (26/33) e 21,2% (7/33) apresentaram infecções mamárias leves e moderadas, respectivamente, enquanto nenhum animal apresentou escore grave (ou sinais sistêmicos). A gravidade clínica dos casos de mastite tem sido investigada principalmente em infecções mamárias em vacas por enterobactérias (RIBEIRO et al., 2021), particularmente *Escherichia coli* (GUERRA et al., 2020), subdivididas em infecções leves, moderadas e graves, com intuito de avaliar a influência de fatores de virulência na gravidade dos casos e a relação com o tratamento dos patógenos na lactação (PINZÓN-SÁNCHEZ e RUEGG, 2011).

Na literatura consultada, o presente estudo investigou pela primeira vez a gravidade clínica de casos de mastite por prototecas diagnosticadas por MALDI-TOF MS, e observou predomínio de infecções leves e moderadas, indicando que, apesar da tendência de cronicidade dos casos e desenvolvimento de reações piogranulomatosas, de difícil resolução terapêutica (McDONALD et al., 1984; RUEGG, 2016), as infecções por *P. bovis* estão restritas predominantemente à glândula mamária.

O diagnóstico laboratorial de rotina de infecções mamárias em vacas por *Prototheca* sp. tem sido fundamentado no cultivo microbiológico do leite e identificação da alga baseada nas características das colônias, métodos fenotípicos (e.g., assimilação de substratos) e micrometria do agente (ROESLER et al., 2006; RIBEIRO, 2021; SANTOS e FONSECA, 2019). No entanto, uma reclassificação taxonômica recente da alga, firmada com base molecular (detecção do gene mitocondrial *cytB*), propôs a subdivisão do gênero em 14 espécies, com predomínio das infecções mamárias em vacas por *P. bovis* (JAGIELSKI et al., 2019a) e, ocasionalmente, por *P. blaschkeae* (RICCHI et al., 2013; MORANDI et al., 2017), sob a forma de casos ou surtos de mastite. Com efeito, os métodos moleculares têm sido gradualmente incorporados na rotina diagnóstica ou de confirmação das espécies da alga (BOZZO et al., 2022; TASHAKKORI et al., 2022), de modo similar ao adotado no presente estudo.

Estudo recente no Brasil avaliou um método modificado de extração de proteínas ribossomais de espécies de *Prototheca*, o que possibilitou a inserção de espectros de referência da alga na base de dados do equipamento de MALDI-TOF MS, visando o diagnóstico de espécies envolvidas na mastite bovina (*P. bovis* e *P. blaschkeae*) (FIDÉLIS et al., 2021). Neste contexto, dentre as 44 prototecas isoladas de vacas com mastite clínica no presente estudo, 86% (39/44) foram diagnosticadas pela MALDI-TOF MS como *P. bovis*, ratificando o predomínio desta espécie da alga na mastite bovina (PIEPER et al., 201; GONÇALVES et al., 2015; MORANDI et al., 2017; ALVES et al., 2017; JAGIELSKI et al., 2019a,b; PARK et al., 2019, LI et al., 2021), bem como a aplicabilidade do método de MALDI-TOF MS no diagnóstico de rotina da alga em amostras de leite (FIDELIS et al., 2021).

Do total de 44 prototecas isoladas, 11,3% (5/44) tiveram a identificação pela MALDI-TOF MS restritas em nível de gênero (*Prototheca* sp.). Tal resultado poderia ser atribuído a presença de espécies da alga não contidas na biblioteca de espectros do equipamento, ou decorrente das dificuldades de extração da proteína de origem ribossomal, em virtude da espessa parede celular da alga (LASSA et al., 2010), cuja confirmação de espécies poderia ser investigada pela detecção genética do gene *cytB* (JAGIELSKI et al., 2019a,b).

Efeito algicida de sanitizantes (e.g., hipoclorito de sódio, iodo, guanidina, ácido peracético, sulfato de cobre, nitrato de prata, clorexidina, polipirrol) (MELVILLE et al., 2002; SALERNO et al., 2010; GONÇALVES et al., 2015; ALVES et al., 2017; ELY et al., 2020), antifúngicos (e.g., anfotericina B, cetoconazol, itraconazol, posaconazol, voriconazol, nistatina) (BUZZINI et al., 2008; JAGIELSKI et al., 2012), antimicrobianos (e.g., gentamicina, netilmicina, colistina) (MORANDI et al., 2016), algicidas (SPEROTTO et al., 2021), própolis associada ao dimetilsulfóxido-DMSO, timerosal (LANGONI et al., 2013), nanopartículas (JAGIELSKI et al., 2018), peptídeos (TOMASINSIG et al., 2012), herbicidas (MORELLO et al., 2020), óleos essenciais (NARDONI et al., 2018) e luzes fotodinâmicas (ANJOS et al., 2019) têm sido descritos em diferentes estudos *in vitro* e *in vivo* em isolados de *Prototheca* em vacas com mastite; fato que demonstra a preocupação da comunidade científica em encontrar alternativas terapêuticas e de controle/profilaxia para as infecções intramamárias

causadas pela alga. Apesar de certa sensibilidade *in vitro* ou cura clínica aparente (*in vivo*) de casos clínicos, as prototecas apresentam elevada refratariedade aos diferentes fármacos testados por via intramamária e parenteral (SANTOS e FONSECA, 2019; RIBEIRO, 2021; BOZZO et al., 2022), provavelmente decorrente do desenvolvimento de reações piogranulomatosas (McDONALD et al., 1984), da diversidade genética (TASHAKKORI et al., 2022) e de mecanismos de virulência e evasão do sistema imune (MARQUES et al., 2006), como a produção de biofilmes (GONÇALVES et al., 2015; ELY et al., 2019) e a indução de apoptose celular nas células mamárias (SHAHID et al., 2017; ZHAO et al., 2022).

O presente estudo investigou o efeito algicida do quaternário de amônio, sanitizante de efeito microbicida (incluindo algicida), utilizado como desinfetante e antisséptico para humanos e animais (TEZEL e PAVLOSTATHIS, 2015). A estabilidade, baixa toxicidade e amplo efeito biocida, além de inodoro, pouco corrosivo e biodegradável (CARVALHO, 2015), possibilitam o uso seguro deste sanitizante em ambientes hospitalares, agrícolas, industriais e de entretenimento humano (como piscinas), em virtude da baixa irritação de mucosas e conjuntivas, em baixas concentrações (TEZEL e PAVLOSTATHIS, 2015). Nos 44 isolados de prototecas obtidos de vacas com mastite clínica foi observado efeito algicida *in vitro* do quaternário de amônio na totalidade dos isolados, em baixas concentrações, distribuídas entre 35ppm (20,4%), 17ppm (36,4%) e 8ppm (43,2%), além de efeito algicida em cepas de referência de *P. bovis*, *P. blaschkeae* e *P. ciferrii*. O efeito algicida do quaternário de amônio é atribuído a ação direta do fármaco na membrana celular, causando desnaturação proteica da membrana celular e proteínas do citoplasma dos micro-organismos, determinando a ruptura da membrana e morte celular (McDONNELL e RUSSELL, 1999; BOROWSKY et al., 2006).

Na literatura consultada, o efeito *in vitro* do quaternário de amônio em baixas concentrações em isolados de prototecas obtidos de mastite é descrito pela primeira vez e, devido à baixa toxicidade e irritação do produto para conjuntivas e mucosas (TEZEL e PAVLOSTATHIS, 2015), o quaternário de amônio poderia ser utilizado em conjunto com outras soluções sanitizantes como alternativa de sanitizante para ambientes de ordenha ou como soluções de pré

e pós-*dipping*, para o controle/profilaxia de infecções mamárias, em baixas concentrações para a secagem “química” de quartos (cronicamente infectados ou animais com vários quartos mamários acometidos), ou, experimentalmente, no tratamento intramamário de quartos acometidos pela alga.

Apesar do bom manejo adotado nas fazendas amostradas, bem como a baixa prevalência (1%) de animais infectados, não está disponível tratamento eficaz na prototecose mamária (BOZZO et al., 2022), fato que requer ações de profilaxia e controle recomendadas nas infecções mamárias por prototecas, particularmente no que tange a medidas para agentes de origem ambiental de mastite. Neste contexto, recomenda-se atenção nas fazendas amostradas com animais infectados por prototecas, para medidas como pré-*dipping*, oferecimento de alimentação na pós-ordenha, evitar umidade, fezes e acúmulo de matéria orgânica no ambiente de ordenha e entorno, manejo adequado da cama dos animais, cloração e qualidade da água do ambiente de ordenha, além da segregação dos animais (para o final da linha de ordenha), “secagem química” de quartos infectados ou descarte dos animais infectados (LANGONI et al., 2013; RUEGG, 2016; RIBEIRO, 2021). Ainda, também devem ser adotadas ações de manejo geral de higiene de ordenha, incluindo para controle/profilaxia de agentes contagiosos, pois vacas infectadas podem transmitir a alga para animais sadios no ambiente de ordenha (SANTOS e FONSECA, 2019).

As prototecas possuem potencial zoonótico, particularmente espécies que acometem animais de produção e/ou de companhia, como *P. bovis* e *P. wickerhamii* (JAGIELSKI et al., 2019a). O leite de animais infectados não deve ser consumido pelos humanos, tampouco oferecido aos bezerros, devido a possibilidade de desenvolvimento de enterite em animais (BOZZO et al., 2022) e em humanos (MELVILLE et al., 2002), bem como infecções sistêmicas graves em humanos, particularmente em pacientes imunossuprimidos (KANO, 2019). Os 44 isolados de prototecas identificados no presente estudo foram provenientes de animais com mastite clínica, cuja recomendação é o descarte do leite, embora seja possível a mistura inadvertida de leite de animais com mastite clínica nos tanques de expansão, fato que merece preocupação no contexto de Saúde Única (LIBISCH et al., 2022), e que justifica a adoção de

medidas de controle/profilaxia da prototecose mamária nas fazendas com animais infectados.

O uso de amostragem de conveniência de isolados de *Prototheca*, a não avaliação da influência de fatores epidemiológicos na ocorrência dos casos, a utilização de outro sanitizante sabidamente efetivo, de efeito algicida em amostras de *Prototheca* como forma de controle positivo com os isolados obtidos no estudo, e a ausência de confirmação molecular das espécies não identificadas pela espectrometria de massas podem ser consideradas limitações do presente estudo.

7. CONCLUSÕES

- ✓ *P. bovis* foi a espécie mais frequente identificada por MALDI-TOF MS nos animais amostrados, reforçando o predomínio desta espécie da alga como agente primário de mastite clínica em vacas, em grandes fazendas de leite no Brasil;
- ✓ Foi observada a ausência de casos graves de mastite, reforçando que as infecções por prototecas, particularmente *P. bovis*, estão restritas principalmente à glandula mamária, sem disseminação ou manifestações sistêmicas pelos animais;
- ✓ O quaternário de amônio apresentou efeito algicida em baixas concentrações nos isolados de *Prototheca*, podendo ser usado como alternativa de sanitizante para o ambiente de ordenha ou em soluções de pré e pós-*dipping* no controle/profilaxia da prototecoze mamária

Agradecimentos

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

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

1 8. REFERÊNCIAS

- 2 ALVES, A.C.; CAPRA, E.; MORANDI, S.; CREMONESI, P.; PANTOJA, J.C.F.;
3 LANGONI, H.; DE VARGAS, A.P.C.; DA COSTA, M.M.; JAGIELSKI, T.;
4 BOLAÑOS, C.A.D.; GUERRA, S.T.; RIBEIRO, M.G. *In vitro* algicidal effect of
5 guanidine on *Prototheca zopfii* genotype 2 strains isolated from clinical and
6 subclinical bovine mastitis. **Letters in Applied Microbiology**, v. 64, p. 419-423,
7 2017.
- 8 AHRHOULDT, J. MURUGAIYAN, J.; STRAUBINGER, R.K.; JAGIELSKI, T.
9 ROESLER, U. Epidemiological analysis of worldwide bovine, canine and human
10 clinical *Prototheca* isolates by PCR genotyping and MALDITOF mass
11 spectrometry proteomic phenotyping. **Medical Mycopatology**, v.50, p.234-243,
12 2012.
- 13 ANJOS, C.; SELLERA, F.P.; GARGANO, R.G.; LINCOPAN, N.; POGLIANI, F.C.;
14 RIBEIRO, M.G.; JAGIELSKI, T.; SABINO, C.P. Algicidal effect of blue light on
15 pathogenic *Prototheca* species. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**,
16 v.26, p.210-213, 2019.
- 17 AOUAY, A.; COPPÉE, F.; CLOET, S. et al. Molecular characterization of
18 *Prototheca* strains isolated from bovine mastitis. **Journal of Medical Mycology**,
19 v.18, p. 224–227, 2008.
- 20 BACTERIOLOGICAL ANALYTICAL MANUAL-USA. United States of America.
21 Department of Health & Human Services U.S. Food and Drug Administration.
22 **Bacteriological Analytical Manual**. Food Sampling and Preparation of Sample
23 Homogenate. 2003.
- 24 BIER, O. **Bacteriologia e Imunologia**. 23.ed. São Paulo: Melhoramentos.
25 p.1234, 1984.
-

- 26 *Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) NBR 6023:2018
- 27 BOZZO, G.; DIMUCCIO, M.M.; CASALINO, G.; CECI, E.; CORRENTE, M.L. New
28 approaches for risk assessment and management of bovine protothecosis. **Saudi**
29 **Journal of Biological Science**, v.29, e103368, 2022.
- 30 BOSSCHE, V.D.; HAAN, R.; BOSCH, J.V.W. et al. Case report: Infrapatellar
31 bursitis caused by *Prototheca wickerhamii*. **Medical Mycology Case Reports**,
32 v.1, p. 13-16, 2012.
- 33 BOROWSKY, L. M. et al. Sensibilidade e resistência de amostras de *Salmonella*
34 *Typhimurium* isoladas de suínos abatidos no Rio Grande do Sul/Brasil frente aos
35 desinfetantes químicos quaternário de amônio e iodoformo. **Ciência Rural**, v. 36,
36 n. 5, p. 1474–1479, 2006.
- 37 BUZZINI, P.; TURCHETTI, B.; BRANDA, E.; GORETTI, M.; AMICI, M.;
38 LAGNEAU, P.E.; SCACCABARROZZI, L.; BRONZO, V.; MORONI, P. Large-scale
39 screening of the *in vitro* susceptibility of *Prototheca zopfii* towards polyene
40 antibiotics. **Medical Mycology**, v.46, n.5, p.511-4, 2008.
- 41 CARVALHO, D. Atividade antimicrobiana dos desinfetantes Cloreto de
42 Benzalcônio e Iodóforos frente à cepas de *Escherichia coli* de alta
43 patogenicidade (APEC) de origem aviária, **Revista Brasileira de Produção e**
44 **Saúde Animal**, v.18. n.1 , p. 10-15, 2017.
- 45 CAMBOIM, E.K.A.; NEVES, P.B.; GARINO, JR, F.; MEDEIROS, J.M.; RIET-
46 CORREA, F. Prototecose: uma doença emergente. **Pesquisa Veterinária**
47 **Brasileira**, v.30, p.94-101, 2010.
- 48 COSTA, E.O.; MELVILLE, P.A.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T. Evaluation of
49 the occurrence of algae of the genus *Prototheca* in cheese and milk from Brazilian
50 dairy herds. In: GARLAND, T.; BARR, A.C. **Toxic Plants and Other Natural**
51 **Toxicants**. Texas, p.373-376, 1988.

- 52 DOMINGUES P.F.; LANGONI H. **Manejo sanitário animal**. 1ed. Rio de Janeiro:
53 EPUB, 2001.
- 54 ELY, V.L.; GRESSLER, L. T.; SUTILI, F. J.; RIBEIRO, M.G.; COSTA, M.M.;
55 VARGAS, A.C.; BOTTON, S.Á. Biofilm formation by *Prototheca zopfii* isolated
56 from clinical and subclinical bovine mastitis in distinct growth conditions under
57 different dyes. **Ciência Rural**, v. 49, n.2, p. e20180574, 2019.
- 58 ELY, V.L.; COSTA, M.M.; OLIVEIRA, H.P.; DA SILVA JÚNIOR, F.A.G.;
59 PEREIRA, D.I.B.; SOARES, M.P.; VARGAS, A.C.; SANGIONI, L.A.;
60 CARGNELUTTI, J.F.; RIBEIRO, M.G.; BOTTON, S.A. *In vitro* algicidal effect of
61 polypyrrole on *Prototheca* species isolates from bovine mastitis. **Medical**
62 **Mycology**, v.58, n.8, p.1114-1119, 2020.
- 63 ESPINOZA MUÑOZ, M. E. **Resistência aos compostos de amônio**
64 **quaternário (QACs) de uso doméstico e hospitalar em patógenos**
65 **prioritários multirresistentes**. Dissertação (Mestrado em Farmácia) Faculdade
66 de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, p.79, 2019.
- 67 FIDELIS, C. E.; FRANKE, M.; ABREU, L. C. R.; JAGIELSKI, T.; RIBEIRO, M. G.;
68 SANTOS, M. V.; GONÇALVES, J. L. MALDI-TOF MS identification of *Prototheca*
69 algae associated with bovine mastitis. **Journal of Veterinary Diagnostic**
70 **Investigation**, v.33, n.6, p. 1168-1171, 2021.
- 71 GERBA, C. P. Quaternary ammonium biocides: Efficacy in application. **Applied**
72 **and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 2, p. 464–469, 2015.
- 73 GODOFREDO, V. R. et al. Cutaneous protothecosis in kidney transplant
74 recipient. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.95, p. 210-213, 2020.
- 75 GONÇALVES, J.L.; TOMAZI, T.; BARREIRO, J.R.; BRAGA, P.A.; FERREIRA,

- 76 C.R.; ARAÚJO JÚNIOR, J.P.; EBERLIN, M.N.; DOS SANTOS, M.V. Identification
77 of *Corynebacterium* spp. isolated from bovine intramammary infections by matrix-
78 assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Veterinary**
79 **Microbiology**, v. 173, p. 147-151, 2014.
- 80 GONÇALVES, J. L.; LEE, S. H. I.; ARRUDA, E P.; GALLES, D. P.; CAETANO,
81 V. C.; OLIVEIRA, C. A. F.; FERNANDES, A. M.; SANTOS, M. V. Biofilm-
82 producing ability and efficiency of sanitizing agents against *Prototheca zopfii*
83 isolates from bovine subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 6,
84 p. 3613–3621, 2015.
- 85 GUERRA, S.T.; ORSI, H.; JOAQUIM, S.F.; GUIMARÃES, F.F.; LOPES, B.C.;
86 DALANEZI, F.M.; LEITE, D.S.; LANGONI, H.; PANTOJA, J.C.F.; RALL, V.L.M.;
87 HERNANDES, R.T.; LUCHEIS, S.B.; RIBEIRO, M.G. Investigation of extra-
88 intestinal pathogenic *Escherichia coli* virulence genes, bacterial motility, and
89 multidrug resistance pattern of strains isolated from dairy cows with different
90 severity scores of clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v.103, p.3606-
91 3614, 2020.
- 92 HOLLINGSWORTH, S.R. Canine protothecosis. **Veterinary Clinical North**
93 **American Small Animal Practice**, v.30, p.1091-1101, 2000.
- 94 HUILCA-IBARRA, M.P.; VASCO-JULIO, D.; LEDESMA, Y.; GUERRERO-
95 FREIRE, S.; ZURITA, J.; CASTILLEJO, P.; BARCELÓ BLASCO, F.; YANEZ, L.;
96 CHANGOLUISA, D.; ECHEVERRÍA, G.; BASTIDAS-CALDES, C.; WAARD, J.H.
97 High prevalence of *Prototheca bovis* infection in dairy cattle with chronic mastitis
98 in Ecuador. **Veterinary Science**, v.9, e659, 2022.
- 99 JAGIELSKI, T.; LAGNEAU, P.E. Protothecosis. A pseudofungal infection.
100 **Journal Mycology and Medical**, v.17, p. 261–270, 2007.
- 101 JAGIELSKI, T.; BUZZINI, P.; LASSA, H.; MALINOWSKI, E.; BRANDA, E.;
102 TURCHETTI, B.; POLLEICHTNER, A.; ROESLER, U.; LAGNEAU, P.E.;

- MARQUES, S.; SILVA, E.; THOMPSON, G.; STACHOWIAK, R.; BIELECKI, J.
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.; BAKULA, Z.; PLEN, M.; KAMINSKI, M.; NOWAKOWSKA, J.;
BIELECKI, J.; WOLSKA, K. I.; GRUDNIAK, A. M. The activity of silver
nanoparticles against microalgae of the *Prototheca* genus. **Nanomedicine**, v. 13,
n. 9, p. 1025–1036, 2018.
- JAGIELSKI, T.; BAKULA, Z.; GAWOR, J.; MACISZEWSKI, K.; KUSBER, W. H.;
DYLAG, M.; NOWAKOWSKA, J.; GROMADKA, M.; KARNKOSWSKA, A. The
genus *Prototheca* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) revisited: Implications from
molecular taxonomic studies. **Algal Research**, v. 43, n. March, p. 1–19, 2019a.
- JAGIELSKI, T. KRUKOWSKI, H.; BOCHNIARZ, M.; PIECH, T.; ROESKE, K.;
BAKULA, Z.; WLAZLO, L.; WOCH, P. Prevalence of *Prototheca* spp. on dairy
farms in Poland – a cross-country study. **Microbial Biotechnology**, v. 12, n. 3,
p. 556–566, 2019b.
- JÁNOSI, S.; SZIGETI, G.; RÁTZ, F et al. *Prototheca zopfii* mastitis in dairy herds
under continental climatic conditions. **Veterinary Quarterly**, v.23, p. 80-83, 2001.
- KANO, R. Emergence of fungal-like organisms: *Prototheca*. **Mycopathologia**,
v.185, n.5, p.747-754, 2019.
- KLAAS, I.C.; ZADOKS, R.N. An update on environmental mastitis: Challenging
perceptions. **Transboundary and Emerging Disease**, v.65, p.166-85, 2018.
- LANGONI, H.; DOMINGUES, P. F.; DIAS, H. T.; MOTA, R. A.; SFORCIN, A.
Mastite bovina por *Prototheca* (*Prototheca zopfii*). In: Resumo dos anais do IV
Congresso de Iniciação Científica da UNESP. Araçatuba, São Paulo, nº CBMV-
12, p. 92-93, 1992.

- 134 LANGONI, H.; TRONCARELLI, M.Z.; WANDERLEY, G.G.; SALINA, A.
135 Prototecose mamária: Um problema nos rebanhos leiteiros. **Veterinária e**
136 **Zootecnia**, v.20, n.4, p.552-566, 2013.
- 137 LASSA, H.; JAGIELSKI, T.; MALINOWSKI, E. Effect of different treatments and
138 disinfectants on the survival of *Prototheca zopfii*. **Mycopathologia**, v.171, n.3,
139 p.177-182, 2010.
- 140 LASS-FLÖRL, C.; MAYR, A. Human protothecosis. **Clinical Microbiology**, v.20,
141 p. 230-242, 2007.
- 142 LE ROUX, A.; GUMBER, S.; BAUER, R.W. et al. Algal Meningoencephalitis due
143 to *Prototheca* spp. in a Dog. **Case Reports in Veterinary Medicine**, 2013.
- 144 LERCHE, M. Eine durch algen (*Prototheca*) hervorgerufen mastitis der kuh.
145 **Berliner und Münchener. Tierärztliche Wochenschrift**, v.65, p.64-69, 1952.
- 146 LI, J.; CHEN, X.; JIN, E.; WANG, G.; WU, L.; SHAO, Z.; WAN, P.; HU, C.; LI, J.;
147 CHEN, J.; DING, M. A survey of *Prototheca bovis* infection in dairy farms of the
148 Hubei province, China. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.83, n.8,
149 p.1248-1255, 2021.
- 150 LIBISCH, B.; PICOT, C.; CEBALLOS-GARZON, A.; MORAVKOVA, M.;
151 KLIMESOVÁ, M.; TELKES, G.; CHUANG, S.; LE PAPE, P. *Prototheca* infections
152 and ecology from a one health perspective. **Microorganisms**, v.10, n.5, e938,
153 2022.
- 154 MACEDO, J.T.; RIET-CORREA, F.; DANTAS, A.F.; SIMÕES, S.V. Cutaneous
155 and nasal protothecosis in a goat. **Veterinary Pathology**, v.45, p.352-354, 2008.

- 156 MARQUES, S.; SILVA, E.; CARVALHEIRA, J.; THOMPSON, G. In vitro
157 antimicrobial susceptibility of *Prototheca wickerhamii* and *Prototheca zopfii*.
158 **Journal of Dairy Science**, v.89, n.4202-4204, 2006.
- 159 MARQUES, S.; SILVA, E.; CARVALHEIRA, J.; THOMPSON, G. Phenotypic
160 characterization of mastitic *Prototheca* spp. isolates. **Research in Veterinary**
161 **Science**, v.89, p.5-9, 2010.
- 162 MAYORGA, J.; BARBA-GÓMEZ, J. F.; VERDUZCO-MARTÍNEZ, A. P.; MUÑOZ-
163 ESTRADA, V.F.; WELSH, O. Protothecosis. **Clinics in Dermatology**, v. 30, p.
164 432- 436, 2012.
- 165 MCDONALD, J.S.; RICHARD, J.L.; CHEVILLE, N.F. Natural and experimental
166 bovine intramammary infection with *Prototheca zopfii*. **American Journal of**
167 **Veterinary Research**, v.45, n.3, p.592-595, 1984.
- 168 MCDONNEL, G.; RUSSEL, A.D. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action,
169 and Resistance. **Clinical and Microbiology Review**, v.12, p. 147-179, 1999.
170
- 171 MELVILLE, P.A.; BENITES, N.R.; SINHORINI, I.L.; COSTA, E.O. Susceptibility
172 and features of the ultrastructure of *Prototheca zopfii* following exposure to
173 copper sulphate, silver nitrate and chlorexidine. **Mycopathologia**, v.156, p. 1-7,
174 2002.
175
- 176 MIN, Z.; MOSER, S.A.; PAPPAS, P.G. *Prototheca wickerhamii* algaemia
177 presenting as cholestatic hepatitis in a patient with systemic lupus
178 erythematosus: A case report and literature review. **Medical Mycology Case**
179 **Reports**, v.2, p. 19-22, 2013.
180
- 181 MIURA, S. M. **Compostos contendo Amônio Quaternário para prevenção da**
182 **formação do biofilme oral**. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de
183 odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas. São Paulo,
184 p.91, 2019.

- 185 MÖLLER, A.; TRUYEN, U.; ROESLER, U. *Prototheca zopfii* genotype 2. The
186 causative agent of bovine protothecal mastitis. **Veterinary Microbiology**, v.39,
187 p.1-7, 2006.
- 188
- 189 MORANDI, S.; CREMONESI, P.; CAPRA, E.; SILVETTI, T.; DECIMO, M.;
190 BIANCHINI, V.; ALVES, A.C.; VARGAS, A.C.; COSTA, G.M.; RIBEIRO, M.G.;
191 BRASCA, M. Molecular typing and differences in biofilm formation and antibiotic
192 susceptibilities among *Prototheca* strains isolated in Italy and Brazil. **Journal of**
193 **Dairy Science**, v.99, n.8, p.6436-6445, 2016.
- 194
- 195 MORANDI, S.; CREMONESI, P.; POVOLO, M.; CAPRA, E.; SILVETTI, T.;
196 CASTIGLIONI, B.; RIBEIRO, M.G.; ALVES, A.C.; DA COSTA, G.M.; LUINI, M.;
197 BRASCA, M. *Prototheca blaschkeae* subsp. *brasiliensis* subsp. nov., isolated
198 from cow milk. **International Journal of Systematic and Evolutionary**
199 **Microbiology**, v.67, n.10, p.3865-3871, 2017.
- 200
- 201 MORELLO, L.; TIROLI, T.; ARETINO, F.; MORANDI, S.; BREVIARIO, D.
202 Preliminary results, perspectives, and proposal for a screening method of *in vitro*
203 susceptibility of *Prototheca* species to antimicrotubular agents. **Antimicrobial**
204 **Agents and Chemotherapy**, v.64, n.3, e01392-19, 2020.
- 205
- 206 NARDONI, S.; PISSERI, F.; PISTELLI, L.; NAJAR, B.; LUINI, M.; MANCIANTI,
207 F. *In vitro* activity of 30 essential oils against bovine clinical isolates of *Prototheca*
208 *zopfii* and *Prototheca blaschkeae*. **Veterinary Sciences**, v.24, n.2, 2018.
- 209
- 210 NMC. National Mastitis Council. **Laboratory Handbook on Bovine Mastitis**.
211 1.ed. Madison: WI, NMC Inc.,1999. p.222.

- 212 PARK, H.; MOON, D.C.; HYUN, B.; LIM, S. Short communication: Occurrence
213 and persistence of *Prototheca zopfii* in dairy herds of Korea. **Journal of Dairy**
214 **Science**, v.102, n.3, p.2539-2543, 2019.
- 215
- 216 PIEPER, L.; GODKIN, A.; ROESLER, U.; POLLEICHTNER, A.; SLAVIC, D.;
217 LESLIE, K E.; KELTON, D F. Herd characteristics and cow-level factors
218 associated with *Prototheca* mastitis on dairy farms in Ontario, Canada. **Journal**
219 **of Dairy Science**, v. 95, n. 10, p. 5635–5644, 2012.
- 220
- 221 PINZÓN-SÁNCHEZ, C.; RUEGG, P.L. Risk factors associated with short-term
222 post-treatment outcomes of clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v,94,
223 p.3397–3410, 2011.
- 224
- 225 PORE, R.S. *Prototheca* taxonomy. **Mycopathologia**, v.90, p.129-139, 1985.
- 226
- 227 PORE, R.S.; SHAHAN, T.A. *Prototheca zopfii*: Natural, transient, occurrence in
228 pigs and rats **Mycopathologia**, v.101, p.85-88, 1988.
- 229
- 229 RAJAN, A. Cutaneous protothecosis in an immunocompetent host. **Indian**
230 **Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v.86, p.414-417, 2020.
- 231
- 232 RIBEIRO, M.G.; MELVILLE, P.A.; GUIMARAES, E.O.C.F. Prototecose. *In*:
233 Megid, J.; Ribeiro, M. G.; Paes, A. C. **Doenças Infecciosas em Animais de**
234 **Produção e de Companhia**. 1ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016, p. 958-969.
- 235
- 236 RIBEIRO, M.G. Protothecosis. *In*: AIELLO, S.E. (Org.). **The Merck Veterinary**
237 **Manual**. 12ed. Duluth, Georgia, USA: Merck & CO., Inc, 2021(online).
- 238
- 238 RIBEIRO, M.G; MORAES, A.B.C.; ALVES, A.C.; BOLAÑOS, C.A.D.; DE PAULA,
239 C.L.; PORTILHO, F.V.R.; DE NARDI JÚNIOR, G.; LARA, G.H.B.; MARTINS,
240 L.S.A.; MORAES, L.S.; RISSETI, R.M.; GUERRA, S.T.; BELLO, T.S.;
241 SIQUEIRA, A.K.; BERTOLINI, A.B.; RODRIGUES, C.A.; PASCHOAL, N.R.;
242 ALMEIDA, B.O.; LISTONI, F.J.P.; SÁNCHEZ, L.F.G.; PAES, A.C. *Klebsiella-*

243 induced infections in domestic species: a case-series study in 697 animals (1997-
244 2019). **Brazilian Journal of Microbiology**, v.53, n.1, p.455-464, 2022.

245

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

250

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

254

255 ROESLER, U.; SCHOLZ, H.; HENSEL, A. Immunodiagnostic identification of
256 dairy cows infected with *Prototheca zopfii* at various clinical stages and
257 discrimination between infected and uninfected cows. **Journal Clinical**
258 **Microbiology**, v.39, p.539-543, 2001.

259 ROESLER, U.; MÖLLER, A.; HENSEL, A.; BAUMANN, D.; TRUYEN, U. Diversity
260 within the current algal species *Prototheca zopfii*: a proposal for two *Prototheca*
261 *zopfii* genotypes and description of novel species, *Prototheca blaschkeae* sp.
262 nov. **International Journal System Evolution Microbiology**, v.53, p.1195-
263 1199, 2006.

264 RUEGG, P.L. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and
265 prevention. **Journal Dairy Science**. v.100, n.10, p.10381-97, 2017.

266 RUEGG, P.L. Mastitis in large animals. In: AIELLO, S.E. (Org.). **The Merck**
267 **Veterinary Manual**. 11ed., Duluth, Georgia, USA: Merck & CO., Inc, 2016.
268 p.1358-1368.

269 SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Controle da mastite e qualidade do leite**.

- 270 **Desafios e soluções.** Pirassununga: Editora Esalq-USP. São Paulo. 2019. p.
271 301.
- 272 SALERNO, T.; RIBEIRO, M.G.; LANGONI, H. et al. *In vitro* algacide effect of
273 sodium hypochlorite and iodine based antiseptics on *Prototheca zopfii* strains
274 isolated from bovine milk. **Research Veterinary Science**, v.88, p.211-213, 2010.
- 275 SAWINSKI, P.K.; MEVEN, M.; ENGLERT, U.; DRONSKOWSKI, R. Single-
276 Crystal Neutron Diffraction Study on Guanidine, CN₃H₅. **American Chemical**
277 **Society**, v.3, p.1730–1735, 2013.
- 278 SCACCABAROZZI, L.; TURCHETTI, B.; BUZZINI, P.; PISONI, G.; BERTOCCHI,
279 L.; ARRIGONI, N.; BOETTCHER, P.; BRONZO, V.; MORONI, P. Short
280 communication: isolation of *Prototheca* species strains from environmental
281 sources in dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v.91, n.9, p.3474-7, 2008.
- 282 SHAHID, M.; GAO, J.; ZHOU, Y.; LIU, G.; ALI, T.; DENG, Y.; SABIR, N.; SU, J.;
283 HAN, B. *Prototheca zopfii* isolated from bovine mastitis induced oxidative stress
284 and apoptosis in bovine mammary epithelial cells. **Oncotarget**, v.8, n.19,
285 p.31938-31947, 2017.
- 286 SHAVE, C.D.; MILLYARD, L.; MAY, R.C. Now for something completely different:
287 *Prototheca*, pathogenic algae. **PLoS pathogens**, v. 17, n. 4, p.1–7, 2021.
- 288 SPEROTTO, V. R.; DENARDI, L. B.; WEIBLEM, C.; JESUS, F. P. K.;
289 DORNELES, M. R.; IANISKI, L. B.; SANTUARIO, J. M. Short communication:
290 Algicide activity of antimicrobial peptides compounds against *Prototheca bovis*.
291 **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 3, p. 3554–3558, 2021.
- 292 TASHAKKORI, N.; RAHMANI, H.K.; KHORAMIAN, B. Genotypic and phenotypic
293 diversity of *Prototheca* spp. recovered from bovine mastitis in terms of
294 antimicrobial resistance and biofilm formation ability. **BMC Veterinary Research**,
295 v.18, e.452, 2022.

- TEZEL, U.; PAVLOSTATHIS, S. G. Quaternary ammonium disinfectants: Microbial adaptation, Degradation and ecology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 33, p. 296–304, 2015.
- THOMPSON, G.; SILVA, E.; MARQUES, S.; MÜLLER, A. CARVALHEIRA, J. Algaemia in a dairy cow by *Prototheca blaschkeae*. **Medical Mycology**, v.47, n.5, p.527-531, 2009.
- TOMASINSIG, L.; SKERLAVAJ, B.; SCARSINI, M.; GUIDA, F.; PICCININI, R.; TOSSI, A.; ZANETTI, M. 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.105-13, 2012.
- WANG, X.; RAN, Y.; JIA, S.; AHMED, S.; LONG, X.; JIANG, Y.; JIANG, Y. Human Disseminated Protothecosis: The Skin is the “Window”? **Frontiers in Immunology**, v.13. p.1-11, 2022.
- YAMAMURA, A. A. M.; MÜLLER, E. E.; FREIRE, R. L.; FREITAS, J. C.; GIORDANO L. G. P.; TOLEDO R. S.; RIBEIRO, M. G. Fatores de risco associados à mastite bovina causada por *Prototheca zopfii*. **Ciência Rural**, v.38, p.755-760, 2008.
- ZAK, I.; JAGIELSKI, T.; KWIATKOWSKI, S.; BIELECKI, J. *Prototheca wickerhamii* as a cause of neuroinfection in a child with congenital hydrocephalus. First case of human protothecosis in Poland. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.74, p. 186-189, 2012.
- ZHAO, W.; XU, M.; BARKEMA, H.W.; XIE, X.; LIN, Y.; KHAN, S.; KASTELIC, J.P.; WANG, D.; DENG, Z.; HAN, B. *Prototheca bovis* induces autophagy in bovine mammary epithelial cells via the HIF-1 α and AMPK α /ULK1 pathway. **Frontiers in Immunology**, v.13, e934819, 2022.

Anexo 1. Principais características de produção e instalações de três fazendas de alta produção leiteira nos estados de São Paulo e Minas Gerais, com isolamento de *Prototheca* spp. (2017-2019).

CARACTERÍSTICAS DAS FAZENDAS	B	E	J
Animais/Raças	HPB	HPB	HPB
Nº de vacas em lactação	203	510	300
Produção diária (L/dia)	4900	14280	10000
Produção leiteira média L/animal/dia	24	28	30
Tipo de instalações	<i>Free Stall</i>	<i>Free Stall</i>	<i>Compost barn</i>
Higiene das instalações	Regular	Boa	Boa
Higiene do equipamento	Boa	Boa	Boa
Sala de ordenha	Sim	Sim	Sim
Tanque de resfriamento	Sim	Sim	Sim

Anexo 2. Principais características de manejo de ordenha em três fazendas com isolamento de *Prototheca* sp. em vacas com mastite clínica (2017-2019).

CARACTERÍSTICAS DAS FAZENDAS	B	E	J
Nº de ordenhas	3	3	2
Alimentação pós ordenha	Sim	Sim	Sim
Tipo secagem:	Abrupta	Abrupta	Abrupta
Ordenha mecânica	Duplo 8	Duplo 12	Duplo 6
Higiene do equipamento	Boa	Boa	Boa
Qualidade da mão de obra	Boa	Boa	Boa
Assistência veterinária	Sim	Sim	Não

Anexo 3. Atestado de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA) – FMVZ/UNESP - Botucatu, SP.



A T E S T A D O

Atesto que o subprojeto intitulado “**especialização por espectrometria de massas e efeito in vitro do ozônio (O3) e quaternário de amônio em isolados de Prototheca sp. obtidos de vacas com mastite clínica**” faz parte do Projeto “**E. coli, Klebsiella pneumoniae e Enterococcus spp.: Impacto dos fatores de virulência na mastite bovina e reflexos na saúde pública**”, **Protocolo CEUA 136/2017**, aprovado em 08 de junho de 2017, a ser conduzido por **Marcelo Fagali Arabe Filho**, orientado pelo Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro, para fins de pesquisa científica, e encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

Botucatu, 23 de maio de 2022.

JULIANY GOMES QUITZAN
Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

Anexo 4. Dados epidemiológicos gerais, efeito algicida *in vitro* do quaternário de amônio e diagnóstico por espectrometria de massas de 44 isolados de prototecas obtidos de vacas com mastite clínica em fazendas do estado de São Paulo e Minas Gerais (2017-2019).

	MALDI-TOF MS	Raça	Quarto mamário	Sazonalidade	Fazenda	C.A.M. (ppm)
1	<i>Prototheca bovis</i>	HPB	AE	VERÃO	E	8
2	<i>Prototheca bovis</i>	HPB	AD	INVERNO	E	8
3	<i>Prototheca bovis</i>	HPB	AE	OUTONO	E	17
4	<i>Prototheca bovis</i>	HPB	AE	OUTONO	E	8
5	<i>Prototheca</i> sp.	HPB	PD	OUTONO	E	8
6	<i>Prototheca bovis</i>	HPB	AE	OUTONO	E	8
7	<i>Prototheca bovis</i>	HPB	AE	OUTONO	E	17
8	<i>Prototheca bovis</i>	HPB	PD	OUTONO	E	8
9	<i>Prototheca bovis.</i>	HPB	PE	INVERNO	E	35
10	<i>Prototheca</i> sp.	HPB	PE	INVERNO	E	17

11	<i>Prototheca bovis</i>	HPB	AE	INVERNO	E	8
12	<i>Prototheca bovis</i>	HPB	AD	INVERNO	E	8
13	<i>Prototheca bovis</i>	HPB	PD	INVERNO	E	8
14	<i>Prototheca bovis</i>	HPB	PD	INVERNO	E	35
15	<i>Prototheca bovis</i>	HPB	PD	PRIMAVERA	E	17
16	<i>Prototheca bovis</i>	HPB	PE	PRIMAVERA	E	8
17	<i>Prototheca bovis</i>	HPB	AE	PRIMAVERA	E	17
18	<i>Prototheca bovis</i>	HPB	PE	PRIMAVERA	E	17
19	<i>Prototheca bovis</i>	HPB	AE	PRIMAVERA	E	17
20	<i>Prototheca bovis</i>	HPB	PE	PRIMAVERA	E	8
21	<i>Prototheca bovis</i>	HPB	PD	PRIMAVERA	E	8
22	<i>Prototheca bovis</i>	HPB	AE	PRIMAVERA	E	35
23	<i>Prototheca bovis</i>	HPB	PD	PRIMAVERA	E	17
24	<i>Prototheca bovis</i>	HPB	AE	PRIMAVERA	E	17

25	<i>Prototheca</i> sp.	HPB	AD	PRIMAVERA	E	17
26	<i>Prototheca bovis</i>	HPB	AE	PRIMAVERA	E	8
27	<i>Prototheca bovis</i>	HPB	PD	PRIMAVERA	E	17
28	<i>Prototheca bovis</i>	HPB	AE	PRIMAVERA	E	17
29	<i>Prototheca bovis</i>	HPB	AD	PRIMAVERA	E	8
30	<i>Prototheca bovis</i>	HPB	AE	PRIMAVERA	E	17
31	<i>Prototheca bovis</i>	HPB	PD	VERÃO	E	8
32	<i>Prototheca bovis</i>	HPB	PD	PRIMAVERA	E	8
33	<i>Prototheca bovis</i>	HPB	PD	PRIMAVERA	E	8
34	<i>Prototheca bovis</i>	HPB	PD	PRIMAVERA	E	8
35	<i>Prototheca bovis</i>	HPB	PD	OUTONO	B	35
36	<i>Prototheca bovis</i>	HPB	AD	INVERNO	B	8
37	<i>Prototheca bovis</i>	HPB	PD	INVERNO	B	17
38	<i>Prototheca</i> sp.	HPB	AD	VERÃO	B	35

39	<i>Prototheca</i> sp.	HPB	AE	VERÃO	B	8
40	<i>Prototheca bovis</i>	HPB	PD	VERÃO	B	17
41	<i>Prototheca bovis</i>	HPB	PD	VERÃO	B	35
42	<i>Prototheca bovis</i>	HPB	PE	PRIMAVERA	J	8
43	<i>Prototheca bovis</i>	HPB	PD	PRIMAVERA	J	35
44	<i>Prototheca bovis</i>	HPB	AE	PRIMAVERA	J	17

HPB: Holandês Preto e Branco

AD/AE: Anterior direito/esquerdo

PD/PE: Posterior direito/esquerdo