

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 28/07/2023.

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.

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 **Berlinder und Munchener. Tierarsztliche 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.