



Recibido: 14/11/2023, Aceptado: 12/1/2024, Publicado: 5/2/2024

Montalvo Castro, C. X., Toro Molina, B. M., Vera Saltos, S. M. y Chacón Marcheco, E. (2024). Determinación de *Prototheca* spp., en vacas en producción en dos zonas geográficas del Ecuador. *Márgenes. Revista multitemática de desarrollo local y sostenibilidad*, 12(1), 263-279
<https://revistas.uniss.edu.cu/index.php/margenes/article/view/1791/version/1838>

DETERMINACIÓN DE *PROTOTHECA* SPP. EN VACAS EN PRODUCCIÓN EN DOS ZONAS GEOGRÁFICAS DEL ECUADOR
DETERMINATION OF *PROTOTHECA* SPP. IN PRODUCING CATTLE IN TWO GEOGRAPHICAL AREAS OF ECUADOR

Autores:

Lic. Cristina Ximena Montalvo Castro¹

cristina.montalvo9486@utc.edu.ec

<https://orcid.org/0009-0000-8449-7218>

Mgtr. Blanca Mercedes Toro Molina¹

blanca.toro@utc.edu.ec

<https://orcid.org/0000-0003-3772-5200>

Est. Stephanie Mishelle Vera Saltos²

SMVERA@puce.edu.ec

<https://orcid.org/0009-0006-3404-3131>

Dr. C. Edilberto Chacón Marcheco¹

edilberto.chacon@utc.edu.ec

<https://orcid.org/0000-0001-9590-6451>

¹Universidad Técnica de Cotopaxi, Latacunga, Cotopaxi, Ecuador.

² Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Pichincha, Ecuador.

***Prevención de enfermedades infecciosas y parasitarias en los animales domésticos de la zona 3 de Ecuador, asociado a la línea de investigación Salud Animal.**

RESUMEN

Introducción: Las *Prototheca spp.*, son microalgas presentes en variados hábitats naturales. Se conoce que la mastitis bovina causada por el género *Prototheca*, puede convertirse en un potencial problema de zoonosis, entre las especies de dicho género *Prototheca bovis* ha demostrado mayor prevalencia.

Objetivo: El objetivo de la presente investigación fue determinar la presencia de *Prototheca spp.* en hembras bovinas durante la etapa de producción, en dos zonas geográficas del Ecuador.

Métodos: La investigación se realizó en la parroquia de Machachi (clima frío) y la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas (clima cálido). Se tomaron 110 muestras procedentes de vacas con mastitis subclínica o clínica, realizándose: a) cultivos microbiológicos, caracterizándose los parámetros (evaluación de la morfología, observación microscópica y determinación de las especies; b) confirmación de identidad mediante técnicas moleculares, con amplificación de los genes *cytb* y 18S.

Resultados: La provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas resultó ser una zona propicia para la propagación de *Prototheca spp.*, debido a su clima cálido. Se identificó sensibilidad de dicha especie a gentamicina *in vitro* por difusión en disco y solo dos cepas fueron negativas a glicerol. Molecularmente se identificó a la especie *P. bovis*, la cual tuvo una incidencia global de 10%. De forma complementaria en Machachi se identificó un microorganismo perteneciente al orden Filobasidiales, el cual tiene capacidad potencial de producir mastitis.

Conclusiones: Quedó demostrado el papel de *Prototheca spp.*, en casos de vacas con mastitis, identificándose la especie *P. bovis* mediante la secuenciación del gen *cytb*.

Palabras clave: algas; enfermedad animal; gen; industria lechera; microorganismo

ABSTRACT

Introduction: *Prototheca spp.*, are microalgae present in various natural habitats. It is known that bovine mastitis caused by the *Prototheca* genus can become a potential

zoonosis problem. Among the species of this genus, *Prototheca bovis* has shown the highest prevalence.

Objective: The objective of this investigation was to determine the presence of *Prototheca spp.* in female cattle during the production stage, in two geographical areas of Ecuador.

Methods: The research was carried out in the parish of Machachi (cold climate) and the province of Santo Domingo de los Tsáchilas (warm climate). A total of 110 samples were taken from cows with subclinical or clinical mastitis. The following were performed: a) microbiological cultures, characterizing the parameters (evaluation of morphology, microscopic observation and determination of the species; b) confirmation of identity using molecular techniques, with amplification of the *cytb* and 18S genes.

Results: The province of Santo Domingo de los Tsáchilas proved to be a favorable area for the propagation of *Prototheca spp.* due to its warm climate. Sensitivity of this species to gentamicin *in vitro* by disc diffusion was identified and only two strains were negative to glycerol. Molecularly, the species *P. bovis* was identified, which had a global incidence of 10%. In addition, a microorganism belonging to the order Filobasidiales was identified in Machachi, which has the potential to cause mastitis.

Conclusions: The role of *Prototheca spp.* in cases of cows with mastitis was demonstrated, identifying the species *P. bovis* by sequencing of the *cytb* gene.

Keywords: algae; animal disease; gene; dairy industry; microorganism

INTRODUCCIÓN

Las *Prototheca spp.*, son microalgas estrechamente emparentadas a las algas verdes *Chlorella* (Shave et al., 2021), las mismas que se encuentran en una amplia serie de hábitats naturales, prosperando en ambientes acuosos ricos de materia orgánica en descomposición, a la vez, se pueden encontrar en suelos, bebederos y en áreas donde se acumulan las excreciones del ganado

La mastitis bovina causada por el género *Prototheca*, puede convertirse en un potencial problema de zoonosis (Bozzo et al., 2022). Según el marcador genético mitocondrial del gen *cytb*, se distinguen catorce especies de *Prototheca*, de los cuales *P. blaschkeae* y *P. bovis* son los agentes etiológicos de mayor prevalencia en la protothecosis mamaria bovina, cabe considerar, que esta última especie, es conocida como la más patógena,

debido a que ocasiona un deterioro progresivo en el parénquima de la glándula mamaria.

Resulta importante tomar en cuenta que los cambios climáticos, favorecen la multiplicación de las algas en el entorno (Milanov et al., 2016), lo que permite generar condiciones favorables para la propagación del mencionado agente etiológico, siendo las zonas cálidas con climas húmedos los más propicios, por lo que, en las explotaciones ganaderas se debe brindar mayor importancia al diagnóstico correcto de la enfermedad, con la finalidad de prevenir posibles contagios y manejar de forma adecuada la producción lechera, haciendo hincapié en la Salud Animal de los individuos (Shahid et al., 2020).

Por ello, el objetivo de la presente investigación fue determinar la presencia de *Prototheca spp.* En hembras bovinas durante la etapa de producción, en dos zonas geográficas del Ecuador.

DESARROLLO

Es preciso destacar que los agentes etiológicos *P. wickerhamii* y *P. bovis* son de gran importancia para la salud, al haber sido aislados en humanos y gatos; y canes respectivamente (Libisch et al., 2022), lo que denota, su trascendencia para la Salud Humana, Animal y Medio Ambiente, pues se ha demostrado que *Prototheca spp.* se adapta a diversos entornos, lo que le permite asegurar su prevalencia (Libisch et al., 2022).

La Prototheca spp., tiene la capacidad de acceder a través del orificio del pezón a la glándula mamaria, desde los equipos de ordeño contaminados u otras fuentes del medio ambiente. Dicha infección se limita generalmente en la glándula mamaria y los ganglios linfáticos cercanos, ocasionando una tumefacción granulomatosa; también se conoce que *P. bovis* puede permanecer oculta en la glándula mamaria durante los períodos de secado y reaparecer en el siguiente ciclo de lactancia, logrando propagarse a través de la leche contaminada y las heces (Libisch et al., 2022).

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en dos zonas climáticamente distintas del Ecuador:

- a) Parroquia de Machachi localizada en el cantón Mejía, perteneciente a la provincia de Pichincha en la región Sierra. Ubicada en una zona templada fría con temperaturas entre 6 y 12°C, donde se experimenta la presencia de vientos gélidos y con humedad relativa promedio de 83% (De la Cueva et al., 2021). En la clasificación climática de Köppen-Geiger se asigna a Machachi con un clima de tundra, lo que implica que las temperaturas son notoriamente bajas incluso en los meses más templados, conservándose una precipitación anual de 1.982 mm (Caiza de la Cueva y Taipe Taipe, 2021).
- b) Provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, ubicada dentro de la región Costera, entre los 120 a 1.020 msnm. Zona con un clima tropical o ecuatorial, con una humedad relativa que fluctúa entre 70 y 90%. La temperatura promedio es de 23°C, aunque en algunas parroquias que limitan con la provincia de Los Ríos esta se mantiene alrededor de los 23 a 26°C.

Muestreo

Fueron muestreadas un total de 110 hembras bovinas que provenían de ganaderías dedicadas a la producción de leche, de las cuales 70 correspondieron a la Parroquia de Machachi (clima frío) y 40 a Santo Domingo de los Tsáchilas (clima cálido).

Se recolectaron muestras de leche procedentes de vacas con mastitis subclínica o clínica, diagnosticadas previamente por el Médico Veterinario del predio. En el caso de la sierra (Machachi), se empleó la prueba California Mastitis Test (CMT) como herramienta para el diagnóstico.

Para la toma y recolección de la muestra se aplicaron medidas asépticas de lavado y desinfección de la ubre, las muestras de leche fueron recolectadas en envases estériles de 30 ml. Luego se transportaron las muestras al laboratorio en una hielera para conservar la cadena de frío entre 2-8°C.

Cultivos microbiológicos y parámetros de identificación

En el laboratorio de Biología Molecular de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador - PUCE Quito, se realizaron los cultivos de leche, lo cuales fueron procesados de acuerdo a métodos convencionales: siembra directa (con un asa calibrada de 100 µl),

en cajas Petri con agar Sabouraud adicionando cloranfenicol, para prevenir el desarrollo de bacterias. También se utilizó agar Sabouraud con gentamicina, pero al observar inhibición *in vitro* en el desarrollo de *Prototheca sp.*, se suspendió su utilización. Las cajas se incubaron en aerobiosis de 24 a 72 horas, y 37°C según metodología de (Park et al., 2019).

Los parámetros para la identificación microbiológica fueron:

- a) Evaluación visual de la morfología de las colonias: se observó el desarrollo de colonias en Agar Sabouraud con cloranfenicol.
- b) Observación microscópica del desarrollo del cultivo: a partir de las colonias aisladas, por medio de montajes en fresco con azul de lactofenol (ALF), para observar la estructura celular típica del género *Prototheca*; también se preparó un montaje en fresco con solución salina, para visualizar de mejor manera las estructuras de las algas; de forma complementaria se prepararon coloraciones Gram, para observar dicha alga y detectar la presencia de bacterias.
- c) Determinación de la especie: se analizó la asimilación de galactosa, fructosa y caldo glicerol al 7%.

Los datos obtenidos fueron comparados con información recopilada bibliográficamente, considerando principalmente la utilización de estos hidratos de carbono (Zaror et al., 2011).

Confirmación de identidad mediante técnicas moleculares

Para determinar el genotipo de *Prototheca* se realizó la secuenciación de los genes *cytb* y 18S, a partir del estudio de (Crossley et al., 2020). El estudio se desarrolló en el Laboratorio Zurita & Zurita de la ciudad de Quito, Ecuador, mediante el siguiente procedimiento:

- a) Extracción del ADN genómico usando el kit QIAamp DNA Minikit (QIAGEN, Hilden, Alemania), directamente de los aislamientos obtenidos en el medio de agar. Los procedimientos y reactivos, se utilizaron de acuerdo con el protocolo del fabricante, por lo que se realizaron las siguientes actividades:
 - Recolección y Tratamiento de cultivos de microorganismos:
 - Recolección de muestras y tratamiento con enzimas (lisozima o lisostafina).

- Incubación a 37°C durante al menos 30 minutos.
 - Adición de Enzimas y Buffers:
 - Añadir Proteinasa K y Buffer AL.
 - Incubación a 56°C y 95°C.
 - Centrifugación Continuación del Protocolo:
 - Adición de 500 uL de Buffer AW1, centrifugar 8000 rpm 1 min, y descartar.
 - Adición de 500 uL Buffer AW2, centrifugar 14,000 rpm 3 min, y descartar.
 - Centrifugar a máxima velocidad 1 min para eliminar cualquier arrastre del buffer.
 - Extracción del ADN con Buffer AE o agua destilada, incubar 1 min a temperatura ambiente, y centrifugar a 8000 rpm 1 min.
- b) Cuantificación de ADN: las mediciones de la concentración de ADN se realizaron por espectrofotometría.
- c) Amplificación de genes:
- *Cytb* codifica la proteína incluida en el suministro de electrones en la respiración celular (Jagielski, Bakula et al., 2019), estos genes tienen mayor capacidad discriminatoria para las especies de *Prototheca* y poseen mejor desempeño en la amplificación, secuenciación y análisis de alineación múltiple (Jagielski et al., 2018).
 - 18S rRNA: secuencia genética conservada en organismos eucariotas (Khaw et al., 2020) para *Cryptococcus sp.*, como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Cebadores usados para la amplificación de genes *cytb* y 18S.

GENES	CEBADORES	SECUENCIA	TAMAÑO DEL FRAGMENTO
<i>cytb</i>	F	GyGTwGAACAyATTATGAGAG	650 pb
	R	wACCCATAArAArTACCATTCTWGG	
18S	F	CCTGGTTGATCCTGCCAG	2000 pb
	R	TTGATCCTTCTGCAGGTTCA	

- d) Se utilizaron las siguientes condiciones de ciclado:
- Desnaturalización inicial de 4 minutos (min) a 95°C;
 - 35 ciclos de 30 segundos (s) a 95°C,
 - 1 min a 50°C,
 - 1 min a 72°C;

- y una extensión final de 10 min a 72°C.
- Visualización, los productos de PCR (amplicones) fueron observados en electroforesis en gel de agarosa al 1,5% bajo luz ultravioleta.

e) Secuenciación:

- Los productos de PCR fueron primeramente purificados y la secuenciación se realizó por el método de Sanger, utilizando el kit BigDye Terminator v3.1 y el secuenciador automatizado 3730xl de Applied Biosystems.
- Las secuencias de nucleótidos resultantes fueron determinadas en ambas hebras de los productos de amplificación de PCR en las instalaciones de secuenciación de Macrogen en Seúl, Corea.

f) Alineación y edición de las secuencias

De forma complementaria, los resultados obtenidos de la secuenciación del gen *cytb*, entregados por el laboratorio, se editaron primero para eliminar el ruido en MEGA11 (Análisis de Genética Evolutiva Molecular) y posteriormente se comparó, con una de las bases de datos biológicas más grande del mundo conocido como GenBank, usando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI que proporcionó una identificación hasta especie (Tamura et al., 2021).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de cultivos microbiológicos

En las muestras provenientes de Santo Domingo de los Tsáchilas se obtuvieron 11 cultivos con colonias compatibles a *Prototheca spp.*, observando el desarrollo de colonias blancas, secas, rugosas en el medio de Agar Sabouraud con cloranfenicol (Figura 1a), mientras que, al utilizar gentamicina se inhibió su desarrollo *in vitro*, confirmándose por medio de la prueba de difusión en disco.

En la observación microscópica, se identificaron esporangios de forma redonda u oval (Figura 1b), tanto con presencia, como con ausencia de endosporas mediante las preparaciones a base de Azul de lactofenol (ALF) y solución salina (Figura 1c). En cuanto a la determinación de la especie del microorganismo, se pudo observar que solo dos cepas, fueron glicerol negativas, cumpliendo con los criterios de identificación compatibles con *Prototheca zopfii* según Zaror et al. (2011).

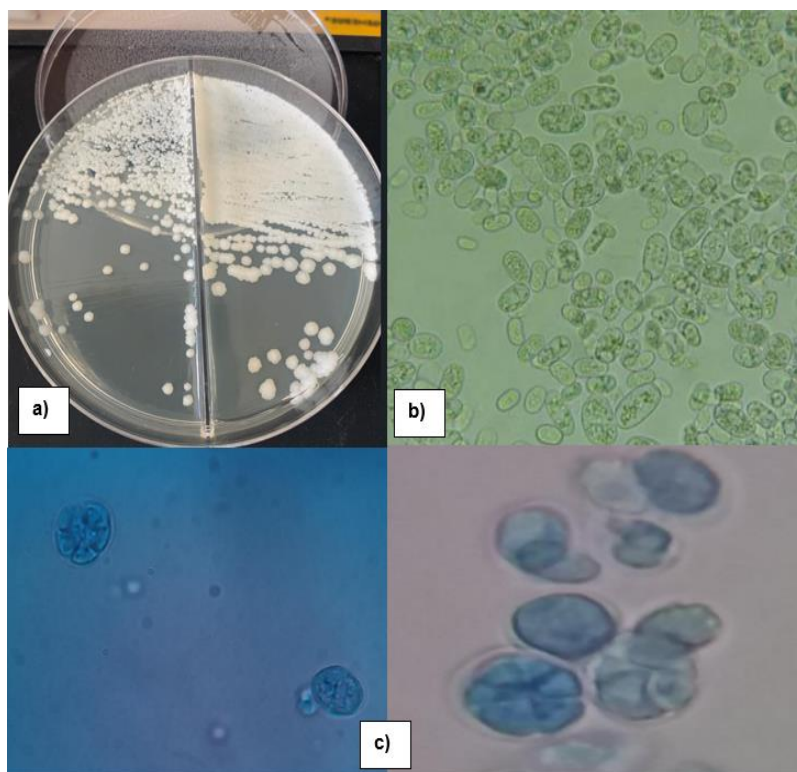


Figura 1. a) *Prototheca* en agar Sabouraud, b) esporangios de forma redonda u oval en solución salina, c) en Azul de lactofenol (ALF).

Mientras que, en la parroquia de Machachi, no se registró aislamientos congruentes con el alga *Prototheca spp.*, en ninguna de las muestras. Sin embargo, en cuatro muestras se efectuó el hallazgo de *Filobasidium uniguttulatum*, especie que según Fadda et al. (2013), es la fase sexual de la especie *Cryptococcus uniguttulatus* (Figura 2), considerado un hongo levaduriforme, dicho género posee baja prevalencia para causar mastitis bovina (Spanamberg et al., 2008).



Figura 2. *Cryptococcus uniguttulatus* aislada de muestras provenientes de clima frío.
Caldo Bristol.

Los hallazgos alcanzados, son consecuentes de que la variabilidad geográfica juega un papel crucial que presentan disparidades de resultados en la distribución de las especies aisladas de la leche de vacas con mastitis (Fadda et al., 2013) y en el caso de las algas la variedad identificada presenta adaptaciones específicas a ciertos entornos como el clima cálido sugiriendo que estas pueden haber evolucionado independientemente en diferentes partes del mundo como con los miembros con quienes comparten afinidad taxonómica (Hodac et al., 2016).

Identificación de las especies de *Prototheca* por técnicas moleculares

Al aplicar el análisis del gen *cytb* se identificó solo un genotipo de *Prototheca zopfii*, que al ser comparados con secuencias descritas por Libisch et al. (2022), las secuencias resultaron pertenecer a *P. bovis*.

Los aislados reportados en Santo Domingo de los Tsáchilas se identificaron como *Prototheca zopfii* cuando se compararon con secuencias previamente depositadas en el GenBank mediante el algoritmo BLAST (Figura 3), mostrando un porcentaje de identidad entre el 99 y el 100%. Estos resultados coinciden con los descritos por Ely et al. (2023) y Libisch et al. (2022), quienes señalan que *Prototheca zopfii* genotipo 2 es ahora *Prototheca bovis*, basándose en la caracterización del gen *cytb*.

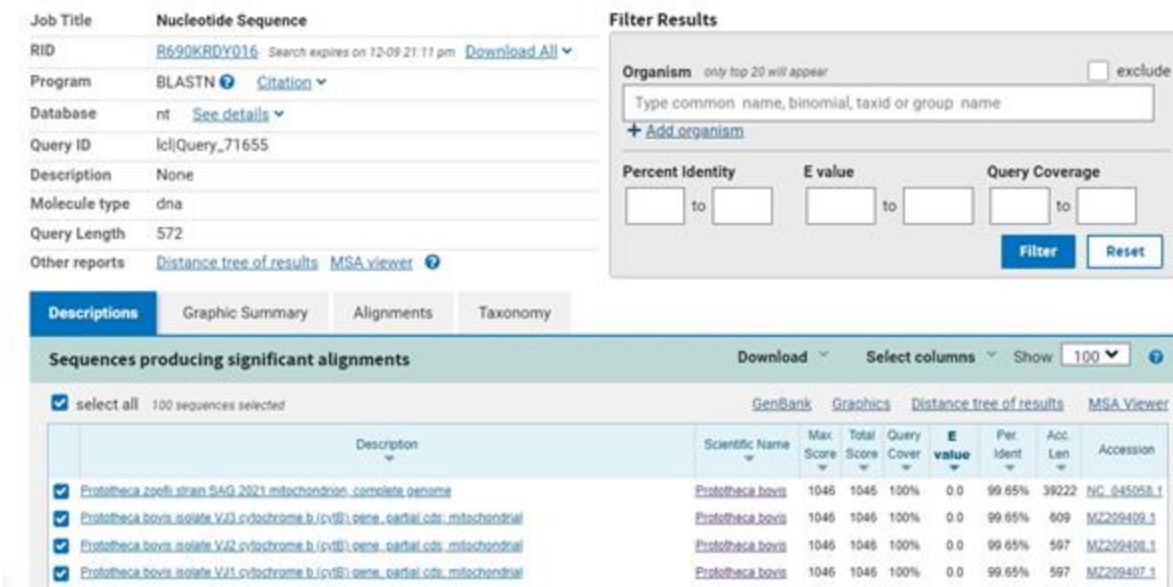


Figura 3. BLAST (porcentaje de identidad de las secuencias en relación al gen *cytb* (650 pb)) de aislados de *Prototheca* cultivados a partir de leche bovina con mastitis de la zona cálida.

De esta manera, se confirmó que las 11 cepas procedentes de Santo Domingo de los Tsáchilas (clima cálido) efectivamente pertenecen a la especie *P. bovis*, aseverándose la infección en el 27,5% de los animales (Tabla 2). De forma complementaria, al cuantificar las muestras de *manera* global (dos sitios evaluados), se obtuvo una tasa de incidencia del 10% correspondiente a *P. bovis*.

Resultado que se corresponde con lo planteado por Huilca et al. (2022), en relación a que en el Ecuador las zonas de clima cálido describen una incidencia alta (15%), en cuanto a la infección de mastitis bovina crónica en donde el agente causal es *Prototheca*, mientras que en el área de los Andes ecuatorianos (clima frío) no se encontraron muestras positivas a dichas algas.

Por los antecedentes mencionados, se afirma que la mastitis ocasionada por esta alga, se está convirtiendo en un problema sanitario y económico emergente (Mikolaj et al., 2021), especialmente en las zonas de clima cálido o tropical, como se ha expuesto en la presente investigación, haciendo notable la susceptibilidad de los animales pertenecientes a dicha zona, pues según Cartwright et al. (2023), el impacto térmico por calor en la salud de la ubre, puede aumentar las tasas de incidencia de mastitis en la

estación cálida, alterando el sistema inmunológico, brindando mayor probabilidad de infecciones intramamarias y afectando de forma directa la calidad de la leche.

En cuanto a la zona de clima frío (Parroquia Machachi), no se aisló la especie en estudio (Figura 4), sin embargo, se identificó otro microorganismo (Tabla 2). Cabe considerar que, en ambientes fríos, las condiciones pueden no ser óptimas para *Prototheca*, ya que las bajas temperaturas pueden ralentizar su metabolismo y limitar su capacidad de reproducción (Jagielski, Krukowski et al., 2019), e incluso puede haber una mayor competencia por los recursos entre diferentes microorganismos (Toyotome & Matsui, 2022).

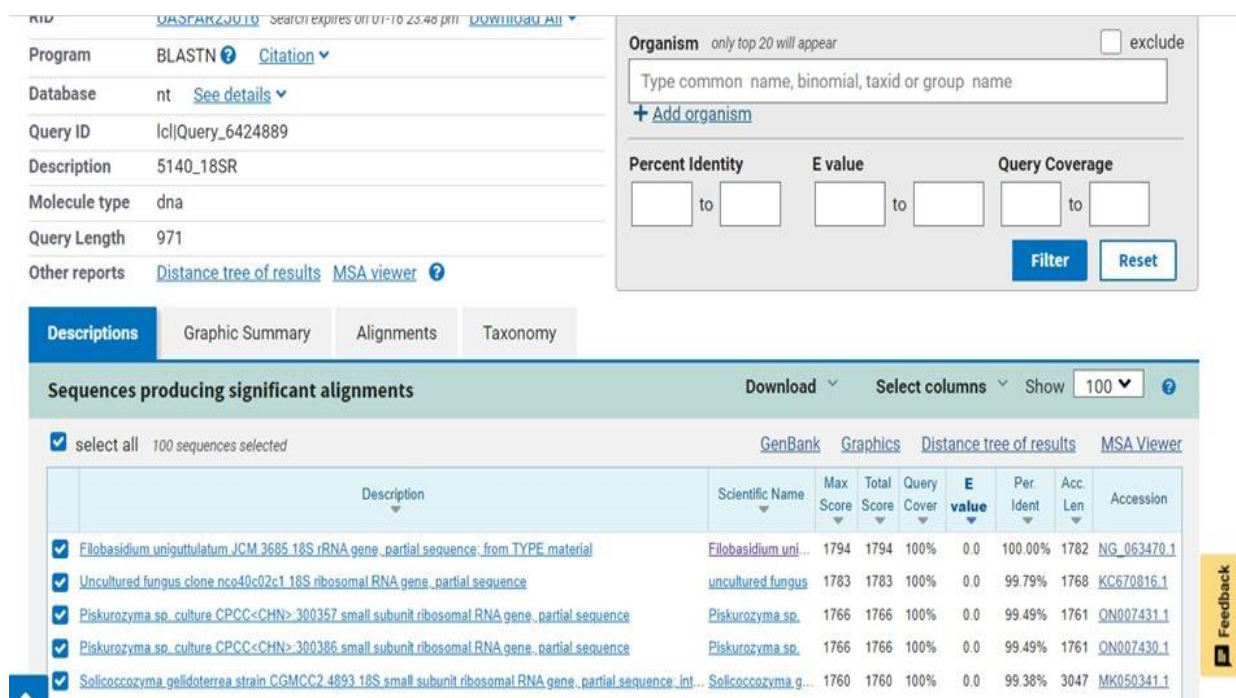


Figura 4. BLAST (porcentaje de identidad de las secuencias en relación al gen 18S (2000 pb)) de aislados de *otro microorganismo* cultivados a partir de leche bovina con mastitis de la zona de clima frío.

El microorganismo aislado es compatible con el orden Filobasidiales, sinónimo heterotípico *Cryptococcus uniguttulatus*, según las descripciones establecidas por Schoch et al. (2020).

Tabla 2. Muestras de leche provenientes de bovinos con mastitis.

ZONAS	MUESTRAS ANALIZADAS	ANIMALES MUESTREADOS	POSITIVAS PARA <i>PROTOTHECA</i>	POSITIVAS PARA OTRO MICROORGANISMO	CULTIVOS REALIZADOS	%
Clima Frío	70	43	0	4	70	0
Clima tropical	40	40	11	0	40	27,5
Total	110	83	11	4	110	10

Por lo que se contempla la posibilidad de que algunos péptidos antimicrobianos, estén presentes como un mecanismo de defensa, sobre las diferentes especies de microalgas y hongos levaduriformes, y pudiendo existir una acción inhibitoria o antagónica de otras microalgas o bacterias sobre el género *Prototheca*. Pues, la actividad *in vitro* de péptidos antimicrobianos (pexiganan, lactoferrin humano, catelicidina-37, cecropin, magainin y fengycin) contra *P. bovis*, han logrado ejercer actividades inhibitoras y alguicidas, por lo que se consideran una opción esperanzadora para contrarrestar a dicho agente causante de mastitis.

CONCLUSIONES

Se logró identificar a la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas como una zona propicia para la propagación de *Prototheca spp.*, debido a su clima cálido y condiciones ambientales favorables para su desarrollo lo cual fue confirmado por la obtención de 11 cultivos con colonias compatibles, a la vez que se identificó la sensibilidad *in vitro* de dicha especie a gentamicina ingrediente activo que inhibió su desarrollo.

Microscópicamente, las muestras positivas a *Prototheca spp.*, presentaron esporangios de forma redonda u oval, y dos cepas resultaron ser negativas a la prueba de glicerol.

La secuenciación del gen *cytb* permitió la identificación de la especie *P. bovis* en todas las cepas analizadas. Este agente etiológico generó una incidencia global de 10%, siendo la zona de Santo Domingo de los Tsáchilas la más susceptible, debido a su clima cálido, mientras que la parroquia Machachi no presentó muestras positivas a *Prototheca spp.*, pero si, se identificó un microorganismo perteneciente al orden Filobasidiales que puede potencialmente producir mastitis bovina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bozzo, G., Dimuccio, M. M., Casalino, G., Ceci, E. & Corrente, M. (2022). New approaches for risk assessment and management of bovine protothecosis. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(8), 103368. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9283663/>
- Caiza de la Cueva, F. y Taipe Taipe, M. (2021). El chagra guardián del páramo. Reseña del paisaje cultural del chagra, Machachi, Ecuador. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 5(2), 1359-1385. <https://core.ac.uk/outputs/480704162>
- Cartwright, L. S., Schmied, J., Karrow, N. & Mallard, A. (2023). Impact of heat stress on dairy cattle and selection strategies for thermotolerance: a review. *Frontiers in Veterinary Science*, 10(2), e1769. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10319441/>
- Crossley, B. M., Bai, J., Glaser, A., Maes, R., Porter, E., Kilian, M. L., Clement, T. & Toohey-Kurth, K. (2020). Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 32(6), 767–775. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7649556/>
- De la Cueva, F., Naranjo, A., Puga Torres, B. H. y Aragón, E. (2021). Presencia de metales pesados en leche cruda bovina de Machachi, Ecuador. *La Granja. Revista de Ciencias de la Vida*, 33(1), 21-30. <https://lagranja.ups.edu.ec/index.php/granja/article/view/33.2021.02>
- Dziurzynski, M., Decewicz, P., Iskra, M. Bakula, Z. & Jagielski, T. (2021). Prototheca-ID: a web-based application for molecular identification of Prototheca species. *Database*, (2), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8607299/>
- Ely, V. L., Cargnelutti, J. F., Ries, A. S., Gressler, L. T., Costa, S., Henrique Braz, P., Pötter, L., Da Costa, M. M., Da Silva Júnior, F. G., Pequeño de Oliveira, H., Sangioni, L. A., Brayer Pereira, D. I. & Ávila Botton, S. de (2023). *Prototheca bovis* in goats: experimental mastitis and treatment with polypyrrole. *Microbial Pathogenesis*, 174(1), e105950. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36528325/>
- Fadda, M., Pisano, M., Scaccabarozzi, L., Mossa, V., Deplano, V., Moroni, P., Liciardi, M. & Cosentino, S. (2013). Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of yeast species isolated from bovine intramammary

- infection. *Journal of Dairy science*, 96(12), 7692–7697.
[https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(13\)00690-5/pdf](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(13)00690-5/pdf)
- Hodac, L., Hallmann, C., Spitzer, K., Elster, J., Fabhauer, F., Brinkmann, N., Lepka, D., Diwan, V. & Friedl, T. (2016). Widespread green algae *Chlorella* and *Stichococcus* exhibit polar-temperate and tropical-temperate biogeography. *FEMS microbiology ecology*, 92(8), 122.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27279416/>
- Huilca Ibarra, M., Vasco-Julio, D., Ledesma, Y., Guerrero-Freire, S., Zurita, J., Castillejo, P., Barceló Blasco, F., Yáñez, L., Changoluisa, D., Echeverría, G., Bastidas-Caldes, C. & Waard, J. H. de (2022). High Prevalence of *Prototheca bovis* Infection in Dairy Cattle with Chronic Mastitis in Ecuador. *Veterinary Sciences*, 9(12), e659. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/36548820/>
- Jagielski, T., Bakula, Z., Gawor, J., Maciszewski, K., Kusber, W. H., Dyląg, M., Nowakowska, J., Gromadka, R. & Karnkowska, A. (2019). The genus *Prototheca* (*Trebouxiophyceae*, *chlorophyta*) revisited: Implications from Molecular Taxonomic studies. *Algal Research*, 43, 101639.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=183676>
- Jagielski, T., Gawor, J., Bakula, Z., Decewicz, P., Maciszewski, K. & Karnkowska. (2018). Cytb as a New Genetic Marker for Differentiation of *Prototheca* Species. *Journal of clinical microbiology*, 56(10), e00584-18.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6156311/>
- Jagielski, T., Krukowski, H., Bochniarz, M., Piech, T., Roeske, K., Bakula, Z., Wlazole, L. & Woch, P. (2019). Prevalence of *Prototheca* spp. on dairy farms in Poland – a cross-country study. *Journal of dairy Science*, 12(3), 556-566.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6465227/>
- Khaw, Y. S., Mun- Hoe Khong, N., Azmi Shaharuddin, N. A. & Md Yusoff, F. (2020). A simple 18S rDNA approach for the identification of cultured eukaryotic microalgae with an emphasis on primers. *Journal Microbiol Methods*, 72(1), e105890.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32179080/>
- Libisch, B., Picot, C., Ceballos-Garzón, A., Moravkova, M., Klimesová, M., Telkes, G., Chuang, S. T. & Le Pape, P. (2022). *Prototheca* Infections and Ecology from a

- One Health Perspective. *Microorganisms*, 10(5), e938. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9144699/>
- Milanov, D., Petrović, T., Polaček, V., Suvajdžić, L. & Bojkovski, J. (2016). Mastitis associated with *Prototheca zopfii* - an emerging health and economic problem on dairy farms. *Journal of Veterinary Research*, 60(4), 373-378. <https://vet-erinar.vet.bg.ac.rs/bitstream/handle/123456789/1414/1413.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Park, H. S., Moon, D Ch., Hyun, B. H. & Lim, S. K. (2019). Short communication: Occurrence and persistence of *Prototheca zopfii* in dairy herds of Korea. *Journal of Dairy Science*, 102(3), 2539-2543. [https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(19\)30005-0/fulltext](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(19)30005-0/fulltext)
- Schoch, L., Ciufo, M., Hotton, C., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, R., Mcveigh, R., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J., Sun, L., Turner, S. & Karsch-Mizrachi, I. (2020). NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database (Oxford)*, (1), baaa062. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7408187/>
- Shahid, M., Cobo, E. R., Chen, L., Cavalcante, P. A., Barkema, H. W., Gao, J., Xu, S., Liu, Y., Knight, C. G., Kastelic, J. P. & Han, B. (2020). *Prototheca zopfii* genotipo II induce apoptosis mitocondrial en modelos de mastitis bovina. *Representante científico*, 10(1), e698. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6971270/>
- Shave, C. D., Millyard, L. & May, R. (2021). Now for something completely different: *Prototheca*, pathogenic algae. *PLoS Pathog*, 17(4), 1-7. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8016101/pdf/ppat.1009362.pdf>
- Spanamberg, A., Wunder Jr, E. A., Brayer Pereira, D. I., Argenta, J., Cavallini Sanches, E. M., Valente, P. y Ferreiro, L. (2008). Diversity of yeasts from bovine mastitis in Southern Brazil. *Revista iberoamericana de micología*, 25(3), 154–156. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18785784/>
- Tamura, K., Stecher, G. & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular biology and evolution*, 38(7), 3022–3027. <https://academic.oup.com/mbe/article/38/7/3022/6248099>

- Toyotome, T. & Matsui, S. (2022). Analysis of Prototheca and yeast species isolated from bulk tank milk collected in Tokachi District, Japan. *Journal of Dairy Science*, 105(10), 8364–8370. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35965121/>
- Zaror, L., Valenzuela, K. & Kruze, J. (2011). Mastitis bovina por *Prototheca zopfii*: primer aislamiento en Chile. *Archivos de medicina veterinaria*, 43(2), 173-176. <https://www.scielo.cl/pdf/amv/v43n2/art10.pdf>

Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Contribución de los autores:

C.X.M.C.: Conceptualización, investigación y visualización, metodología, curación de datos, análisis formal y redacción.

B.M.T.M.: Administración del proyecto; conceptualización, supervisión y validación.

S.M. V.S.: Conceptualización, análisis formal, redacción – revisión y edición.

E.C.M.: Conceptualización, redacción – revisión y edición.

Márgenes publica sus artículos bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivar 4.0 Internacional](#)

