

Prototheca spp. i prototekozy u zwierząt

Henryka Lassa, Edward Malinowski

z Zakładu Fizjopatologii Rozrodu i Gruczołu Mlekowego Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach, Oddział w Bydgoszczy

Prototekozy to choroby ludzi oraz wielu gatunków zwierząt domowych i dzikich, które wywoływane są przez algi z rodzaju *Prototheca*. Algi są prymitywnymi, jednokomórkowymi drobnoustrojami, które w wyniku mutacji utraciły chlorofil i przystosowały się do heterotroficznego sposobu odżywiania. Filogenetycznie związane są z zielonymi glonami z rodzaju *Chlorella*. Drobnoustroje te szeroko rozpowszechniły się w rozmaitych środowiskach o wysokiej wilgotności. Charakteryzują się stosunkowo niską zjadliwością, a do zakażenia dochodzi w przypadku osłabienia mechanizmów obronnych.

Prototheca spp. po raz pierwszy wyhodowane zostały w 1880 r. przez Zopfa i Kühna jako nieznane mikroorganizmy i na podstawie cech morfologicznych zaliczone do drożdżaków. Charakterystykę morfologiczną i fizjologiczną tych drobnoustrojów podał Krüger w 1894 r.

Klasyfikacja i biologia *Prototheca spp.*

Obecna taksonomia zalicza bezchlorofilowe glony do gromady *Trebouxiophyceae*, rzędu *Chlorellales*, rodziny *Chlorellaceae* i rodzaju *Prototheca*. Rodzaj *Prototheca* obejmuje trzy gatunki: *P. wickerhamii*, *P. zopfii* i *P. stagnora*. Z klinicznego punk-

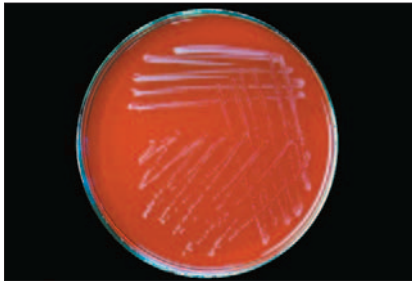
Prototheca spp. and protothecosis in animals

Lassa H., Malinowski E. • Department of Pathophysiology of Reproduction and Mammary Gland, National Veterinary Research Institute, Bydgoszcz.

Protothecosis is an infection caused by achlorophyllous algae of the genus *Prototheca*. These microorganisms have been known as infectious agents in humans and animals. *Prototheca zopfii* may cause infections in animals, particularly in dairy cows, *P. wickerhamii* is isolated from clinical cases in humans. Algae grow rapidly on routine laboratory media without cycloheximide. Their identification is based on morphology, resistance to clotrimazole and carbohydrate assimilation patterns. All cows with protothecosis should be isolated and removed from the herd to prevent possible spread of this disease.

Keywords: *Prototheca spp.*, protothecosis.

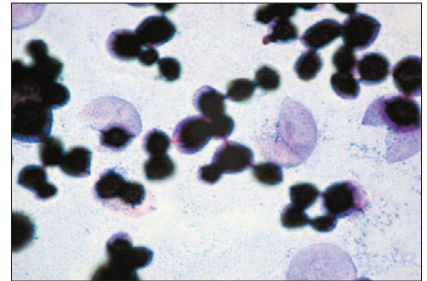
tu widzenia znaczenie mają jedynie *P. zopfii*, wywołująca częściej choroby zwierząt, i *P. wickerhamii* odpowiedzialna za prototekozy u ludzi (1, 2).



Ryc. 1. Hodowla *P. zopfii* na podłożu agarowym z krwią po 48 h inkubacji (fot. ZFRiGM, 2004)



Ryc. 2. Hodowla *P. zopfii* na agarze Sabouraud po 48 h inkubacji (fot. ZFRiGM, 2004)



Ryc. 3. Obraz mikroskopowy – puste sporangia po uwolnieniu endospor (fot. ZFRiGM, 2004)

Tabela 1. Charakterystyczne cechy *P. zopfii* i *P. wickerhamii*

Cecha	<i>P. zopfii</i>	<i>P. wickerhamii</i>
Wygląd kolonii na agarze Sabouraud	kolonie matowe, płaskie, szorstkie z postrzępionym brzegiem	kolonie lekko wypukłe, błyszczące, z równym brzegiem
Wielkość komórek (w μm)	7–30	4–10
Kształt komórek w obrazie mikroskopowym	owalne	okrągłe
Wrażliwość na klotrimazol	–	+
Asymilacja trehalozy	–	+
Asymilacja n-propanolu	+	–

Drobnoustroje *Prototheca spp.* rozwijają się w warunkach tlenowych, na podłożach zawierających glukozę, a składnikiem koniecznym do ich prawidłowego funkcjonowania jest tiamina (witamina B₁). Algi te słabo rosną w temperaturze niższej niż 20° C i wyższej niż 38° C, a dodatek cykloheksamidu hamuje ich wzrost. Optymalny zakres temperatur to 30–32° C (3).

Algi z rodzaju *Prototheca* są komórkami, których kształt i wielkość zależą od gatunku, stadium rozwojowego, a także składu podłoża hodowlanego. Komórki glonów otoczone są ścianą komórkową zbudowaną z dwu warstw – zewnętrznej cieńszej i wewnętrznej grubszej, która oporna jest na działanie enzymów, takich jak: chitynaza, hialuronidaza, glukuronidaza i tripsyna (4). Ściana komórkowa tych drobnoustrojów wykazuje też oporność na wysoką temperaturę oraz wiele środków biobójczych (5). Za taką wysoką oporność na czynniki fizykochemiczne prawdopodobnie odpowiedzialna jest wchodząca w skład ściany sporopollenina – kompleks utlenionych polimerów lub estrów karotenoidowych (4). Ściana komórkowa nie zawiera chityny, glukozaminy, celulozy i kwasu muraminowego. Jądro komórkowe ułożone jest centralnie w zawierającej liczne ziarnistości cytoplazmie. Do tej pory nie stwierdzono płciowego sposobu rozmnażania się *Prototheca*. Proces ten następuje bezpłciowo poprzez podział. Przebiega to w dwojaki sposób. Pierwszy polega na jednorazowym podziale jądra i cytoplazmy, w wyniku czego powstają dwie protospory, dzielące się ponownie. Drugi spo-

sób to następujące po sobie dwa lub więcej podziałów jądra i cytoplazmy, co prowadzi do powstania wewnątrz komórki macierzystej (sporangiospory) licznych komórek potomnych (endospor). W sporangiosporach *P. zopfii* znajduje się od 2 do 16 lub więcej endospor, zaś sporangiospory *P. wickerhamii* mogą zawierać ich aż 50. Endospory o średnicy 4–5 μm uwalniają się po pęknięciu ściany komórkowej i cykl się powtarza. Pewien odsetek sporangiów (1–3%) dzieli się odmiennie, tworząc 2–3 grubościennymi komórkami spoczynkowe – hypnospory (6).

Chorobotwórczość *Prototheca spp.*

Pierwszy przypadek prototekozy u ludzi opisał Davies w 1964 r. (7). Następnie przypadki tej choroby udokumentowano w Europie, Azji (8), Oceanii, Brazylii (9), Kanadzie (10) i w Stanach Zjednoczonych (11). Choroby ludzi wywołane przez algi zdarzają się niezwykle rzadko, niekiedy jednak mogą przebiegać ze szczególnie groźnymi w skutkach objawami. Największe zagrożenie zakażenia algami oraz ciężkiego przebiegu prototekozy dotyczy osób z obniżoną odpornością, jak AIDS, cukrzyca, choroby nowotworowe (12), u których stwierdza się postać uogólnioną z obecnością komórek alg we krwi (algemia). Obserwowane są też lżejsze postaci tej choroby: postać skórna – dotycząca głównie odsłoniętych części ciała (twarz, dłonie, stopy) lub zapalenie kaletki wyrostka łokciowego, które stanowią ok. 25% stwierdzanych przypadków (13, 14). Izolowane od chorych

algi należą głównie do gatunku *Prototheca wickerhamii*.

Najczęstszą prototekozą zwierząt są zapalenia wymienia u krów. Zakażenia przez *Prototheca spp.* obserwuje się także u psów i kotów (15, 16). U psów prototekoza dotyczy może skóry, układu nerwowego, narządu wzroku i przewodu pokarmowego. Zmiany skórne, umiejscowione głównie na kończynach, mają wygląd przewlekłych owrzodzeń, a czynnikiem etiologicznym jest *P. wickerhamii*. Postać jelitową prototekozy u psów objawia się krwawą biegunką wskutek zapalenia jelita grubego. Choroba przebiega z równoczesnym osłabieniem zwierzęcia i spadkiem masy ciała. Prototekoza układu nerwowego manifestuje się objawami ze strony mózgu i narządu wzroku. Objawem zewnętrznym jest bezwład, brak koordynacji ruchów i porażenia. W mózgu występują ogniska martwicze z licznymi komórkami alg. Oczna postać wyraża się obrzękiem gałek ocznych i zaburzeniami w widzeniu. Często stwierdza się jaskrę, obrzęk rogówki, zanik reakcji na światło, zapalenie tęczówki i wylewy krwawe do ciała szklistego, a w końcu ślepotę. Postaci nerwowej niezwykle towarzyszą objawy ze strony przewodu pokarmowego. U kotów opisano prototekozy skóry w postaci łagodnych zmian na kończynach, które rozszerzają się czasem na leżące głębiej tkanki (16).

Prototheca jako czynnik etiologiczny mastitis

Główną postacią prototekozy u bydła jest zapalenie wymienia, najczęściej wywoły-

wane przez *Prototheca zopfii*. Algi izolowano z przypadków *mastitis* w USA (17), Brazylii (18), Wielkiej Brytanii, Niemczech (19, 20), Włoszech (21), Rumunii (22), Belgii, Danii (23), na Węgrzech (24), a także w Kanadzie, Nowej Zelandii, Japonii (25, 26). W Polsce pierwsze przypadki opisane zostały w 2002 r. (27).

Zapalenia wywołane przez algi stanowią niewielki odsetek wszystkich przypadków *mastitis*, jednakże charakteryzują się tendencją wzrastającą. Ponadto skala tego problemu może być większa ze względu na błędy popełniane przy izolacji oraz identyfikacji tych mikroorganizmów. Choroba przynosi poważne straty ekonomiczne w wyniku drastycznego obniżenia produkcji mleka, a także jego jakości oraz z powodu brakowania zakażonych krów. Według Janosiego i wsp. (6, 28) prototekozą gruczolu mlekowego jest chorobą wysokowydajnych krów, dojonych mechanicznie i bytujących w złych warunkach zoohigienicznych. Źródłem drobnoustrojów są chore zwierzęta i środowisko, w którym one przebywają.

Patogeny izolowano z wody pitnej, ścieków, gnojowicy, odchodów zwierząt, zarówno zdrowych, jak i chorych na zapalenie wymienia na tle *Prototheca spp.*, ze ścian i podłóg w oborach, a także ze sprzętu i kubków dojowych (29). Tenhagen i wsp. (30) do czynników sprzyjających *mastitis* na tle *Prototheca spp.* zaliczyli: wiek krowy, liczbę wycieleń, wcześniejsze bakteryjne stany zapalne i sposób antybiotykoterapii. Zdaniem wielu autorów za najbardziej podatne na naturalne zakażenia, których czynnikiem etiologicznym są glony, uznaje się krowy będące w początkowym stadium laktacji (31). Mleko zakażonych krów jest wodniste z licznymi strzępkami i kłaczkami; obserwowano także obrzęki i stwardnienia ćwiartek (29). Często zakażenie dotyczyło więcej niż jednej ćwiartki. Z czynników sprzyjających rozwojowi tego zakażenia należy wymienić złe warunki zoohigieniczne (wysoka wilgotność, duża ilość materii organicznej, złe przewietrzanie) oraz nieodpowiednią higienę doju i niejałowe infuzje leków dowymieniowych. W warunkach klimatycznych Polski najwyższa podatność na zakażenia występuje w okresie letnim przy wysokiej temperaturze i dużej wilgotności. Algi najczęściej izolowane są ze stanów podklinicznych i przewlekłych, a rzadziej z klinicznych ostrych (32, 33). Badania krajowe wykazały przewagę postaci klinicznych (34). Obecność alg stwierdzano także w wydzielinie pobranej z gruczołu zasuszonego (35).

Izolacja i identyfikacja

Drobnoustroje te dobrze rosną na zwykłych podłożach, takich jak agar z krwią

lub podłoże Saboureaud z dekstrozą. Dodatek cykloheksamidu (aktidionu) do podłoża wpływa hamująco na ich wzrost. Do izolacji *Prototheca spp.* z materiału, który może zawierać inne drobnoustroje w dużych ilościach, jak np. woda, ściółka, kał, należy stosować podłoża wybiórcze – *Prototheca Isolation Medium* (PIM) i *Prototheca Enrichment Medium* (PEM). W celu ograniczenia ewentualnego wzrostu bakterii można też zastosować chloramfenikol w stężeniu 100 mg/l. Na agarze z krwią glony wyrastają już po 24-godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C i tworzą drobne, białe lub białoszare kolonie (ryc. 1). Na podłożu Saboureaud po 48 godzinach inkubacji w temperaturze 30°C wyrastają białe, białoszare lub kremowobiałe kolonie, których wielkości i kształt zależy od gatunku. *Prototheca zopfii* tworzy kolonie białoszare, płaskie, szorstkie z postrzępionym brzegiem (ryc. 2). *P. wickerhamii* zaś kolonie białokremowe, lekko wypukłe, gładkie, z równym brzegiem. Drobnoustroje te dobrze barwią się błękitem metylenowym lub metodą Grama. W obrazie mikroskopowym widoczne są duże, owalne lub okrągłe Gram-dodatnie endospory, sporangia zawierające endospory (najczęściej 3), a także puste sporangia pozostałe po uwolnieniu endospor (ryc. 3). Sposobem ułatwiającym odróżnienie *P. zopfii* od *P. wickerhamii* i *P. stagnora* jest zbadanie wrażliwości tych mikroorganizmów na klotrimazol. Szczepy *P. zopfii* wykazują całkowitą oporność na ten antybiotyk (50 µg/krążek), zaś dwa pozostałe gatunki są na niego wrażliwe (36). Cechy pozwalające odróżnić od siebie gatunki przedstawia tabela 1.

Wśród szczepów *Prototheca zopfii* wyizolowanych z mleka lub wydzieliny zapalnej wymienia krów, a także ze środowiska obory i innych pomieszczeń inwentarskich, wyróżniono trzy grupy fenotypowe, które pokrywały się z trzema odrębnymi biotypami (37). Różnice między nimi dotyczyły wielkości komórek, asymilacji glicerolu i galaktozy, tolerancji pH i wrażliwości na ciśnienie osmotyczne, a także ich pochodzenia. Tylko biotyp II był czynnikiem powodującym *mastitis*. Charakteryzuje się wielkością sporangiospor w granicach 5–15 µm, wysoką tolerancją pH (2,1–10,5), dobrym wzrostem w temperaturze 37°C i wykorzystuje glicerol jako źródło węgla i azotu. Izolowano go najczęściej ze środowiska obory i z wody używanej w oborach. Biotyp I, izolowany z otoczenia krów i z chlewni, ma zdolność asymilacji galaktozy i glicerolu, tworzy komórki wielkości 11–30 µm i nie jest czynnikiem wywołującym *mastitis*. Biotyp III, o komórkach wielkości 12–22 µm, izolowany głównie w chlewniach, nie asymiluje glicerolu, asymiluje galaktozę i także nie powoduje zapaleń wymienia.

W rutynowej diagnostyce, ze względu na podobieństwo morfologiczne na podłożu z krwią i agarze Saboureaud, glony często mylnie rozpoznawane są jako grzyby drożdżopodobne. Preparat mikroskopowy pozwala różnicować te dwa mikroorganizmy. Komórki *Prototheca* są większe, z widocznymi fragmentami pękniętych ścian komórkowych i obecnymi wewnątrz endosporami. Blastospory drożdżaków są mniejsze, tworzą strzępki lub pseudostrzępki, z widocznymi postaciami pączkującymi. Przydatny w różnicowaniu jest też test wrażliwości na rybostamycynę (38). W odróżnieniu od opornych na ten czynnik przedstawicieli rodzaju *Candida*, glony wykazują znaczną wrażliwość, która wyraża się strefą zahamowania wzrostu o średnicy 25–28 mm wokół krążka. Podłożem zalecanym przez Casal i wsp. (39) do różnicowania *Candida* i *Prototheca* jest CHROMagar. Na podłożu tym grzyby, w zależności od gatunku, rosną jako zielone, niebieskie, różowe, purpurowe lub szare kolonie, algi natomiast (*P. zopfii*, *P. wickerhamii*, *P. stagnora*) tworzą kolonie kremowe. Przydatne w różnicowaniu grzybów i alg wydaje się także badanie aktywności enzymatycznej tych drobnoustrojów. Z badań własnych wynika, że mikroorganizmy te różnią się liczbą i aktywnością uwalnianych enzymów hydrolitycznych (40).

Wrażliwość na antybiotyki i środki dezynfekcyjne

Stwierdzono bardzo wysoką oporność alg zarówno na antybiotyki i fungistatyki, jak też na środki dezynfekcyjne. Badania McDonalda i wsp. (41), przeprowadzone na 48 szczepach, wykazały ich oporność w stosunku do 21 środków przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych. Niektóre szczepy okazały się wrażliwe tylko na gentamycynę, kanamycynę, amfoterycynę B, miksyne, nystatynę i polimiksyne. Podobne wyniki badań uzyskali inni autorzy (42). Srimuang i wsp. (43) badali wrażliwość *in vitro* 5 szczepów *Prototheca* na amfoterycynę B i połączenia tego fungistatyku z rifampicyną i 5-fluorocytozyną. Stwierdzili, że amfoterycyna B w połączeniu z rifampicyną jest bardziej aktywna niż każdy środek oddzielnie, natomiast połączenie amfoterycyny B z 5-fluorocytozyną nie wykazało działania synergistycznego. Shahan i Pore (44) badali wrażliwość na gentamycynę glonów wyizolowanych z różnych źródeł. Wyniki ich badań dowodzą, że antybiotyk ten daje największą strefę zahamowania wzrostu glonów, ale stosowanie gentamycyny u zwierząt wymaga prowadzenia odpowiednich doświadczeń. Szukając alternatywnych sposobów leczenia prototekozy, niektórzy autorzy badali wrażliwość glonów na takie środki dezyn-

fekcyjne, jak siarczan miedzi, azotan srebra i chlorheksydyna, a następnie wpływ ich stosowania na ultrastrukturę komórek *P. zoppii*. Po ekspozycji na te środki stwierdzono zmiany grubości ściany komórkowej, destrukcję jej wewnętrznej warstwy, a także degradację organelli komórkowych obecnych w cytoplazmie (45).

Leczenie mastitis protothecosa

Zapalenie wymienia wywołane przez algi cechuje się opornością na podejmowaną terapię. Stosowane powszechnie w leczeniu środki przeciwgrzybicze i przeciwbakteryjne są nieskuteczne, nawet wtedy, kiedy *in vitro* wykazano na nie wrażliwość (46). W terapii zapaleń wywołanych przez algi podejmowano próby dowymieniowego wprowadzania wysokich dawek lewamisolu i tetramisolu. Zastosowanie tych preparatów znacznie ograniczyło liczbę alg w mleku krów eksperymentalnie zakażonych tymi drobnoustrojami, ale nie udało się wykazać ich skuteczności klinicznej (47). W związku z przeprowadzonymi do tej pory przez wielu autorów badaniami (32, 40) należy uznać, że w chwili obecnej nie ma skutecznej metody terapii prototekozji wymienia. Krowy z rozpoznaną prototekozją powinny być izolowane i usuwane ze stada, aby zapobiec rozprzestrzenianiu się zakażenia. Duże znaczenie ma także zapewnienie odpowiednich warunków zoohigienicznych w oborach – działania powinny zmierzać w kierunku ograniczenia ilości materii organicznej, likwidacji wody stojącej (kałuż) i skutecznego osuszania miejsc przebywania zwierząt. Ważne jest też zapewnienie im wody i paszy wolnej od spor *Prototheca*. Na podstawie wyników badań własnych przeprowadzonych *in vitro* można stwierdzić, że stosowanie preparatów jodoforowych do dezynfekcji urządzeń dojowych i strzyków powinno zapobiegać zapaleniom powodowanym przez algi (34).

Piśmiennictwo

- Lee W., Lagios M. D., Leonards R.: Wound infections by *Prototheca wickerhamii*, a saprophytic alga pathogen for man. *J. Clin. Microbiol.* 1975, 2, 62–66.
- Chao S.-C., Hsu M. M.-L., Lee J. Y.-Y.: Cutaneous protothecosis: report of five cases. *Br. J. Dermatol.* 2002, 146, 688–693.
- Medical Mycology*. 3rd ed., Lea and Febiger, Philadelphia 1977.
- Chevillat N. F., McDonald J., Richard J.: Ultrastructure of *Prototheca zoppii* in bovine granulomatous mastitis. *Vet. Pathol.* 1984, 21, 341–348.
- Melville P. A., Watanabe E. T., Benites N. R., Ribeiro A. R., Silva J. A. B., Garino F. Jr., Costa E. O.: Evaluation of susceptibility of *Prototheca zoppii* to milk pasteurization. *Mycopathologia* 1999, 146, 79–82.
- Janosi S., Ratz F., Szigeti G., Kulcsar M., Kerenyi J., Lauko T., Katona F., Huszenicza G.: Review of the microbiological, pathological and clinical aspects of bovine mastitis caused by the alga *Prototheca zoppii*. *Vet. Q* 2001, 23, 58–61.
- Davies R., Spencer H., Wakelin P. O.: A case of human protothecosis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1964, 58, 448–451.
- Matsumoto Y., Shibata M., Adachi A., Ohashi M., Kanbe T., Tanaka K.: Two cases of protothecosis in Nagoya, Japan. *Australas. J. Dermatol.* 1996, 37(Suppl.1), 42–43.
- Zaitz C., Godoy A. M., Colucci F. M., de Sousa V. M., Ruiz L. R., Masada A. S., Nobre M. V., Muller H., Muramatu L. H., Arrigada G. L., Heins-Vaccari E. M., Martins J. E.: Cutaneous protothecosis: report of a third Brazilian case. *Int. J. Dermatol.* 2006, 45, 124–126.
- Kapica L.: First case of human protothecosis in Canada: laboratory aspects. *Mycopathologia* 1981, 73, 43–48.
- Kantrow S. M., Boyd A. S.: Protothecosis. *Dermatol. Clin.* 2003, 21, 249–255.
- Torres H. A., Bodey G. P., Tarrand J. J., KontoYiannis D. P.: Protothecosis in patients with cancer: case series and literature review. *Clin. Microbiol.* 2003, 9, 789.
- Huere M., Ravisse P., Solomon H., Ave P., Briquet N., Maurin S., Wuscher N.: Human protothecosis and environment. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 1993, 86, 484–488.
- Pfäller M. A., Diekema D. J.: Unusual fungal and pseudo-fungal infections of humans. *J. Clin. Microbiol.* 2005, 43, 1945–1951.
- Hollingsworth S. R.: Canine protothecosis. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 2000, 30, 1091–1101.
- Dillberger J. E., Homer B., Daubert D., Altman N. H.: Protothecosis in two cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1988, 192, 1557–1559.
- McDonald J. S., Richard J. L., Chevillat N. F.: Natural and experimental bovine intramammary infection with *Prototheca zoppii*. *Am. J. Vet. Res.* 1984, 45, 592–595.
- Costa E. O., Ribeiro A. R., Melville P. A., Prada M. S., Carciofi A. C., Watanabe E. T.: Bovine mastitis due to algae of the genus *Prototheca*. *Mycopathologia* 1996, 133, 85–88.
- Tenhagen B. A., Kalbe P., Klunder G., Baumgartner B., Heuwieser W.: An outbreak of mastitis caused by *Prototheca spp.* on a large confinement dairy. Analysis of cow level risk factors. *Proc. 2nd Internat. Symp. on Mastitis and Milk Quality*
- Roesler U., Hensel A.: Eradication of *Prototheca zoppii* infections in a dairy cattle herd. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 2003, 110, 374–377.
- Buzzini P., Turchetti B., Facelli R., Baudino R., Cavarero F., Mattalia I., Mosso P., Martini A.: First large-scale isolation of *Prototheca zoppii* from milk produced by dairy herds in Italy. *Mycopathologia* 2004, 158, 427–430.
- Ognean L., Pusta D., Oana L.: Signals regarding the isolation of chlorophyll-free algae in the milk of some healthy cows and some with mastitis. *JCEA* 2001, 2, 27–32.
- Jensen H. E., Aalbak B.: Pathogenicity of yeasts and algae isolated from bovine mastitis secretions in a murine model. *Mycoses* 1994, 37, 101–107.
- Janosi S., Ratz F., Lauko T., Szigeti G., Kerenyi J., Tenk M., Katona F., Kulcsar M., Huszenicza G.: *Prototheca zoppii* mastitis in cattle: first diagnosis in Hungary. *Hung. Vet. J.* 2000.
- Dion W. M.: Bovine mastitis due to *Prototheca zoppii*. *Can. Vet. J.* 1979, 20, 221–222.
- Nagahata H., Kawai K., Higuchi H., Miki W., Kayama T.: Widespread of *Prototheca zoppii* – mastitis in Holstein dairy herds and characteristics of insufficient elimination. *XXII World Buiatrics Congress*, Hannover, Germany, 2002.
- Malinowski E., Lassa H., Klossowska A.: Isolation of *Prototheca zoppii* from inflamed secretion of udders. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2002, 46, 289–294.
- Janosi S., Huszenicz G.: Experiences with algal (*Prototheca zoppii*) mastitis in Hungarian large-scale dairy herds. *XXII World Buiatrics Congress*, Hannover, Germany, 2002.
- Jones G. M.: Less recognized sources of mastitis infection. <http://www.vt.edu/jones/UncmMmas.htm>.
- Tenhagen B. A., Kalbe P., Klunder G., Heuwieser W., Baumgartner B.: Individual animal risk factors for *Prototheca mastitis* in cattle. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 1998, 106, 376–380.
- Tenhagen B. A., Kalbe P., Klunder G., Baumgartner B., Heuwieser W.: An outbreak of mastitis caused by *Prototheca spp.* on a large confinement dairy. Analysis of cow level risk factors. *Proc. 2nd Internat. Symp. on Mastitis and Milk Quality*.
- Gonzalez B. N.: *Prototheca*, Yeast and *Bacillus* as a cause of mastitis. Internet <http://www.nmconline.org/articles/prototheca.htm>.
- Kirk J., Mellenberger R.: Mastitis control program for *Prototheca mastitis* in dairy cows. Internet www.vetmed.ucdavis.edu/vetext/NF-DA-p2HTML.
- Lassa H.: *Charakterystyka grzybów drożdżopodobnych i alg z rodzaju Prototheca wyizolowanych z wydzieliny zapalnej gruczołu mlekowego krów*. Praca doktorska. Puławy 2004.
- Tenhagen B. A., Hille A., Schmidt A., Heuwieser W.: Development of cell content and shedding of *Prototheca spp.* in milk from infected upper quarters of cows. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 2005, 112, 44–48.
- Casal M. J., Gutierrez J.: Simple new test for rapid differentiation of *Prototheca stagnora* from *P. wickerhamii* and *P. zoppii*. *Mycopathologia* 1995, 130, 93–94.
- Roesler U., Scholz H., Hensel A.: Emended phenotypic characterization of *Prototheca zoppii*: a proposal for three biotypes, and standards for their identification. <http://dx.doi.org/10.1099/ij.s.0.02556-0>.
- Casal M. J., Gutierrez J.: *In vitro* activity of ribostamycin against *Prototheca sp.* *Mycopathologia* 1983, 83, 21–23.
- Casal M. J., Linares M. J., Solis F., Rodriguez F. C.: Appearance of colonies of *Prototheca* on CHROMagar Candida medium. *Mycopathologia* 1997, 137, 79–82.
- Lassa H., Malinowski E.: Aktywność enzymatyczna drożdżaków i alg wyizolowanych z wydzieliny zapalnej gruczołu mlekowego krów. *Medycyna Wet.* 2005, 61, 673–675.
- McDonald J. S., Richard J. L., Anderson A. J.: Antimicrobial susceptibility of *Prototheca zoppii* isolated from bovine intramammary infections. *Am. J. Vet. Res.* 1984, 45, 1079–1080.
- Bexiga R., Cavaco L., Vilela C. L.: Isolamento de *Prototheca zoppii* a partir de leite bovino. *RPCV* 2003, 98, 33–37.
- Srimuang S., Prariyachattigul C., Chairprasert A., Rungspanurath W., Tanphaichitra D.: Antifungal drug combinations for *Cryptococcus neoformans* and *Prototheca spp.* *J. Med. Assoc. Thai.* 2000, 83, 57–60.
- Shahan T. A., Pore R. S.: *In vitro* susceptibility of *Prototheca spp.* to gentamicin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1991, 35, 2434–2435.
- Melville P. A., Benites N. R., Sinhorini I. L., Costa E. O.: Susceptibility and features of ultrastructure of *Prototheca zoppii* following exposure to copper sulphate, silver nitrate and chlorhexidine. *Mycopathologia* 2002, 156, 1–7.
- Rodriguez E.: *Prototheca* Infections. Harvard Wide Conference.
- Bergmann A.: Udder compatibility of tetramisole and levamisole hydrochloride and suggestion for the prescription of their intramammary use in cattle against *Prototheca zoppii*. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 1993, 106, 253–256.

Dr H. Lassa, Zakład Fizjopatologii Rozrodu i Gruczołu Mlekowego, Państwowy Instytut Weterynaryjny, ul. Powstańców Wlkp. 10, 85-090 Bydgoszcz, e-mail: vetri@logonet.com.pl