

## Yeast like fungi as etiological agents of mastitis in cows

Lassa H., Smulski S., Department of Pathophysiology of Reproduction and Mammary Gland, National Veterinary Research Institute, Pulawy

This paper aims at the presentation of yeast-like fungi in bovine mastitis. Yeasts are unicellular organisms present in the environment surrounding dairy cows and they are also on animal skin and mammary gland. They are opportunistic organisms which may cause infections in animals with decreased immune functions. The incidence of fungal mastitis is usually rare but sometimes it may occur in epizootic proportions. Poor hygiene and improper use of antibiotics result in the increase of the mammary gland infections with yeasts. In Europe bovine *mycotic mastitis* was reported in 1-10% of clinical mastitis cases but in tropical countries their incidence may be higher.

**Keywords:** mastitis, yeast-like fungi, cow.

# Grzyby drożdżopodobne jako czynnik etiologiczny *mastitis* u krów

Henryka Lassa, Sebastian Smulski

z Zakładu Fizjopatologii Rozrodu i Gruczołu Mlekowego Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

## Charakterystyka grzybów drożdżopodobnych

Grzyby drożdżopodobne to typowe, jednokomórkowe, pozbawione chlorofilu organizmy eukariotyczne. Brak chlorofilu sprawia, że nie mają zdolności asymilacji związków organicznych z substancji nieorganicznych. Należą do mikroorganizmów powszechnie występujących w środowisku przebywania krów, a także mogą znajdować się na ich skórze i błonach śluzowych jako mikroflora fizjologiczna. Jednym z częściej kolonizowanych przez nie narządów jest gruczoł mlekowy. Pierwszy przypadek zapalenia

wymienia na tle grzybiczym został opisany przez Fleischera w 1930 r., a w Polsce w 1964 r. przez Wołoszyna i wsp. oraz Senzega i wsp. Grzyby charakteryzują się stosunkowo niską zjadliwością i nie wywołują choroby u krów zdrowych, ze sprawnie działającymi mechanizmami obronnymi. Pierwsza linia obrony (nieswoista), której mechanizmy nie dopuszczają do zakażenia, to usuwanie grzybów poprzez złuszczenie i odnowę nabłonka kanału strzykowego. Gdy to okaże się nieskuteczne, działanie rozpoczynają substancje nieswoiste, takie jak lizozym, laktoferyna i laktoperoksydaza, których poziom znacznie wzrasta podczas

zapalenia wymienia (1, 2, 3, 4). Druga linia obrony (swoista) to odporność komórkowa i humoralna związana z obecnością swoistych przeciwciał skierowanych przeciwko określonym patogenom oraz obecność limfocytów T i B z odpowiednimi receptorami na powierzchni. Do rozwoju zakażenia wymienia dochodzi drogą galaktogenną, gdy do wnętrza wymienia dostanie się i namnoży duża liczba drożdżaków i przełamie wymienione wyżej mechanizmy obronne. Źródłem patogennych grzybów drożdżopodobnych wywołujących *mastitis mycotica* jest środowisko, w którym zwierzęta przebywają.

## Występowanie

Zakażenia wywołane przez grzyby drożdżopodobne zwykle stanowią niewielki odsetek ogółu zakażeń wymienia krów. Drożdżaki izolowano z wydzieliny gruczołu mlekowego krów w większości państw Europy (5, 6, 7), a także w USA, Kanadzie, Brazylii, Japonii (8, 9, 10). Stanowiły przyczynę od 1 do 10%, zapaleń wymienia, a niekiedy, w zależności od kraju, odsetek ten był znacznie wyższy. Według badań własnych w Polsce grzyby stanowiły przyczynę od 0,1 do 2,2% wszystkich przypadków *mastitis* w stadzie (11), przy czym wyższy odsetek odnotowano w stadach mniejszych niż 50 sztuk (12). W innych krajach również stwierdzono obecność tych mikroorganizmów w mleku krów chorych na zapalenie wymienia, np. w Belgii do 6% (5), Słowacji 0,2–6,7% (6), a w Brazylii aż 17,3% (9). W roli czynników etiologicznych *mastitis mycotica* występują głównie drożdżaki należące do rodzajów *Candida*, *Trichosporon*, *Geotrichum*, *Rhodotorula* i *Cryptococcus*, a w krajach o klimacie tropikalnym do wyżej wymienionych dołączają także grzyby pleśniowe z rodzajów *Aspergillus*, *Penicillium*, *Epicoccus*, *Phoma* i *Alternaria* (13). Wśród rodzaju *Candida* najliczniej reprezentowane były w Polsce *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. parapsilosis*, *C. famata* (7, 14, 15), w Turcji *C. krusei*, *C. rugosa*, *C. kefyr* (16), w Japonii *C. tropicalis*, *Pichia kudriavzevii* – teleomorficzne stadium *C. krusei*, *Cluyveromyces marxianus* – teleomorficzne stadium *C. kefyr* (10).

## Patogeneza

Głównym źródłem zakażenia grzybami jest ściółka (zwłaszcza słoma) nieodpowiedniej jakości, w połączeniu z nadmierną wilgotnością otoczenia zwierząt. Grzyby drożdżopodobne izolowano również z innych miejsc: wody przeznaczonej do mycia sprzętu udojowego, wody do odpajania zwierząt, wozów paszowych, kubków do dezynfekcji podojowej, kurzu, słomy, tubostrzykawek dowymieniowych, mleka zbiorczego, skóry strzyków oraz kału (17, 18). Odnotowuje się, że wraz z pogorszeniem warunków

zoohigienicznych środowiska wzrasta odsetek izolowanych paciorkowców kałowych, których ilość jest dodatnio skorelowana z obecnością zakażeń grzybiczych. Do zakażenia dochodzi również, gdy krowy kładą się w miejscach do tego nieprzeznaczonych. Na pojawianie się zakażeń grzybiczych ma wpływ także brak osuszania wymion po obfitym myciu wodą (19). Postępujący wzrost odsetka zapaleń wymienia, a także narastająca trudność w efektywnym leczeniu *mastitis* skutkuje wprowadzaniem coraz bardziej radykalnych sposobów postępowania terapeutycznego, przy użyciu antybiotyków. Przyczynia się to z kolei do powstawania grzybiczych zapaleń wymienia. Dane opublikowane w 1934 r., kiedy wyizolowano pierwsze przypadki *mastitis mycotica* dowodzą, że nadmierne stosowanie antybiotyków nie jest główną przyczyną zakażeń grzybiczych, gdyż w wymienionym czasie antybiotyki dowymieniowe nie były stosowane (20). Zakażenia związane są również z nieprzebraniem zasad aseptyki podczas przygotowywania i dowymieniowego podawania leków (21). Sytuację pogarsza unikanie badań bakteriologicznych oraz stosowanie niektórych hormonów działających immunosupresyjnie.

Do najważniejszych czynników determinujących chorobotwórczość drożdżaków należą aderenza, zdolność drobnoustroju do przetrwania w nowym środowisku oraz wydzielanie enzymów przez patogenny organizm. Adherencja to przyleganie grzyba do komórek gospodarza i substancji białkowych w przestrzeni międzykomórkowej. Szczepy o większej zdolności przylegania są bardziej patogenne. Grzyby chorobotwórcze w ramach przystosowania do przetrwania w gruczole mlekowym rozwinęły zdolność do wzrostu i rozwoju w temperaturze ciała makroorganizmu oraz pogrubienie ściany komórkowej i wytwarzanie substancji modyfikujących czynności układu immunologicznego gospodarza. Innym czynnikiem wpływającym na wirulencję grzybów jest zdolność wytwarzania enzymów. Wydzielają do środowiska enzymy hemolityczne (22) i hydrolityczne (23, 24, 25), które ułatwiają im inwazję do tkanek, pozwalają przetrwać w tkankach gospodarza, unikając jego mechanizmów obronnych i biorą udział w trawieniu oraz niszczeniu jego błon komórkowych (25, 26). Istnieją również dowody, że enzymy hydrolityczne atakują komórki układu odpornościowego gospodarza, aby oprzeć się jego przeciwbakteryjnemu działaniu (27).

## Przebieg kliniczny *mastitis mycotica*

Zapalenie wymienia wywołane przez grzyby drożdżopodobne może wystąpić w formach podklinicznej, przewlekłej, ostrej lub nawet nadostrej wraz z zejściem

śmiertelnym (28). Postać podkliniczna charakteryzuje się lekko podwyższoną liczbą komórek somatycznych oraz obecnością drobnoustrojów w mleku. Zapalenie zazwyczaj dotyczy tylko jednej ćwiartki. Zapalenie w postaci ostrej przebiega z gwałtownym wzrostem temperatury ciała, nawet do 42°C, oraz silnie wyrażonymi objawami klinicznymi i brakiem apetytu. Za objaw charakterystyczny można uznać stosunkowo małą bolesność, przy wyraźnie zaznaczonych pozostałych objawach klinicznych. Wydzielina wykazuje zmiany różnego stopnia, z typowym dla grzybicy szarobiałym, niekiedy żółtawym lub brązowym odcieniem. Zapalenia przewlekłe mogą przebiegać bez objawów ogólnych i z niewielkim natężeniem zmian miejscowych. Mogą być także następstwem procesu ostrego. U chorych krów wydajność i jakość mleka ulegają znacznemu obniżeniu. Nie obserwuje się przy tym wyraźnego pogłębienia zmian w tkance gruczołu mlekowego. Podstawą prawidłowego rozpoznania grzybiczego zapalenia wymienia jest badanie mikologiczne.

## Wrażliwość grzybów na leki przeciwgrzybicze

Na początku XX wieku, gdy nie istniały jeszcze specyficzne leki przeciwgrzybicze, w medycynie, jak i w weterynarii do walki z drożdżakami używano takich środków, jak: jod, jodek potasu, kwas undecylenowy lub preparaty rtęci (29). Obecnie stosowane środki przeciwgrzybicze to środki dezynfekcyjne wykazujące właściwości wspomagające zwalczanie zakażeń grzybiczych (związki jodu, pochodne fenolu, siarka i jej pochodne, kwasy organiczne i nieorganiczne, barwniki anilinowe, związki metali ciężkich i czwartorzędowe zasady amoniowe), antybiotyki polienowe (nystatyna, natamycyna, amfoterycyna B) i niepolienowe (gryzeofulwina) oraz pochodne azolowe – imidazole (klotrimazol, mikonazol, ketokonazol) lub triazole (flukonazol, terokonazol), a także pochodne allyloaminowe (terbinafin), morfoliny (amorolfina), pirydynonu (cyklopiroks) oraz fluoropirimidyny (flucytosyna). Do największych wad tych leków należą: duża toksyczność, wąskie spektrum aktywności, mała aktywność, często działanie jedynie fungistatyczne, słaba rozpuszczalność. Wrażliwość drożdżaków jest różnicowana i zależna od gatunku. Badania własne wykazały różną wrażliwość grzybów drożdżopodobnych na wybrane leki przeciwgrzybicze (7). Badane szczepy okazały się wrażliwe *in vitro* na tiokonazol (91,2%), klotrimazol (84,0%) i 5-fluorocytosynę (82,1%), odporne zaś na amfoterycynę B (75,2%) i flukonazol (66,8%). Wawron i wsp. (30) wykazali wysoką wrażliwość na tiokonazol (76,7%), nystatynę (95,4%)

i amfoterycynę B (94%) oraz znaczną oporność na flukonazol (39,3% szczepów wrażliwych). Badania Staroniewicza i wsp. (15) potwierdzają wysoką wrażliwość szczepów drożdżaków izolowanych z wymienia na tiokonazol i klotrimazol oraz ich oporność na flukonazol i amfoterycynę. Mimo istnienia skutecznych leków przeciwgrzybiczych, wielu autorów podkreśla istnienie słabej korelacji między wynikami oceny wrażliwości *in vitro* a skutecznością *in vivo* wybranych leków (31).

## Leczenie

Leczenie zapaleń wymienia powodowanych przez grzyby drożdżopodobne jest trudne i często nieskuteczne, mimo istnienia licznych środków przeciwgrzybiczych. Dostępne leki przeciwgrzybicze nie są przystosowane do podawania dowymieniowego. Terapeutyczne stężenia substancji przeciwgrzybiczych wykazują właściwości silnie drażniące delikatną tkankę gruczołową tego narządu, co uniemożliwia uzyskanie zadowalających efektów leczenia (30). Jedną z przyczyn utrudniających uzyskanie dobrego, przeciwgrzybiczego leku dowymieniowego jest budowa i skład ściany komórkowej grzybów, której składnikiem jest chityna, utrudniająca przedostanie się leków do wnętrza komórki. Do tej pory nie został opracowany schemat skutecznego leczenia, choć opisywano przypadki wyleczeń *mastitis mycotica*. Opisywane metody terapii dotyczyły głównie nystatyny i klotrimazolu (32). Uzyskane efekty leczenia były bardzo zróżnicowane (19, 33, 34), przy czym okres do całkowitego wyleczenia trwał nawet sześć tygodni (28). W zapaleniach grzybiczych obserwowano samowyleczenia z całkowitym ustąpieniem objawów klinicznych bądź z przejściem w postać przewlekłą, która trwała nawet do pięciu miesięcy.

Współczesna literatura nie podaje żadnych skutecznych metod zwalczania *mastitis mycotica*. Wcześniej opisywano szereg metod usprawniających leczenie wymienionych zapaleń. Galli i wsp. (35) w dziewięciu przypadkach z udziałem *Candida pelliculosa* stosowali 3–4-krotne zdajanie chorych ćwiartek wraz z intensywnym masażem wymienia. Blowey i wsp. (19) zaleca użycie 60–100 ml roztworu przygotowanego z 1,8 g jodu krystalicznego połączonego z dwoma litrami parafiny oraz 23 ml eteru, a po 6–8 godzinach rekomenduje zdojenie ćwiartki. Proponowana długość terapii to 2–3 dni. Zadowalające efekty terapeutyczne zdaniem tego autora może dać także dożylne lub doustne podanie jodku potasu. Zapalenie wymienia wywołane przez grzyby z rodzaju *Cryptococcus* stanowią znacznie poważniejszy problem. Powodują one rozwój silnie wyrażonych objawów klinicznych

oraz stanowią zagrożenie dla zdrowia człowieka. Pouden i wsp. (36) testowali 23 różne związki przeciwgrzybicze w leczeniu zakażeń wywołanych przez *Cryptococcus* spp. Wszystkie badane preparaty okazały się nieskuteczne w terapii, pomimo uzyskania wrażliwości *in vitro*. Segretain i wsp. (37) oceniali skuteczność cykloheksymidu w dziennej dawce 24 mg na ćwiartkę z zadowalającym efektem. Jedną z najważniejszych czynności w profilaktyce *mastitis* jest dezynfekcja strzyków. Według Lisowskiego i wsp. (38) najlepszymi właściwościami przeciwgrzybiczymi charakteryzowały się takie preparaty, jak: Virkon, Dezynfektant, Alkalit, chlorheksydyna i Pollena Jod-K.

Mimo różnych doniesień na temat zwalczania *mastitis mycotica*, nadal najskuteczniejszą metodą przeciwdziałania zapaleniom grzybiczym jest zapobieganie rozprzestrzenianiu się drobnoustrojów. Uzyskuje się to poprzez unikanie niehigienicznego wprowadzania leków dowymieniowych przygotowanych *ex tempore*, eliminowanie zakażonego sprzętu, zagrzebienie słomy i paszy oraz unikanie długotrwałych antybiotykoterapii. Ograniczenie transmisji wymienionych drobnoustrojów osiąga się również poprzez odpowiednią jakość higieniczną dezynfekcji przed- i poddójowej, stosowanie karotenów, witaminy A, witaminy E oraz brakowanie krów z uszkodzonymi kanałami strzykowymi.

## Piśmiennictwo

1. Gaunt S.N., Raffio N., Kingsbury E.T., Damon R.A., Johnson W.H., Mitchell B.A.: Variation of lactoferrin and mastitis and their heritabilities. *J. Dairy Sci.* 1980, **63**, 1874–1880.
2. Harmon R.J., Schanbacher F.L., Ferguson L.C., Smith K.L.: Concentration of lactoferrin in milk of normal lactating cows and changes occurring during mastitis. *Am. J. Vet. Res.* 1975, **16**, 1001–1007.
3. Persson K., Carlsson A., Hambleton C., Guidry A.J.: Immunoglobulins, lizozymy i lactoferrin w mleku i w mleku cielicy w czasie zapalenia sutka indukowanego endotoksynami. *Zentralbl. Veterinarmed. (B)* 1992, **39**, 165–174.
4. Reinard P., Poutrel B., Caffin J.P.: Lactoferrin and transferrin in bovine milk in relation to certain physiological and pathological factors. *Ann. Rech. Vet.* 1982, **13**, 220–223.
5. Lagneau P.E., Lebtahi K., Swinne D.: Isolation of yeasts from bovine milk in Belgium. *Mycopathologia* 1996, **135**, 99–102.
6. Pengov A.: Significance of bovine mycotic mastitis. *Reports of the III Middle-European Congress for Buiatrics, Health problems in ruminants Czech Republic*, 2001, 105–107.
7. Lassa H., Malinowski E.: Resistance of yeast and algae isolated from cow mastitic milk to antimicrobial agents. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2007, **51**, 575–578.
8. Costa E.O., Gandra C.R., Pires M.F., Coutinho S.D., Castilho W., Teixeira C.M.: Survey of bovine mycotic mastitis in dairy herds in the State of Sao Paulo, Brazil. *Mycopathologia* 1993, **124**, 13–17.
9. Santos R.C., Marin J.M.: Isolation of *Candida* spp. from mastitic bovine milk in Brazil. *Mycopathologia* 2005, **159**, 251–253.
10. Hayashi T., Sugita T., Hata E., Katsuda K., Zhang E., Kiku Y., Sugawara K., Ozawa T., Matsubara T., Ando T., Obayashi T., Ito T., Yabusaki T., Kudo K., Yamamoto H., Koiwa M., Oshida T., Tagawa Y., Kawai K.: Molecular-based identification of yeasts isolated from bovine clinical mastitis in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 2013, **75**, 387–390.
11. Malinowski E., Klossowska A., Kaczmarowski M., Kotowski K., Nadolny M., Kuźma K.: Stan zdrowotny gruczołu mlekowego krów i czynniki etiologiczne mastitis w przypadkach wysokiej liczby komórek somatycznych w mleku zbiorczym. *Med. Weter.* 2003, **59**, 128–132.

12. Smulski S., Malinowski E.: Występowanie, postacie i czynniki etiologiczne zapaleń wymienia w Polsce w zależności od wielkości gospodarstwa. *Med. Weter.* 2011, **67**, 190–193.
13. Costa E.O., Ribeiro A.R., Watanabe E.T., Melville P.A.: Infectious bovine mastitis caused by environmental organisms. *Zentralbl. Veterinarmed. B.* 1998, **45**, 65–71.
14. Krukowski H., Lisowski A., Różański P., Skórka A.: Yeasts and algae isolated from cows with mastitis in south-eastern part of Poland. *Pol. J. Vet. Sci.* 2006, **9**, 181–184.
15. Staroniewicz Z., Włodarczyk A., Florek M., Król J.: Flora grzybicza w mastitis u krów i jej wrażliwość na antybiotyki. *Mikol. Lek.* 2007, **14**, 257–259.
16. Seker E.: Identification of *Candida* species isolated from bovine mastitic milk and their *in vitro* hemolytic activity in Western Turkey. *Mycopathologia*. 2010, **169**, 303–308.
17. Williamson J.H., di Menna M.E.: Fungi isolated from bovine udders, and their possible sources. *N. Z. Vet. J.* 2007, **55**, 188–190.
18. Scaccabarozzi L., Locatelli C., Pisoni G., Manarolla G., Casula A., Bronzo V., Moroni P.: Short communication: Epidemiology and genotyping of *Candida rugosa* strains responsible for persistent intramammary infections in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 2011, **94**, 4574–4577.
19. Blowey R., Edmondson P. (ed.): *Mastitis Control in Dairy Herds*, CABI, 2010.
20. Rolle M.: Heftige Ursachen für Euterentzündungen bei Kühen. *Dtsch. tierärztl. Wschr.* 1934, **42**, 385–386.
21. Crawshaw W.M., MacDonald N.R., Duncan G.: Outbreak of *Candida rugosa* mastitis in dairy herd after intramammary antibiotic treatment. *Vet. Rec.* 2005, **156**, 812–813.
22. Luo G., Samaranyake L.P., Yau J.Y.: *Candida* species exhibit differential *in vitro* hemolytic activities. *J. Clin. Microbiol.* 2001, **39**, 2971–2975.
23. Wawron W., Bochniarz M., Szczubiał M.: Enzymatic activity of yeasts isolated from the inflamed mammary secretion in dairy cows. *Pol. J. Vet. Sci.* 2011, **14**, 65–68.
24. Lassa H., Malinowski E.: Aktywność enzymatyczna drożdżaków i alg wyizolowanych z wydzieliny zapalnej gruczołu mlekowego krów. *Med. Weter.* 2005, **61**, 673–675.
25. Krajewska-Kulak E., Łukaszuk C., Niczyporuk W., Trybula J.: Ocena aktywności wybranych enzymów hydrolytycznych grzybów drożdżopodobnych z gatunku *Candida* izolowanych z ontocenozy cewki moczowej. *Mikol. Lek.* 1998, **5**, 165–170.
26. Krajewska-Kulak E., Łukaszuk C., Niczyporuk W., Trybula J., Szczurzewski M.: Enzymatic biotypes of yeast-like fungi strains and their susceptibilities to antimicrobials isolated from ontococcosis of the urogenital system. *Mikol. Lek.* 2002, **9**, 67–74.
27. Schaller M., Borelli C., Kortling HC., Hube B.: Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*. 2005, **48**, 365–77.
28. Stanojević S., Krnjajić D.: *Internet Journal of Food Safety* V.1. 8–10.
29. Wawron W.: Grzybicze zapalenia wymienia u krów – problem terapii wciąż aktualny. W: *Zaburzenia w rozrodzie zwierząt wysokoprodukcyjnych*, 2003.
30. Wawron W., Bochniarz M., Dąbrowski R.: Antifungal susceptibility of yeasts isolated from secretion of inflamed mammary glands in cows. *Pol. J. Vet. Sci.* 2010, **13**, 487–490.
31. Ghannoum M.A., Rex J.H., Galgiani J.N.: Susceptibility testing of fungi: current status of correlation of *in vitro* data with clinical outcome. *J. Clin. Microbiol.* 1996, **34**, 489–495.
32. Wawron W., Krzyżanowski J.: Use of clotrimazole and nystatin in the treatment of mycotic mastitis in cows. *Med. Weter.* 2002, **58**, 774–776.
33. Fleichmann M.: *Antimicrobial agent tioconazole – determination of udder tolerance, minimal inhibitory concentration (MIC) and level in bovine milk*. Doctoral thesis, University of Munich, 1995.
34. Krzyżanowski J.: The efficacy of polyfungine derivatives in the treatment of yeast mastitis in cows. *Annales LIMCS Sec DD*, 1996, **51**, 117–125.
35. Galli G.: Osservazione e studi su casi di mastite micotica bovina. *Vet. Ital.* 1954, **5**, 587–604.
36. Pouden WD., Amberson J.M., Jaeger R.F.: A severe mastitis problem associated with *Cryptococcus neoformans* in a large dairy herd. *Am. J. Vet. Res.* 1952, **13**, 121–128.
37. Segretain G., Verge J., Drieux H., Mariat F., Paraf A., Labie C., Théron B.: Mammite à *Cryptococcus neoformans*. *Bull Acad vét Fr.* 1956, **29**, 33–41.
38. Lisowski A., Krukowski H.: Podatność grzybów z rodzaju *Candida* wyizolowanych z *mastitis* u krów na działanie środków dezynfekcyjnych oznaczona metodą rozcieńzeniową płytkową. *Mikol. Lek.* 2009, **16**, 228–230.

Dr Henryka Lassa, e-mail: henryka.lassa@onet.eu