

Izolacija i identifikacija kvasaca iz uzoraka sekreta mliječne žlijezde krava

Vesna Jaki, Darko Majnarić, Jadranka Jurmanović, Željka Bažulić

Znanstvena bilješka – Scientific note

UDK: 637.1/579.8

Sažetak

Svrha rada bila je izolirati i identificirati kvasce iz uzoraka sekreta mliječne žlijezde krava s kliničkim mastitisom. Tijekom rutinske dijagnostike mastitisa, veterinari su na terenu prikupljali uzorke i dostavljali ih laboratoriju veterinarskog zavoda u Križevcima. Uzorci su naciepljivani na Columbia agar (Merck, KgaA, Darmstadt, Njemačka) s 5 % ovčje krvi, a porasle kolonije kvasaca precijepljene su na Sabouraud 4 % maltose agar (Merck, KgaA, Darmstadt, Njemačka) i Rice extract agar (Merck, KgaA, Darmstadt, Njemačka). Završna identifikacija kvasaca rađena je API 20 C AUX sistemom (bioMerieux, Lyon, Francuska). Iz mlijeka krava oboljelih od mastitisa, u podneblju umjereno kontinentalne klime, ovim su istraživanjem najčešće izdvojeni kvasci: *Candida* spp. (76,2 %) i *Trichosporon* spp. (23,8 %). Najučestalije su vrste: *C. quilliermondi* (21,4 %), *C. krusei/inconspicua* (11,9 %) i *Trichosporon mucoides* (14,3 %).

Ključne riječi: kvasci, kravlje mlijeko, mastitis

Uvod

U uzgoju mliječnih goveda zdravstveni problem je upala mliječne žlijezde - mastitis koju uzrokuju bakterije. Na oštećeni parenhim vimena nasele se zatim i razmnože kvasci, što je vrlo česta pojava nakon nepravilne i dugotrajne antibiotske terapije. Kod kliničkog mastitisa nema patognomoničkih simptoma koji bi omogućili razlikovanje bakterijskog od gljivičnog mastitisa. Gljivice koje uzrokuju mastitis najčešće su iz skupine kvasaca i javljaju se u 2 do 13 % u etiologiji govedeg mastitisa (Krukowski i sur., 2000.; Moretti i sur., 1998.; Wawron i Szczubial, 2001.). Kvasci su jednostanične mikroskopske gljivice. Stanice kvasaca su kuglaste ili izdužene i mogu se razmnožavati spolnim i nespolnim načinom. Najčešći tip stanice je blastospora. Nespolnim načinom razmnožavanja na njoj izrasta pup koji se otkida nakon što dosegne veličinu osnovne stanice.

Spolne spore većine kvasaca su askospore. Tijekom spolnog razmnožavanja kvasaca unutar stanice stvaraju se spore s debelim staničnim stijenkama. Stanična stijenka roditeljske stanice funkcionira kao askus koji sadržava spore. Svi pripadnici kvasaca ne tvore nespodne askospore. Tako neke vrste iz roda *Trichosporon* tvore artrospore, a klamidiospore tvore *Candida albicans*, *Candida tropicalis* te neki drugi kvasci. Rod *Candida* i *Trichosporon* spadaju u kvasce iz obitelji *Cryptococcaceae* (Duraković, S. i Duraković, L., 2003.).

Mastitis se može očitovati kao klinički ili subklinički. *Trichosporon spp.* uzrokuje mastitis krava koji se klinički manifestira povećanjem i otvrdnućem mliječne žlijezde (koja nije jako bolna), povišenjem tjelesne temperature oko 41° C, povišenim bilom, povećanim supramamarnim limfnim čvorovima uz izrazit pad sekrecije mlijeka; sekret je rijedak i žućkast s krpicama fibrina (Krukowski i sur., 2000.; Topolko, 1964.). Subklinički mastitis ne manifestira se vidljivim znakovima bolesti, osim povećanjem broja somatskih stanica u mlijeku (Moretti i sur., 1998.).

Kvasci se mogu dulje vrijeme zadržati u vimenu i izlučivati, što je stalni izvor infekcije ostalih životinja u stadu (Topolko, 1964.). Osim toga, kvasci su ubikvitarni mikroorganizmi i stalno prisutni u okolišu i probavnom traktu životinja. Silaža također može biti izvor kvasaca s obzirom da neke vrste mogu asimilirati i fermentirati laktozu (Elad i sur., 1995.).

Kvasci se najčešće unose u vime krave prilikom terapije antibiotskim preparatima pri nepravilnoj dezinfekciji otvora sise, kada se prilikom uvlačenja vrška brizgalice infekcijski unos u sisni kanal (Krukowski i sur., 2000.). Visoke doze antibiotika omogućuju porast kvasaca posebno vrste *Candida spp.* jer se kao izvor nitrata mogu koristiti penicilin i tetraciklin (Radostits i sur., 2000.). Za patogeno djelovanje kvasaca pogoduje smanjena otpornost organizma ili organa, prethodne promjene uzrokovane bakterijama (oštećenje parenhima vimena), hipo i avitaminoze (osobito vitamina A) te iritacija sisa zbog nepravilne mužnje (Wawron i sur., 2001.; Richard i sur., 1980.; Naglič i sur., 2005.).

Materijal i metode rada

Pretražena su ukupno 42 uzoraka sekreta vimena krava s kliničkom slikom mastitisa.

Uzorci sekreta vimena dostavljani u laboratorij Veterinarskog zavoda Križevci, testirani su «Zagrebačkim mastitis reagensom», mikroskopski

pretraženi, naciepljivani na Columbia agar (Merck, KgaA, Darmstadt, Njemačka) s 5 % ovčje krvi, te inkubirani 24 h na 37 °C. Porasle kolonije kvasaca precijepljene su na Sabouraud 4 % maltose agar (Merck, KgaA, Darmstadt, Njemačka) i inkubirane 48 h na 37 °C. Kvasci su identificirani API 20 C AUX sistemom (bioMerieux, Lyon, Francuska) koji sadrži 19 biokemijskih testova. Testovi se baziraju na sposobnosti asimilacije ugljikohidrata u prisustvu kisika (tablica 1).

Svi kvasci su naciepljivani aerobno na Rice extract agar (Merck, KgaA, Darmstadt, Njemačka) da bi se utvrdilo postojanje hifa ili pseudohifa. Ploče su inkubirane aerobno na 28 °C kroz 4 dana.

Izolati roda *Candida spp.* inkubirani su u konjskom serumu 3 sata na 37 °C i mikroskopski pregledani na postojanje germinativnih tuba.

Tablica 1: Popis biokemijskih testova korištenih u pretrazi

Table 1: Biochemical tests used in research

Testovi Tests	Aktivni sastojci Active compounds
GLU	D-Glucose
GLY	Glycerol
2KG	Calcium 2-Keto-Gluconate
ARA	L-Arabinose
XYL	D-Xylose
ADO	Adonitol
XLT	Xylitol
GAL	D-Galactose
INO	Inositol
SOR	D-Sorbitol
MDG	Methyl- α D-Glucopyranoside
NAG	N-Acetyl-Glucosamine
CEL	D-Cellobiose
LAC	D-Lactose
MAL	D-Maltose
SAC	D-Saccharose (sucrose)
TRE	D-Trehalose
MLZ	D-Melezitose
RAF	D-Raffinose

Rezultati

Kvasci izdvojeni iz uzoraka sekreta vimena krava s kliničkim mastitisom prikazani su u tablici 2. Gljivice koje uzrokuju mastitis najčešće su iz roda kvasaca. U našem podneblju to su kvasci iz roda *Candida spp.* i *Trichosporon spp.*

Vrste roda *Candida spp.* dominiraju u 32 (76,2 %) uzorka od ukupno 42 pretražena, a *Trichosporon spp.* smo našli u 10 (23,8 %) uzoraka. Najčešće su *C. quilliermondi* (21,4 %) i *C. krusei/inconspicua* (11,9 %). Takav nalaz podudara se s nalazom nekih autora (Pengov, 2002.; Kadić, 1978.; Richard i sur., 1980.), dok je *C. kefyr* najčešća u Poljskoj (Krukowski i sur., 2000.), a kod nas je izdvojena u 3 (7,1 %) uzorka kao i *C. albicans* (7,1 %) i *C. ciferrii* (7,1 %). *Candida spp.* raste na Sabouraud 4 % maltose agaru (Merck) na 37 °C kao bjelkasta do žućkasto-bijela vlažna i mutna kolonija. Sve vrste asimiliraju glukozu. *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. famata*, *C. ciferrii*, *C. parapsilosis* i *C. guilliermondi* asimiliraju maltozu. Ne asimiliraju laktozu, osim *C. famata* i *C. kefyr*. Saharozu asimiliraju *C. albicans*, *C. guilliermondi*, *C. kefyr*, *C. ciferrii*, *C. tropicalis*, *C. colliculosa*, *C. parapsilosis* i *C. famata*. Pseudohife na rižinom agaru tvore: *C. albicans*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. ciferrii*, *C. tropicalis*, *C. rugosa* i *C. parapsilosis*, nešto slabije *C. quilliermondi* i *C. Colliculosa*, dok *C. glabrata* i *C. famata* ne produciraju (API 20 C, bioMerieux, Lyon, Francuska). Germinativne tube tvori *C. albicans* u konjskom serumu nakon 2 sata inkubacije na 37 °C, dok *C. tropicalis* tvori pseudogerminativne tube nakon više sati inkubacije (Quinn i sur., 1994.).

Asporogene kvasce iz roda *Trichosporon* izdvojili smo u 10 (23,8 %) uzoraka. Slične rezultate navode Krukowski i sur. u Poljskoj (2000.) i Topolko (1964.). *Trichosporon* su oksidativni kvasci koji ne tvore askospore, razmnožavaju se pupanjem i tvorbom artrokonidija. Na rižinom agaru oni proizvode pravi micelij.

Kvasce smo u najvećem broju slučajeva izolirali u čistoj kulturi, dok smo u 9 (21,5 %) uzoraka sekreta izdvojili i bakterijske uzročnike upale vimena. *Streptococcus agalactiae* izoliran je u tri uzorka, *Streptococcus dysgalactiae* u tri uzorka, *Staphylococcus aureus* u dva uzorka i *Escherichia coli* u jednom uzorku. Miješanu infekciju s kvascima i bakterijama opisuju i drugi autori (Topolko, 1964.; Elad i sur., 1995.; Kadić i sur., 1983.). Da bi utvrdili gljivični mastitis svakako je potrebno, uz bakteriološku, napraviti mikroskopsku i mikološku pretragu sekreta. Za laboratorijsku pretragu važni su detaljni podatci o stanju u staji i poduzetim radnjama prije uzimanja uzoraka.

Tablica 2: Kvasci izdvojeni iz uzoraka sekreta vimena krava s kliničkom slikom mastitisa

Table 2: Yeasts isolated from the milk samples of cow udder quarters with clinical mastitis

Rod Class	Vrsta Species	Broj izolata Isolate number	%	
<i>Candida</i>	<i>C. guilliermondi</i>	9	21,4	
	<i>C. krusei / inconspicua</i>	5	11,9	
	<i>C. albicans</i>	3	7,1	
	<i>C. kefyr</i>	3	7,1	
	<i>C. ciferrii</i>	3	7,1	
	<i>C. tropicalis</i>	2	4,8	
	<i>C. colliculosa</i>	2	4,8	
	<i>C. rugosa</i>	2	4,8	
	<i>C. parapsilosis</i>	1	2,4	
	<i>C. glabrata</i>	1	2,4	
	<i>C. famata</i>	1	2,4	
	<i>Trichosporon</i>	<i>T. asahii</i>	4	9,5
		<i>T. mucoides</i>	6	14,3
Ukupno Total		42	100	

Zaključci

Istraživanjem 42 uzorka sekreta mliječne žlijezde krava s kliničkom slikom mastitisa utvrđeni su kvasci iz roda *Candida* spp. (76,2 %) i *Trichosporon* spp. (23,8 %). Najčešće su vrste *C. quilliermondi* (21,4 %) i *C. krusei/inconspicua* (11,9 %). Ostali izdvojeni kvasci su vrste: *C. albicans* (7,1 %), *C. kefyr* (7,1 %), *C. ciferrii* (7,1 %), *C. tropicalis* (4,8 %), *C. colliculosa* (4,8 %), *C. rugosa* (4,8 %), *C. parapsilosis* (2,4 %), *C. glabrata* (2,4 %) i *C. famata* (2,4 %), a iz roda *Trichosporon* spp. nađene su vrste: *T. asahii* (9,5 %) i *T. mucoides* (14,3 %).

U devet uzoraka sekreta krava s kliničkom slikom mastitisa, uz kvasce su izdvojene i bakterije. *Streptococcus agalactiae* izdvojen je u tri uzorka, *Streptococcus dysgalactiae* u tri uzorka, *Staphylococcus aureus* u dva uzorka i *E. coli* u 1 uzorku.

Rezultati ukazuju da su uzročnici mastitisa uz bakterije mogući i kvasci što zahtijeva daljnja opsežnija istraživanja.

U laboratorijskom dijagnostičkom radu, uz bakteriološku potrebno je napraviti mikroskopsku i mikološku pretragu sekreta mliječne žlijezde krava s kliničkom slikom mastitisa.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF YEASTS IN MILK SAMPLES FROM COWS' MAMMARY GLANDS

Summary

The purpose of this study was to isolate fungi from the milk of cow udder quarters with clinical mastitis. The samples were delivered in Veterinary laboratory in Križevci during a routine mastitis diagnostics. Milk samples were cultured on Columbia agar (Merck, KgaA, Darmstadt, Germany) with 5% ovine blood, Sabouraud 4% maltose agar (Merck, KgaA, Darmstadt, Germany) and Rice extract agar (Merck, KgaA, Darmstadt, Germany). The final diagnosis was established regarding to the results of the API 20 C AUX systems (bioMerieux, Lyon, France). All of the fungal isolates were yeasts, genera *Candida* spp. (76.2%) and *Trichosporon* spp. (23.8%). The most prevalent species were: *C. quilliermondi* (21.4%), *C. krusei/inconspicua* (11.9%) and *Trichosporon mucoides* (14.3%).

Key words: yeasts, cow's milk, mastitis

Literatura

- DURAKOVIĆ, S., DURAKOVIĆ, L. (2003.): Mikologija u biotehnologiji, Zagreb.
- ELAD, D., SHPIGEL, N. Y., WINKLER, M., KLINGER, I., FUCHS, V., SARAN, A., FAINGOLD, D. (1995): Feed contamination with *Candida krusei* as a probable source of mycotic mastitis in dairy cows. *JAVMA* 207 (5), 620-622.
- KADIĆ, Š. (1978.): Latentne bakterijske i gljivične infekcije vimena krava. *Veterinarski arhiv* 48 (2) 101-105.
- KADIĆ, Š., HAJSIG, M., RIŽNAR, S. (1983.): Kvasci u vimenu krava u različitim fazama laktacije. *Veterinarski arhiv* 53 (5) 225-231.
- KRUKOWSKI, H., TIETZE, M., MAJEWSKI, T., ROZANSKI, P. (2000): Survey of yeast mastitis in dairy herds of small-type farms in the Lublin region, Poland. *Mycopathologia* 150, 5-7.
- MORETTI, A., PASQUALI, P., MENCARONI, G., BONCIO, L., PIERGILI-FIORETTI, D. (1998): Relationship between cell counts in bovine milk and the presence of mastitis pathogens (Yeasts and bacteria). *J. Vet. Med. B.* 45, 129-132.

NAGLIĆ, T., HAJSIG, D., MADIĆ, J., PINTER, LJ. (2005.): Veterinarska mikrobiologija, specijalna bakteriologija i mikologija, Zagreb.

PENGOV, A. (2002): Prevalence of mycotic mastitis in cows. *Acta Veterinaria* 52 (2-3), 133-136.

QUINN, P. J., CARTER, M. E., MARKEY, B. K., CARTER, G. R. (1999): *Clinical veterinary microbiology*, Harcourt Publishers Limited, London, 395-397.

RADOSTITS, O. M., BLOOD, D. C., GAY, C. C. (2000): *Veterinary Medicine 9th edition*, 659-660.

RICHARD, J. L., McDONALD, J. S., FICHTNER, E., ANDERSON, A. J. (1980): Identification of yeasts from infected bovine mammary glands and their experimental infectivity in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 41 (12), 1991-1994.

TOPOLKO, S. (1964.): Prilog poznavanju kvašćevih gljivica u bolesnom i zdravom vimenu krava. Disertacija; Veterinarski fakultet Zagreb.

WAWRON, W., SZCZUBIAL, M. (2001): Treating mastitis mycetica in cows. *Medycyna Wet.* 57 (12), 863-866.

Adrese autora - Author's addresses:

Vesna Jaki, dr. vet. med.

Mr. sc. Darko Majnarić

Mr. sc. Jadranka Jurmanović

Hrvatski veterinarski institut Zagreb (Veterinarski zavod Križevci)

Zakmardijeva 10, Križevci

Mr. sc. Željka Bažulić

Zavod za javno zdravstvo grada Zagreba

Mirogojska 16, Zagreb

Prispjelo - Received: 05.03.2007.

Prihvaćeno - Accepted: 29.06.2007.