

IDENTYFIKACJA DROŹDZAKÓW IZOLOWANYCH Z KLINICZNYCH PRZYPADKÓW ZAPALENIA WYMIENIA U KRÓW

Stanisław Tarkiewicz, Stefan Wołoszyn, Ignacy Lourie

Katedra Położnictwa i Patologii Rozrodu Wydziału Weterynaryjnego
WSR w Lublinie

Kierownik; doc. dr Stanisław Tarkiewicz

Katedra Epizootologii Wydziału Weterynaryjnego WSR w Lublinie

Kierownik: prof. dr Tadeusz Jastrzębski

Drożdżycze wymienia wzbudzają coraz większe zainteresowanie klinicystów i praktyków weterynaryjnych, zajmujących się chorobami gruczołu mlekowego. Zwalczanie przy pomocy antybiotyków przewlekłych stanów zapalnych wymienia na tle paciorkowca bezmleczności, jak również udostępnianie hodowcom antybiotyków do leczenia ostrych stanów zapalnych, w znacznym stopniu przyczynia się do wzrostu ilości przypadków *mastitis* nie poddających się leczeniu zwykłymi metodami, które okazują się drożdżycami wymienia. Współczesne, udoskonalone metody diagnostyki laboratoryjnej, pozwalają na wczesne i właściwe rozpoznanie.

O występowaniu w mleku patogennych drożdży doniósł po raz pierwszy Klein [12]. Klimmer i Fleischer [13] zwrócili uwagę na znaczenie drożdży w stanach zapalnych wymienia. Rolle [19], jako pierwszy opisał bliżej nieokreślonego drożdżaka jako przyczynę zapalenia wymienia u pięciu krów. Po tych doniesieniach przez dłuższy czas nie spotyka się wzmianek na ten temat w literaturze fachowej. Dopiero od 1947 r. coraz częściej pojawiają się doniesienia w piśmiennictwie amerykańskim, angielskim i innych krajów na temat grzybic wymienia. Początkowo notowano pojedyncze przypadki, a następnie enzoocje w stadach krów, najczęściej w związku ze zwalczaniem przewlekłych stanów zapalnych wymienia.

Przyczyną pierwszych enzoocji był szczególnie zjadliwy grzyb z rodziny *cryptococcaceae* *Cryptococcus neoformans*, należący do rodzaju *Cryptococcus* [3, 7, 10, 18, 21]. W kilkanaście lat później enzoocje spowodowały drożdżaki z rodziny *Candida*: *Candida pseudotropicalis* [6], *Candida tropicalis*, *Candida krusei* i *Torulopsis glabrata* [9] oraz *Candida krusei* [22]. Najczęściej były to zakażenia wtórne, związane z dowymie-

niowym stosowaniem penicyliny. Kauker [11] uważa, że stosowanie penicyliny zubaża tkankę gruczołową w witaminę A i w sprzyjających warunkach wpływa na rozwój drożdżyc wymienia. Podobny wpływ wywiera zniszczenie antagonistycznej flory bakteryjnej. Badania Mehnerta i wsp. [14] wykazały, że dowymieniowo wprowadzone antybiotyki pobudzają rozprzestrzenianie się grzybów wskutek drażnienia tkanki gruczołowej.

Podejmowanie badań nad grzybicami wymienia ma duże znaczenie praktyczne i poznawcze. Szczególnie istotna jest identyfikacja grzybów wywołujących stan zapalny wymienia. Badania takie podjęto w Katedrze Położnictwa i Patologii Rozrodu Wydziału Weterynaryjnego WSR w Lublinie. Dotyczą one drożdżaków izolowanych z przypadków ostrego stanu zapalnego wymienia.

MATERIAŁ I METODYKA

Badany materiał obejmuje 90 szczepów izolowanych z ostrych przypadków zapalenia gruczołu mlekowego rozpoznanych u 71 krów jako drożdżyc wymienia. Szczepy użyte do badań izolowano na podłożu zawierającym agar z krwią. Wrażliwość szczepów oceniano metodą dyfuzyjno-krażkową, przy użyciu krążków antybiotycznych Wytwórni Surowic i Szczepionek w Warszawie. Wszystkie szczepy były odporne na działanie penicyliny, streptomycyny, chloromycetyny, terramycyny, neomycyny i erytromycyny. W preparatach mikroskopowych barwionych metodą Grama stwierdzono obecność owalnych lub okrągłych tworów blastospor, charakterystycznych dla grzybów. Do dalszych badań używano jednolitych morfologicznie czystych kultur, uzyskiwanych przez pasażę na podłożu stałym Sabourauda z dodatkiem penicyliny w ilości 50 j.mn. i streptomycyny w ilości 50 gamma na 1 ml agaru oraz płynu Raulina. Celem ustalenia przynależności gatunkowej wyosobnionych szczepów drożdży askosporowych lub anaskosporowych, przesiewano je na agar Gorodkowej, inkubowano w temperaturze 25°C, a następnie kontrolowano po 2, 4, 6 oraz 14 dniach na obecność worków zarodnikonośnych. W podanych odstępach czasu sporządzano preparaty mikroskopowe, które barwiono metodą Kufferatha. Użyte podłoża i metodę kontrolowano przy pomocy dwóch szczepów wzorcowych z kolekcji IHAR w Bydgoszczy, *Saccharomyces cerevisiae* M12-CBI oraz G2 II-UP, charakteryzujących się obecnością typowych worków zarodnikonośnych (*asci*).

Zdolność tworzenia grzybni rzekomej (*pseudomycelium*), grzybni prawdziwej (*mycelium*) oraz zarodników (*chlamydospor*), badano w makro- i mikrohodowli na podłożu z ryżem według Taschdijna, inkubowanych 2-4 dni w temperaturze 30°C. Preparaty świeże i mazane barwiono

metodą Grama oraz PAS. Celem określenia właściwości fermentacyjnych, czyli tzw. zymogramu, posługiwano się podłożami płynnymi według Wickerhama i Burtona, zawierającymi 2% roztwór badanych cukrów. Jednocześnie wykonywano tzw. auksanografię każdego szczepu na podłożach stałych celem określenia zdolności asymilacyjnych cukrów i azotanu potasu (KNO_3) metodą opisaną przez Polemanna. Wyniki odczytywano po 2, 4 i 14 dniach. Równocześnie badano zdolność wykorzystania etanolu $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ oraz rozkładania arbutyny na podłożach zalecanych przez Polemanna. Oznaczenia wykonywano z każdym szczepem dwukrotnie. Użyte podłoża i metodę kontrolowano przy pomocy szczepu wzorcowego *Candida albicans*, otrzymanego z Katedry Mykologii AM w Poznaniu oraz *Rhodotorula glutinis*, R 15-WIRL, otrzymanego z IHAR w Bydgoszczy.

WYNIKI I OMÓWIENIE

Na podstawie przeprowadzonych badań opartych na systematyce według Lodder i Kreger van Rij oraz metodyce podanej przez Polemanna, w 75 przypadkach izolowano szczepy drożdżaka *Candida pseudotropicalis*, w 5 przypadkach *Candida tropicalis*, w 1 przypadku *Candida albicans*, w 5 przypadkach *Torulopsis sphaerica*, a w 1 przypadku *Hansenula anomala*. Trzech szczepów nie udało się zakwalifikować do żadnej z grup taksonomicznych. Szczególnie uderzającym wynikiem badań jest stwierdzenie najczęstszego występowania w pojedynczych przypadkach zapalenia wymienia drożdżaka z rodzaju *Candida pseudotropicalis*. Dotąd zanotowano występowanie stanów zapalnych wymienia na tle zakażenia przez *Candida pseudotropicalis* w rzadkich pojedynczych przypadkach [4, 5, 8, 23]. Dopiero Bölck i wsp. [6] opisują enzootyczne występowanie grzybicy wymienia w stadzie bydła w związku z masowym leczeniem penicyliną przewlekłego, subklinicznego zapalenia wymienia, wywołanego przez paciorkowca bezmleczności. Zachorowały wszystkie leczone krowy w liczbie 63 wśród objawów ostrego zapalenia wymienia. We wszystkich przypadkach izolowano w czystej kulturze *C. pseudotropicalis*. Inne enzoocje grzybic wymienia notowane dotąd w literaturze, były wywołane przez *Cryptococcus neoformans* [3]. Ostatnio kilku autorów doniosło o enzoocjach grzybic wymienia wywołanych przez *Candida krusei* [22], *Candida tropicalis*, *C. krusei* i *Torulopsis glabrata* [9].

Drożdżak *Candida tropicalis* izolowany w naszych przypadkach zapalenia wymienia u krów jest stosunkowo często wymieniany jako przyczyna grzybniczego zapalenia wymienia, natomiast *Candida albicans* izolowano w pojedynczych przypadkach [1, 5, 16, 20, 23].

Hansenula anomala, która w jednym przypadku była przyczyną grzybicy wymienia, jest wymieniana również przez Kaukera [11] oraz Berts-

chingera i wsp. [4]. Poza tym w naszym materiale znalazł się drożdżak *Torulopsis sphaerica*, nie notowany dotąd w dostępnym piśmiennictwie jako przyczyna zapalenia wymienia.

WNIOSKI

1. W przeważającej ilości przypadków stan zapalny wymienia był spowodowany przez *Candida pseudotropicalis*.
2. W pojedynczych, nielicznych przypadkach grzybica wymienia była wywołana przez *C. tropicalis*, *C. albicans* i *Hansenula anomala*.
3. W kilku przypadkach z wydzieliny zapalnie zmienionego gruczołu mlekowego izolowano drożdżaka *Torulopsis sphaerica*, nie notowanego dotąd w dostępnej literaturze przedmiotu jako przyczynę grzybicy wymienia.

PIŚMIENNICTWO

1. Ainsworth G. C., Austwick P. K. C.: A survey of animal mycoses in Britain. Mycological Aspects. Trans. Brit. Mycol. Soc. 38, 369, 1955.
2. Ainsworth G. C., Austwick P. K. C.: Fungal diseases of animals. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, Bucks (England) 1959.
3. Andersen J. B., Jørgensen K. L.: Gaerceller (torulaceae) som arsag til mastitis efter penicillinbehandling. Nord. Vet. Med. 1, 958, 1949.
4. Bertschinger H. U., Schweizer R., Scholer H. J.: Hefen als Mastitiserrerer beim Rind. Schweiz. Arch. Thkde. 106, 183, 1964.
5. Bisping W.: Untersuchungen über die Aetiologie von Sprosspilzinfektionen bei Haustieren. Zentbl. vet. Med. B. 10, 325, 1963.
6. Bölck G., Kuhlmann W., Thieme D.: *Candida pseudotropicalis* als Erreger einer enzootischen Mastitis. Mh. Vet. Med. 22, 289, 1967.
7. Galli G.: Osservazioni e studi su casi di mastite micotica bovina. Vet. Ital. 5, 587, 1954.
8. Guilhon J., Charton A., Drouhet E., Kahn J., Lecoanet J.: Mammite de' la vache due a *Candida pseudotropicalis*. Bull. Acad. vet. France 34, 367, 1961.
9. Hauke H., Kielstein P., Johanning R., Gentsch E.: Acute seuchenhafte Hefemastitiden in einem Milchviehbestand nach Antibiotikabehandlung. Mh. Vet. Med. 22, 647, 1967.
10. Innes J. R. M., Seibold H. R., Arentzen W. P.: The pathology of bovine mastitis caused by *Cryptococcus neoformans*. Am. J. vet. Res. 13, 469, 1952.
11. Kauker E.: Über Mastitis-Blastomyceten. Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 68, 407, 1955.
12. Klein E.: Pathogenic microbes in milk. J. Hyg. 1, 78, 1901.
13. Klimmer M., Fleischer M.: Milchkunde. 2 wyd. Schoetz-Verlag, Berlin 1932.
14. Mehnert B.: Die Bedeutung der Hefen für die Tiermedizin. Tierärztl. Umschau 13, 343, 1958.
15. Mehnert B., Ernst K., Gedek W.: Hefen als Mastitiserreger beim Rind. Zbl. Vet. Med. R.A. 11, 97, 1964.
16. Overgoor G. H. A.: Twee gevallen van mycotische mastitis bij het rund. Diergeneesk 85, 29, 1960.

17. Polemann G., Wegemann T., Stammler A.: Klinik und Therapie der Pilzkrankheiten. G. Thieme Verlag, Stuttgart 1961.
18. Pouden W. D., Amberson J. M., Jaeger R. F.: A severe mastitis problem associated with *Cryptococcus neoformans* in a large dairy herd. Am. J. vet. Res. 13, 121, 1952.
19. Rolle M.: Hefe als Ursache für Euterentzündungen bei Kühen. Dt. tierärztl. Wschr. 42, 385, 1934.
20. Senze A., Sielicka B., Rauluszkiewicz S., Samborski Z.: Grzybice wymion u krów. Med. wet. 20, 478, 1964.
21. Simon J., Nicols R. E., Morse E. V.: An outbreak of bovine *Cryptococcosis*. J. Am. vet. Med. Ass. 122, 31, 1953.
22. Weser G.: Hefemastitis nach Antibioticabehandlung in einem Kuhbestand. Fortpfl. Besam. Haustiere. Bd. 3, 185, 1967.
23. Wołoszyn S., Krzyżanowski J., Ziolo T.: Badania nad drożdżycami gruczołu mlekowego (*Mastitis blastomycetica*) krów. Med. wet. 20, 332, 1964.

С. Таркевич, С. Волошин, И. Лурье

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ДРОЖЖЕЙ ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ КЛИНИЧЕСКИХ СЛУЧАЕВ МАСТИТА У КОРОВ

Резюме

90 штаммов дрожжей изолировали у 71 коров с *mastitis blastomycetica*. Идентификацию проводили по систематике Лодера и Крегер ван Рий и по методике Полемана. Идентифицировали: 75 штаммов *Candida pseudotropicalis*, 5 штаммов *Candida tropicalis*, 5 штаммов *Torulopsis sphaerica*, 1 штамм *Candida albicans* и 1 штамм *Hansenula anomala*. Не удалось идентифицировать 3 штаммов.

S. Tarkiewicz, S. Wołoszyn, I. Lourie

IDENTIFICATION OF YEAST-LIKE ORGANISMS ISOLATED FROM CLINICAL CASES OF MASTITIS IN COWS

Summary

90 strains of yeasts-like organism have been isolated in 71 cows with *mastitis blastomycetica*. Identification was made using the systematics of Lodder and Kreger van Rij and the methodics of Polemann. There have been identified: 75 strains of *Candida pseudotropicalis*, 5 strains of *Candida tropicalis*, 5 strains of *Torulopsis sphaerica*, 1 strain of *Candida albicans* and 1 strain of *Hansenula anomala*. Three strains could not be identified.